



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>

Université de Metz
UFR SciFA

**Centre des Sciences
de l'Environnement**

THESE

**présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Metz**

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 20 juin 1997

**EFFETS DE PROLIFÉRATEURS DES PEROXYSOMES HÉPATIQUES
SUR LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE ET
LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES CELLULES SHE
ET SUR LA COOPÉRATION MÉTABOLIQUE DES CELLULES V79**

Véronique CRUCIANI

MEMBRES DU JURY

Professeur **G. DIRHEIMER** - Université de Strasbourg - Rapporteur

Docteur **G. NGUYEN-BA** - CNRS, Châtenay-Malabry - Rapporteur

Docteur **M.J. DURAND** - Université de Metz - Examineur

Docteur **H. YAMASAKI** - CIRC, Lyon - Examineur

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

6111988

Université de Metz
UFR SciFA

Centre des Sciences
de l'Environnement

THESE

**présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Metz**

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 20 juin 1997

**EFFETS DE PROLIFÉRATEURS DES PEROXYSOMES HÉPATIQUES
SUR LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE ET
LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES CELLULES SHE
ET SUR LA COOPÉRATION MÉTABOLIQUE DES CELLULES V79**

Véronique CRUCIANI

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1997 0103
Cote	S/M ₃ 97/5
Loc	Magasin

MEMBRES DU JURY

Professeur **G. DIRHEIMER** - Université de Strasbourg - Rapporteur

Docteur **G. NGUYEN-BA** - CNRS, Châtenay-Malabry - Rapporteur

Docteur **M.J. DURAND** - Université de Metz - Examineur

Docteur **H. YAMASAKI** - CIRC, Lyon - Examineur

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

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à exprimer ma reconnaissance au Professeur P. VASSEUR pour m'avoir appris à apprécier la recherche. Je m'efforcerai d'être à la hauteur de votre enseignement.

Merci également au Professeur G. DIRHEIMER de l'Université de Strasbourg d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Mes sincères remerciements sont adressés au Docteur G. NGUYEN-BA, Directeur de Recherche au CNRS (Châtenay-Malabry) qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie vivement le Docteur M.-J. DURAND, Maître de Conférences à l'Université de Metz pour ses conseils et l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

Toute ma reconnaissance va au Docteur H. YAMASAKI, Directeur de Recherche au CIRC (Lyon), c'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de ce jury.

Claudine, te dire simplement "merci" me semble insuffisant puisque, sans toi, ce travail n'aurait pas pu être réalisé. J'ai beaucoup apprécié ces années passées à ta droite devant la hotte de cultures cellulaires...

Merci aux "Anne-Marie" pour m'avoir aidé à grandir.

Merci aussi à tous les membres du C.S.E. que j'ai côtoyés durant ces années. Je ne citerai personne de peur d'en oublier. Vous tous avez contribué, par votre sympathie et votre humour à rendre ces années agréables.

C'est un moment idéal pour remercier ma famille, c'est une "petite famille", mais je crois pouvoir affirmer sans me tromper que, dans leur cas, la qualité l'emporte sur la quantité.

Merci aussi à ma Grande Amie Cathy d'avoir supporté stoïquement le récit de mes petites frustrations.

Takk...

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

BaP	benzo(a)pyrène
BBP	benzyl butyl phtalate
CHL	cellules issues de poumon de hamster Chinois
CHO	cellules issues d'ovaires de hamster Chinois
CM	coopération métabolique
DAB	diaminobenzidine
Cx	connexine
DEHA	di(2-éthylhexyl)adipate
DEHP	di(2-éthylhexyl)phtalate
DINP	di-isononyl phtalate
DMBA	diméthylbenz(a)anthracène
DMEM	milieu Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	diméthyl sulfoxyde
EGF	"epidermal growth factor"
ER	élément de réponse
GJIC	communications intercellulaires <i>via</i> les jonctions "gap"
HC	hépatocancérogénicité
HGPRT	hypoxanthine guanine phosphorybosyle transférase
HH	hépatocytes humains
HPPs	proliférateurs des peroxysomes hépatiques
HR	hépatocytes de rat
LH	lymphocytes humains
LR	lymphocytes de rat
LS	lymphocytes de souris
MCP	méthyl clofénapate
MEHP	mono(2-éthylhexyl)phtalate
MM-BB	mutation sur souris transgéniques (Muta-Mouse et Big-Blue)
MN	micronoyaux
MNNG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MOHC	moelle osseuse de hamster Chinois
MOR	moelle osseuse de rat
MOS	moelle osseuse de souris
ODC	ornithine décarboxylase
PBS	tampon phosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PP	prolifération peroxysomale
PPAR	récepteur activé par les HPPs
PPRE	élément de réponse de PPAR
RSB	rupture d'ADN simple brin
RXR	récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> rétinolique

SAB	sérum albumine bovine
SCE	échanges de chromatides soeurs
SEM	“standard error of the mean”
SHE	embryon de hamster Syrien
SVF	sérum de veau foetal
TC	transfert de colorant
6-TG	6-thioguanine
Tf	transformation morphologique
TPA	12- <i>O</i> -tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
UDS	synthèse d'ADN non programmée

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	9
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. La cancérogénèse	11
I.A. La cancérogénèse est un processus multi-étapes	11
I.B. Mécanismes d'action possibles des cancérogènes non-génotoxiques	12
I.C. Mise en évidence <i>in vivo</i> de cancérogènes non-génotoxiques	14
C.1. Modèle de la peau de souris	14
C.2. Modèle hépatique chez les rongeurs	15
C.3. Modèle du colon chez le rat	15
C.4. Autres modèles <i>in vivo</i>	15
I.D. Mise en évidence <i>in vitro</i> de cancérogènes non-génotoxiques	15
D.1. Transformation cellulaire	16
a. Lignées cellulaires	16
b. Cellules primaires	17
D.2. Communications intercellulaires	20
a. Structure et formation des jonctions "gap"	20
b. Régulation de la perméabilité jonctionnelle	22
c. Pathologies associées à l'altération des GJIC	23
d. GJIC et cancer	23
e. Techniques d'étude des GJIC	25
I.E. Conclusion	27
II. Les proliférateurs des peroxysomes hépatiques	28
II.A. Caractéristiques de la prolifération peroxysomale	28
A.1. Les peroxysomes et la β -oxydation peroxysomale des acides gras	28
A.2. Substances induisant la prolifération peroxysomale	29
A.3. Prolifération peroxysomale chez le rat et la souris	29
A.4. Prolifération peroxysomale <i>in vitro</i>	30
A.5. Mécanismes de la prolifération peroxysomale	30
a. Structure du PPAR	31
b. Gènes cibles	31
c. Ligands du PPAR	31

II.B. Corrélation entre la prolifération peroxysomale hépatique et l'hépatocarcinogénèse	32
B.1. Prolifération peroxysomale et hépatocarcinogénèse chez les rongeurs (rat et souris)	32
a. Relation entre l'induction de la prolifération peroxysomale et l'hépatocarcinogénicité	32
b. Différences inter-espèces	33
B.2. Études épidémiologiques/risques pour l'homme	34
II.C. Mécanismes de la carcinogénicité	34
C.1. Génotoxicité	35
C.2. Stress oxydatif	36
C.3. Rôle de la prolifération cellulaire	37
II.D. Transformation cellulaire et inhibition des communications intercellulaires induites par les HPPs	38
D.1. Induction de la transformation cellulaire	
D.2. Inhibition des communications intercellulaires	39
II.E. Conclusion	40

MATÉRIEL ET MÉTHODES 41

I. Produits chimiques utilisés 41

II. Milieux de culture 41

III. Essai de transformation morphologique sur cellules SHE 42

III.A. Principe général de l'essai 42

III.B. Préparation des cellules 43

III.C. Protocole d'initiation/promotion 44

III.D. pH acide 45

III.E. Expression des résultats 45

IV. Études des communications intercellulaires 46

IV.A. Par inhibition de la coopération métabolique des cellules V79 46

IV.B. Par transfert de jaune de Lucifer 47

V. Études des connexines 48

V.A. Mise en évidence de la connexine 43 et de ses formes phosphorylées par "Western blot" 49

V.B. Localisation de la connexine 43 par immunofluorescence 50

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 52

I. Transformation morphologique et inhibition des communications intercellulaires des cellules SHE par le clofibrate et le MCP 53

I.A. Introduction 53

I.B. Résultats 54

B.1. Transformation morphologique des cellules SHE 54

B.2. Communications intercellulaires	54
I.C. Discussion	55
II. Effets des conditions expérimentales sur le potentiel transformant du clofibrate, du MCP, du DEHP et du MEHP vis-à-vis des cellules SHE	58
II.A. Introduction	58
II.B. Résultats	59
B.1. Pouvoir transformant des HPPs à pH 7,35	59
B.2. Pouvoir transformant des HPPs à pH 7,0	59
B.3. Pouvoir transformant des HPPs à pH 6,7	60
II.C. Discussion	60
III. Effets de quatre HPPs et du TPA sur les communications intercellulaires des cellules primaires SHE et de la lignée cellulaire V79	63
III.A. Introduction	63
III.B. Résultats	63
B.1. Communications intercellulaires entre cellules SHE	63
B.2. Communications intercellulaires entre cellules V79	64
III.C. Discussion	65
IV. Conséquences de l'exposition de cellules SHE et V79 à quatre HPPs et au TPA sur la phosphorylation et la localisation de la connexine 43	67
IV.A. Introduction	67
IV.B. Résultats	67
B.1. "Western blot" de la Cx43 dans les cellules SHE	67
B.2. "Western blot" de la Cx43 dans les cellules V79	68
B.3. Immunofluorescence	68
IV.C. Discussion	69
C.1. Profil de phosphorylation de la Cx43	69
C.2. Localisation de la Cx43	70
DISCUSSION GÉNÉRALE	72
I. Transformation morphologique des cellules SHE	72
II. Communications intercellulaires <i>via</i> les jonctions "gap"	76
III. Liens entre la transformation morphologique et l'inhibition des GJIC dans les cellules SHE	78
CONCLUSION	79
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
ANNEXES	111

ANNEXE I

Publication 1

“Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells.”

Publication 2

“Influence of experimental procedures on the transforming effects of four peroxisome proliferators on Syrian hamster embryo (SHE) cells.”

Publication 3

“Effects of peroxisome proliferators and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin 43 in two hamster fibroblast systems.”

Publication 4

“In vitro assays for detection of non genotoxic carcinogens.”

Publication 5

“SHE cell transformation assay as a predictive system for carcinogenicity of PAH and non-genotoxic carcinogens.”

Publication 6

“Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities.”

ANNEXE II

Cancérogènes non-génotoxiques.

ANNEXE III

Effets de divers cancérogènes ou promoteurs sur les GJIC.

ANNEXE IV

Substances induisant la prolifération peroxysomale.

ANNEXE V

Composition des milieux utilisés pour les cultures cellulaires : milieux de culture DMEM (GIBCO-BRL), DMEMM (HyClone) et DMEM modifié par LeBoeuf (LMDMEM).

ANNEXE VI

Tampons et réactifs nécessaires à la réalisation du “SDS-PAGE/Western-Blot.”

INTRODUCTION

Le cancer est une des principales causes de mortalité humaine dans les pays développés. Il est le résultat d'interactions complexes entre facteurs exogènes et endogènes et d'un processus multi-étapes qui conduit à l'expansion clonale et à la croissance anarchique de cellules ayant subi des dommages génétiques et épigénétiques. Ces dommages peuvent être liés à l'activation de proto-oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. La réduction du risque de cancer au niveau des populations passe par l'identification des substances induisant ce type de dommages ainsi que par leur contrôle.

Une substance cancérigène pour l'homme peut être identifiée *a posteriori* par des méthodes épidémiologiques. Des méthodes expérimentales doivent aussi être mises en oeuvre pour identifier les agents cancérigènes avant même que tout individu y soit exposé. La méthode expérimentale la plus à même de mimer les effets chez l'homme est l'étude *in vivo* chez l'animal, néanmoins ce type d'expérimentation long et coûteux, est utilisé pour les médicaments, les additifs alimentaires et les pesticides, mais n'est pas appliqué aux substances chimiques en général. De plus, le nombre de substances nouvellement synthétisées et susceptibles d'être mises sur le marché augmente rapidement. C'est pourquoi de nombreux essais à court terme ont été développés ces vingt dernières années, basés sur le concept de la relation mutagénèse-cancérigénèse. Ces tests ne sont toutefois capables de détecter que 67% des substances cancérigènes chez les rongeurs (Ashby et Tennant, 1991). Ceci implique que les cancérigènes n'induisent pas toujours des modifications génétiques détectables par les essais de mutagénicité. En effet, les cancérigènes dits "non-génotoxiques" agissent sur de multiples cibles sans que leur action ne puisse être détectée par les essais *in vitro* classiques. Il faudrait donc trouver d'autres critères capables de mettre en évidence les cancérigènes qui n'induisent pas de dommages directs à l'ADN, mais participent indirectement au processus d'accumulation des modifications génétiques (Yamasaki, 1996).

Nous nous sommes intéressés à deux critères *in vitro* susceptibles d'être utilisés pour détecter les cancérigènes génotoxiques et non-génotoxiques : la transformation morphologique des cellules primaires d'embryon de hamster Syrien (SHE) et l'inhibition des communications intercellulaires *via* les jonctions "gap" (GJIC) sur les cellules SHE et les cellules de la lignée V79.

La transformation morphologique et l'inhibition des communications intercellulaires ont été étudiées sur des représentants d'une catégorie de substances hépatocancérigènes chez l'animal, les proliférateurs des peroxysomes.

Les substances prolifératrices des peroxysomes hépatiques (HPPs) induisent la prolifération peroxysomale et l'hépatomégalie à court terme chez les rongeurs. A plus long terme, elles provoquent la formation de carcinomes hépatocellulaires. Ces substances répondent en majorité négativement aux essais basés sur la mise en évidence de dommages à l'ADN (Reddy et Lalwani, 1983 ; Ashby *et al.*, 1994). Parmi les 71 produits considérés comme HPPs, nous avons sélectionné le clofibrate et le méthyl clofénapate (MCP), deux

agents hypolipémiants de structures proches, ainsi que le di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP), agent plastifiant présent dans l'environnement et un de ses métabolites primaires, le mono(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP).

L'analyse bibliographique aborde en premier lieu les mécanismes de la cancérogénèse chimique. Elle décrit ensuite les critères de cancérogénèse *in vitro* étudiés ainsi que les effets des proliférateurs des peroxysomes hépatiques sur le métabolisme hépatique des rongeurs et leurs mécanismes d'action possibles.

La partie "Matériel et Méthodes" est consacrée aux essais de transformation morphologique des cellules SHE, aux essais d'inhibition des communications intercellulaires des cellules SHE et des cellules de la lignée V79, ainsi qu'aux méthodes d'études de la connexine 43.

La partie "Résultats et Discussion" comprend l'étude des effets de quatre HPPs sur :

- la transformation morphologique des cellules SHE,
- les communications intercellulaires des cellules SHE et V79,
- la phosphorylation et la localisation de la Cx43 dans les cellules SHE et V79. Cette dernière partie du travail a été réalisée au Department for Environmental and Occupational Cancer, du Norwegian Radium Hospital à Oslo avec la collaboration de l'équipe du Pr T. Sanner.

Cette étude a été initiée dans le cadre d'un programme de recherche CEE (n° CT91-0146) sur les cancérogènes non-génotoxiques, piloté par le Dr H. Yamasaki du CIRC et réalisée grâce à la collaboration du Dr G. Nguyen-Ba du CNRS.

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

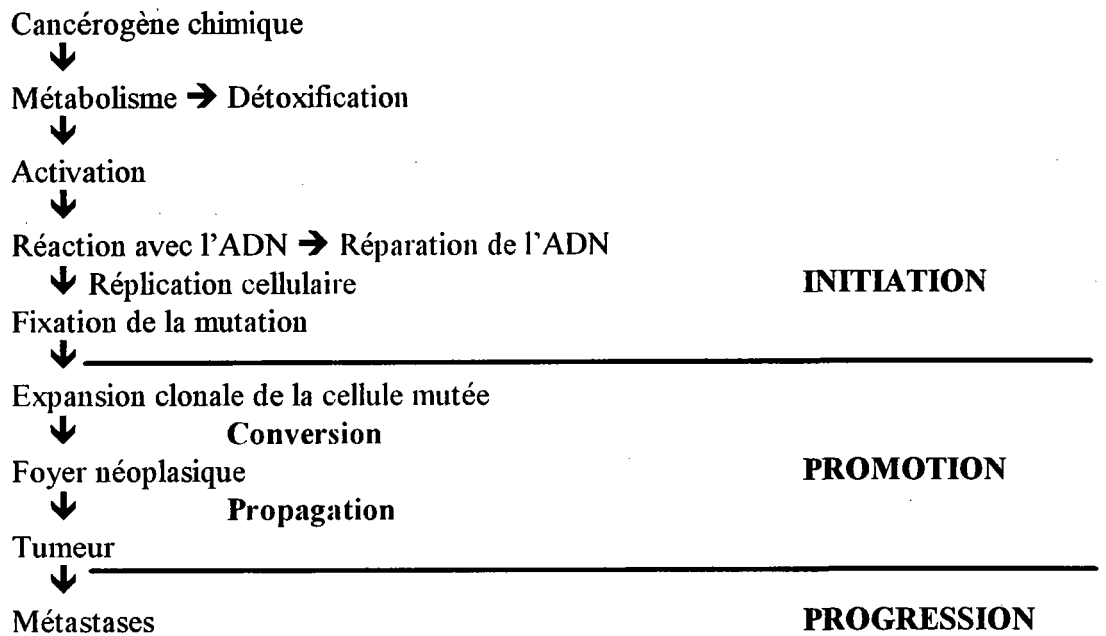


Figure 1. Représentation schématique du modèle théorique de développement multi-étapes du cancer sur la peau chez la souris (adapté de Shaw et Verma, 1995).

I. LA CANCÉROGÉNÈSE.

Les études relatives à la cancérologie expérimentale chez l'animal autant que les études épidémiologiques humaines, indiquent que le processus de cancérologie est multi-étapes et séquentiel, ceci implique que différents mécanismes peuvent mener au cancer. En effet, la plupart des cancers sont probablement provoqués par l'interaction de substances exogènes et endogènes. Les stratégies mises au point pour le contrôle des risques cancérogènes et mutagènes encourus par l'homme sont basées sur l'identification des facteurs de risques dans l'environnement ou les lieux de travail. Ces facteurs peuvent être mis en évidence *a posteriori* par les épidémiologistes, mais ils devraient aussi pouvoir être détectés par les expérimentateurs à l'aide de systèmes capables de prédire *a priori* l'activité mutagène ou cancérogène d'une substance.

A. La cancérologie est un processus multi-étapes.

En ce qui concerne le mécanisme de la cancérologie, le concept liant la cancérologie à une action directe des composés sur l'ADN a longtemps prévalu.

Boveri a été le premier, en 1914, à proposer l'implication de mutations dans le processus de cancérologie, la nature physique et chimique de ces mutations restant alors inconnues.

Après la publication de la structure de l'ADN (Watson et Crick, 1953) et la découverte du code génétique (Crick *et al.*, 1961 ; Crick, 1966), une connaissance plus précise des conséquences de l'action d'une substance sur l'ADN a été possible. Miller et Miller observaient en 1966 qu'un des principaux mécanismes d'action des cancérogènes chimiques est la formation d'adduits avec les macromolécules cellulaires, dont l'ADN. Miller et Miller (1969) ont donc proposé que la plupart, sinon tous les cancérogènes chimiques sont, directement ou par l'intermédiaire de leurs métabolites, des dérivés électrophiles réactifs qui se combinent aux groupements nucléophiles des macromolécules (Lawley, 1989).

En 1941, Berenblum démontrait que l'action séquentielle d'un initiateur, tel que le benzo(a)pyrène (BaP) et d'un promoteur tel que l'huile de croton, pouvait provoquer le cancer plus rapidement que lorsque les deux types de produits étaient appliqués seuls. Il développait ainsi le concept d'initiation/promotion (figure 1) par ses expériences réalisées sur la peau de souris. Les résultats obtenus sur les modèles animaux pouvaient dès lors s'expliquer par un événement mutagène induit par un initiateur, provoquant la formation de cellules cancéreuses quiescentes. Le promoteur peut alors agir sur ces cellules pour induire leur multiplication et provoquer l'apparition de foyers néoplasiques eux-mêmes capables de progresser vers le stade malin et invasif.

Jusqu'aux années 1970, de gros efforts ont été réalisés dans la mise au point d'essais à court terme *in vitro*, basés sur la détection de dommages à l'ADN causés par les cancérrogènes chimiques. Le test d'Ames, par exemple, a beaucoup été utilisé et 90% des cancérrogènes testés ont été déclarés mutagènes chez *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.*, 1975 ; McCann *et al.*, 1975). Cet essai a permis de nombreuses découvertes relatives aux mécanismes génétiques de la cancérogénèse chimique. Parallèlement, l'étude de la cancérogénèse virale, a amené à découvrir que certains proto-oncogènes cellulaires peuvent être activés en oncogènes par des mutations ponctuelles et autres dommages à l'ADN (Bishop, 1982). En effet, l'évolution d'une cellule vers le stade tumoral passe par la mutation/activation d'une série de proto-oncogènes en oncogènes impliqués dans les mécanismes de régulation du comportement social des cellules dans l'organisme. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs intervient également dans le processus de la cancérogénèse (Weinberg, 1989).

Par la suite, des substances identifiées comme cancérrogènes chez l'animal ont répondu négativement aux tests de génotoxicité. Parmi ces produits, on trouve l'amiante, certaines hormones sexuelles, la saccharine, les proliférateurs des peroxysomes hépatiques ainsi que de nombreuses autres substances chimiques (annexe II ; Ashby et Tennant, 1991).

B. Mécanismes d'action possibles des cancérrogènes non-génotoxiques.

A l'heure actuelle, les cancérrogènes sont divisés en deux groupes.

- ◆ Les cancérrogènes génotoxiques sont capables de réagir avec l'ADN et d'altérer irréversiblement le génome (Harris, 1991). Les conséquences de l'action de tels agents sur l'ADN sont aisément détectées.

- ◆ Les cancérrogènes non-génotoxiques ne possèdent pas dans leur structure chimique ou celle de leurs métabolites de groupement électrophile capable d'agir directement sur l'ADN. Ils agissent sur les voies de prolifération et de différenciation cellulaires (Weinstein, 1988). Ils peuvent aussi perturber les systèmes de réparation de l'ADN et provoquer la fixation des lésions augmentant ainsi la survie des cellules initiées. Les cibles cellulaires de ces cancérrogènes sont multiples et varient d'une classe de composé à l'autre.

Les substances non-génotoxiques peuvent intervenir sur les systèmes de régulation de la croissance cellulaire. Elles peuvent :

- ◆ interférer avec les signaux de transduction qui contrôlent la croissance, la division et la différenciation cellulaire,
- ◆ activer des protéines kinases et/ou inhiber des protéines phosphatases,

- ♦ activer le métabolisme des polyamines par induction de l'ornithine décarboxylase dont l'activité est étroitement liée à la prolifération cellulaire,
 - ♦ augmenter la production de radicaux libres,
 - ♦ agir sur les enzymes impliquées dans la réplication, la réparation ou la transcription de l'ADN,
 - ♦ altérer la structure et la fonction de la membrane cytoplasmique et perturber les communications intercellulaires,
 - ♦ modifier le contrôle du cycle cellulaire,
 - ♦ inhiber la mort cellulaire programmée (apoptose)...
- (d'après Yamasaki *et al.*, 1996 et Durand *et al.*, annexe I, publication 4)

A titre d'exemple, nous citerons le contrôle de la division cellulaire qui est sans doute l'une des cibles principales des cancérogènes.

La division cellulaire peut être contrôlée par de nombreux facteurs tels que les facteurs de croissance ou les hormones, qui agissent par liaison à des récepteurs spécifiques.

Dans la plupart des cas, les **récepteurs** sont des protéines **transmembranaires** présentes à la surface de la cellule cible. Ces récepteurs, activés après fixation de leur ligand spécifique, génèrent une cascade de signaux intracellulaires, principalement des phosphorylations par l'activation de diverses protéines kinases comme la protéine kinase C (PKC). Ces signaux intracellulaires conduisent à l'activation de facteurs de transcription qui agissent sur l'expression de nombreux gènes à l'origine de :

- la réplication de l'ADN,
- l'augmentation du pH et de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (ces deux événements peuvent aussi constituer des causes plutôt que des conséquences de l'initiation de la division cellulaire),
- l'activation des gènes à réponse précoce comme *c-fos*, *c-myc* et *c-jun*, induite dans les 15 min après la fixation du ligand à son récepteur et ne nécessitant pas de synthèse protéique,
- l'activation des gènes à réponse retardée, induite 1 h après l'activation initiale du récepteur probablement par les produits des gènes à réponse précoce ; parmi les produits des gènes à réponse retardée, il y a des constituants essentiels du système de contrôle du cycle cellulaire comme les protéines Cdk et plusieurs cyclines,
- l'initiation de la division cellulaire. (adapté de Alberts *et al.*, 1994)

Dans quelques cas, les récepteurs se trouvent à l'intérieur des cellules cibles et le ligand doit entrer dans les cellules par diffusion passive ou facilitée pour les activer. Ces ligands hydrophobes, comme certaines hormones et vitamines font parvenir leur signal au génome grâce à des récepteurs intracellulaires ou **récepteurs nucléaires**, qui agissent comme des facteurs de transcription et exercent leurs fonctions régulatrices directement sur les gènes (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Tableau 1. Modèles animaux utilisés pour la mise en évidence d'agents promoteurs de tumeurs (d'après Shaw et Verma, 1995).

Tissu	Espèce	Substance ou stimulus
peau	souris	blessure, esters de phorbol, alcaloïdes indoliques, polyacétates, peroxydes organiques, acide okadaïque, TCDD
foie	souris et/ou rat	phénobarbital, DDT, PCBs, HTB, hormones sexuelles, TCDD, hépatectomie partielle, DES, proliférateurs des peroxysomes
colon	rat	acides biliaires, régime gras
vessie	rat	saccharine, cyclamate, L-tryptophane, allopurinol
rein	rat	esters de phorbol, D-limonène
poumon	souris	HTB, esters de phorbol, saccharine, glycérol
glande mammaire	rat	prolactine
thyroïde	rat	phénobarbital

DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; PCBs, polychloro biphényles ; HTB, hydroxytoluène butylé ; TCDD, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine ; DES, diéthylstilboestrol.

Les récepteurs nucléaires représentent une grande famille de facteurs de transcription dans les cellules eucaryotes et sont divisés en deux sous-groupes en fonction de la localisation de leur forme libre.

- ♦ Les récepteurs de type I sont localisés dans le cytoplasme et transloqués vers le noyau après liaison avec leur ligand ; sous leur forme inactive, ces récepteurs sont souvent liés à des protéines de choc-thermique. Les récepteurs des stéroïdes tels que ceux des glucocorticoïdes, des oestrogènes, des minéralocorticoïdes ou de la progestérone font partie de ce groupe.

- ♦ Les récepteurs de type II, dont la localisation est indépendante de la liaison au ligand, changent de conformation pour assurer la transactivation des gènes cibles. Ce groupe inclut les récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinolique (RXR), de la vitamine D, des proliférateurs des peroxysomes (PPAR) et des hormones thyroïdiennes (Mangelsdorf et Evans, 1995).

Les séquences d'ADN auxquelles se lient les récepteurs nucléaires sont appelées "élément de réponse" (ER). Tous les récepteurs reconnaissent une séquence ER hexamérique dérivée de PuGGTCA et la plupart d'entre eux sont actifs sous forme de dimères. Les récepteurs de type I forment des homodimères se liant à des séquences palindromiques de ER. Les récepteurs de type II forment préférentiellement des hétérodimères se liant à des répétitions de ER séparées par un nombre de nucléotides qui varie de 1 à 5. Le nombre de nucléotides entre deux répétitions de la séquence est déterminant du récepteur qui va s'y fixer et de l'efficacité de l'activation (Schoonjans *et al.*, 1996).

L'interférence dans les processus d'activation de ces récepteurs et des gènes qu'ils contrôlent est un des mécanismes d'action des cancérrogènes.

C. Mise en évidence *in vivo* de cancérrogènes non-génotoxiques.

D'après Fitzgerald et Yamasaki (1990), les modèles animaux sont les plus à même de démontrer l'activité promotrice d'un composé puisque les expérimentations *in vivo* sont à l'origine du concept de promotion tumorale. L'évaluation du risque se limite alors à une extrapolation à l'homme des résultats des expérimentations animales. Le tableau 1 présente les modèles les plus utilisés pour la détection de cancérrogènes non-génotoxiques.

C.1. Modèle de la peau de souris.

Le système basé sur l'utilisation de peau de souris pour la mise en évidence d'un potentiel cancérogène est devenu l'essai *in vivo* le plus employé et de nombreux composés y ont été soumis (Berenblum, 1982).

Des études réalisées à l'aide de cet essai ont montré que la promotion peut elle-même se diviser en au moins deux étapes distinctes : la conversion (phase I) et la propagation (phase II). Les promoteurs de phase II (mézérene, 12-*O*-rétinoylphorbol-13-

acétate) ne provoquent la formation de tumeurs qu'après de nombreuses applications si les kératinocytes initiés ont d'abord été exposés à une ou plusieurs doses d'un promoteur de phase I tel que le 12-*O*-tétradécanoyl phorbol-13-acétate (TPA) (Shaw et Verma, 1995).

C.2. Modèle hépatique chez les rongeurs.

Dans les années 70, le caractère multi-étapes de la cancérogenèse a été démontré au niveau hépatique chez les rongeurs. Comparés aux cellules épidermiques et à d'autres cellules épithéliales, les hépatocytes prolifèrent peu chez l'animal adulte. Pour pallier à cet inconvénient, des animaux jeunes (dont le foie est encore en croissance) ou partiellement hépatectomisés (les hépatocytes restants prolifèrent) sont utilisés. L'hépatectomie partielle est aussi utilisée comme stimulus promoteur après traitement par un cancérogène.

Au départ, le critère utilisé pour ces essais d'initiation/promotion sur le foie était l'apparition de nodules hyperplasiques ou de carcinomes. Le développement des méthodes de coloration histochimiques pour l'identification d'éventuelles lésions préneoplasiques a réduit de beaucoup la durée des expériences (Shaw et Verma, 1995).

C.3. Modèle du colon chez le rat.

La formation de carcinomes du colon chez le rat passe par une séquence d'événements incluant l'apparition de polypes bénins (adénomes). Ce modèle est particulièrement utilisé puisque le développement du cancer du colon humain suit des étapes similaires. De plus, il permet d'étudier les effets de certains facteurs, tels que les régimes alimentaires trop riches en graisses, démontrés épidémiologiquement comme promoteurs de la croissance des adénomes et de leur progression en carcinomes (Shaw et Verma, 1995).

C.4. Autres modèles *in vivo*.

En plus des tissus décrits plus haut, la cancérogenèse multi-étapes a aussi été modélisée sur de nombreux autres organes chez le rat et la souris : la vessie, le rein, le poumon, les glandes mammaires et thyroïde (tableau 1 ; Shaw et Verma, 1995).

D. Mise en évidence *in vitro* de cancérogènes non-génotoxiques.

Entre les années 1960 et 1970, la démonstration de la capacité de fibroblastes en culture à être transformés après exposition à des cancérogènes, a ouvert la voie aux essais *in vitro* (Fitzgerald et Yamasaki, 1990). Nous décrivons ici les essais basés sur l'étude de l'induction de la transformation cellulaire et de l'inhibition des communications intercellulaires.

D.1. Transformation cellulaire.

La transformation cellulaire est définie comme le processus de conversion de cellules normales cultivées *in vitro* en cellules présentant le phénotype de cellules néoplasiques et qui, inoculées à des animaux isologues, provoquent le développement de tumeurs (Elias, 1993).

Comme la cancérogénèse *in vivo*, la transformation néoplasique *in vitro* est un processus multi-étapes qui implique le passage des cellules par différents stades successifs depuis l'apparition de cellules initiées jusqu'à la formation de cellules néoplasiques (Barrett et Ts'o, 1978).

La transformation cellulaire mime *in vitro* les différentes étapes de la tumorigénicité *in vivo* et permet la détection d'un potentiel cancérogène.

Plusieurs critères associés à la transformation néoplasique des cellules peuvent être utilisés pour la mise en évidence de la transformation cellulaire :

- la transformation morphologique de colonies cellulaires isolées,
- la formation de foyers de transformation dans un tapis cellulaire,
- la capacité pour les cellules de croître en milieu gélosé.

Ces modifications sont l'expression des altérations génétiques et/ou épigénétiques provoquées par les cancérogènes dans les cellules exposées.

Trois systèmes principaux peuvent être employés pour évaluer le potentiel transformant d'une substance : deux d'entre eux utilisent des lignées cellulaires établies et le troisième des cellules primaires en culture.

a. Lignées cellulaires.

Les systèmes utilisés sont les lignées fibroblastiques BALB/c-3T3 (Kakunaga, 1973) et C3H10T½ (Reznikoff *et al.*, 1973) issues d'embryons murins.

Par analogie avec la cancérogénèse multi-étapes *in vivo*, l'exposition de ces cellules à un initiateur provoque l'induction de mutations dans quelques cellules. Après de nouvelles et multiples expositions à un promoteur, leur division sera induite ainsi que la formation de foyers de transformation. Ces foyers sont des zones de forte densité cellulaire et/ou d'altérations de la morphologie des cellules comparées aux cellules du tapis confluent environnant. L'agent promoteur augmente le nombre (et souvent la taille) des foyers de transformation de manière dose-dépendante.

Les systèmes BALB/c-3T3 et C3H10T½ ont été utilisés pour la mise en évidence du potentiel initiateur et/ou promoteur de nombreuses substances (Swierenga et Yamasaki, 1992). Le promoteur-type généralement utilisé pour détecter le potentiel initiateur d'une substance est le TPA. A l'inverse, le diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) ou la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) sont utilisés comme initiateurs-type (Shaw et Verma, 1995).

b. Cellules primaires.

♦ Caractéristiques des cellules primaires utilisées.

C'est avec des cellules primaires d'embryon de hamster Syrien (SHE) que Berwald et Sachs (1963, 1965) ont été les premiers à démontrer l'induction par des cancérogènes chimiques de la transformation néoplasique de cellules en culture.

Les cellules qui forment des colonies morphologiquement transformées présentent des altérations morphologiques et fonctionnelles :

- ♦ croissance anarchique,
- ♦ enchevêtrement des cellules,
- ♦ perte de l'inhibition de contact,
- ♦ basophilie augmentée,
- ♦ augmentation du ratio noyau/cytoplasme.

Ce type de colonies est observable dès une semaine de culture après le traitement des cellules par 10 µg/ml (40 µM) de BaP pendant 24 h. La transformation morphologique est le marqueur phénotypique le plus précoce de l'effet cancérogène d'une substance sur des cellules en culture (Barrett et T'so, 1978).

Lorsque ces cellules, exposées au BaP pendant 24 h, sont régulièrement repiquées, d'autres modifications phénotypiques apparaissent : des cellules ayant une activité fibrinolytique augmentée sont observées après 2 ou 3 semaines de culture. C'est seulement après 6 à 15 semaines de culture (30 à 100 doublements de population), que les cellules deviennent capables de croître dans l'agar (indépendance d'ancrage) ou de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des animaux isologues (Barrett et Ts'o, 1978).

D'autres études montrent que le traitement des cellules SHE par des cancérogènes leur permet d'échapper à la "sénescence cellulaire" qui limite le nombre de division des cellules normales en culture (Endo *et al.*, 1994). Il semble que cette immortalisation soit corrélée à des altérations chromosomiques :

- ♦ des réarrangements sont observés sur les chromosomes 3 et 6 de cellules SHE transformées par des rayons γ , sans que la fonction des gènes localisés dans les zones concernées n'ait pu être définie (Endo et Heiber, 1995),
- ♦ la trisomie des chromosomes 8 et 11, ainsi que la monosomie des chromosomes 13 et X ont été mises en évidence dans des cellules SHE traitées par des inhibiteurs de phosphatases tels que l'acide okadaïque et l'orthovanadate de sodium (Afshari *et al.*, 1993).

La transformation des cellules SHE a aussi pu être corrélée à l'activation du proto-oncogène *Ha-ras* (Thomassen *et al.*, 1985) dans 40% des cas testés (Gilmer *et al.*, 1988).

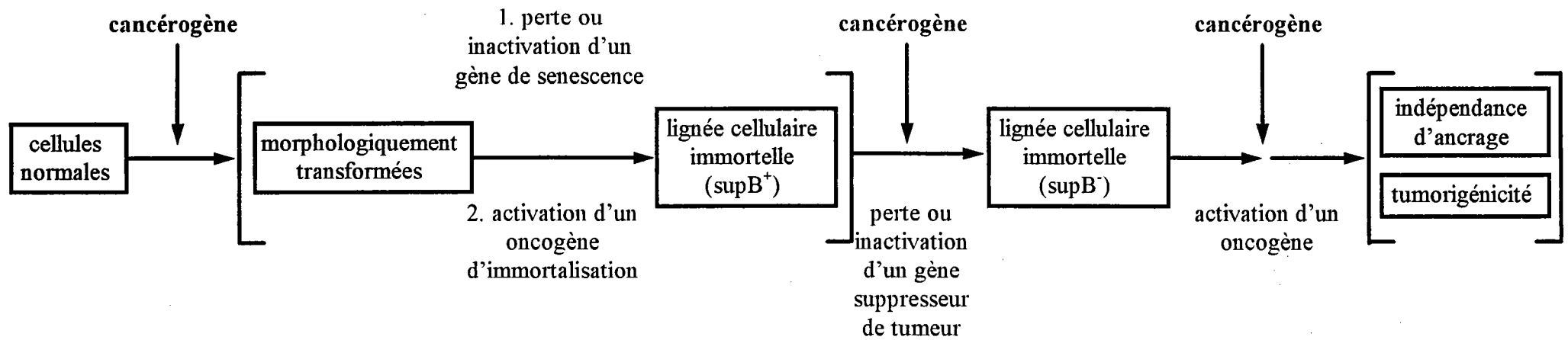


Figure 2. Progression néoplasique multi-étapes des cellules d'embryon de hamster Syrien (d'après Boyd et Barrett, 1990).

D'autre part, Barrett et son équipe ont isolé des cellules SHE immortelles, mais non encore tumorigènes. Deux lignées de cellules SHE ont été isolées :

- (i) la première est capable de supprimer l'indépendance d'ancrage d'une lignée cellulaire fortement maligne (BP6T) après hybridation des deux types cellulaires (supB⁺),
- (ii) la seconde en est incapable (supB⁻).

Ceci permet l'étude des propriétés et de la séquence du gène suppresseur de tumeur impliqué dans le processus de transformation (Koi et Barrett, 1986 ; Koi *et al.*, 1989 ; Cizdziel *et al.*, 1991 ; Wiseman *et al.*, 1991).

Ces résultats confirment que la transformation des cellules SHE est un processus progressif et multi-étapes. Au moins deux altérations (immortalité et indépendance d'ancrage) sont nécessaires pour que les cellules deviennent tumorigènes (Barrett, 1993). La figure 2 présente les voies de transformation néoplasique des cellules SHE telles que les décrivent Boyd et Barrett (1990).

D'autre part, Isfort *et al.* (1992b) ont mis l'accent sur le fait que la population de cellules SHE est un mélange hétérogène complexe (cellules épithéliales, mésenchymales et non identifiées) puisque constitué à partir des tissus non encore différenciés des embryons. Ces types cellulaires différents sont tous sensibles à la transformation morphologique et peuvent être la cible de cancérogènes différents. Ceci souligne l'intérêt de l'utilisation des cellules SHE pour la mise en évidence du potentiel transformant de substances chimiques.

♦ Essai de transformation morphologique des cellules SHE.

L'essai, décrit par DiPaolo *et al.* (1969) sur la base des travaux de Berwald et Sachs (1963, 1965) permet d'évaluer la fréquence de transformation morphologique (Tf) induite par un composé chimique. Cet essai a été largement utilisé (Pienta *et al.*, 1977 ; Barrett et Ts'o, 1978 ; DiPaolo, 1980 ; Tsutsui *et al.*, 1984 ; Barrett *et al.*, 1985 ; Barrett et Lamb, 1985 ; Sanner et Rivedal, 1985 ; Koi et Barrett, 1986 ; Tu *et al.*, 1986 ; LeBoeuf et Kerckaert, 1987 ; Jones *et al.*, 1988), une corrélation de 80% existe entre le potentiel transformant d'une substance sur les cellules SHE et son pouvoir cancérogène *in vivo* (Isfort *et al.*, 1996a).

L'ensemble de ces travaux démontre que la transformation morphologique des cellules SHE est un critère valable pour la détection des cancérogènes tant génotoxiques que non-génotoxiques.

Les avantages et inconvénients du test de transformation morphologique des cellules SHE comparé aux tests utilisant des lignées cellulaires pour l'évaluation du potentiel transformant de cancérogènes chimiques sont présentés dans le tableau 2.

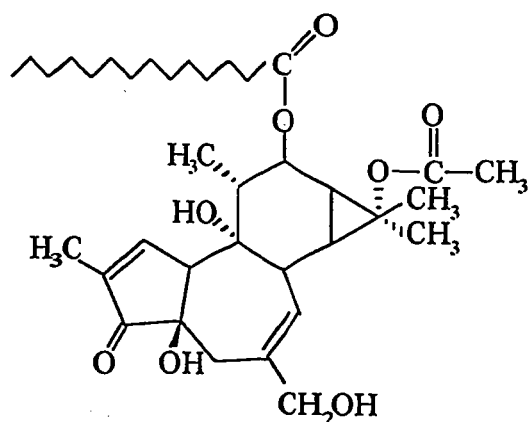
Tableau 2. Avantages et inconvénients de l'utilisation des cellules SHE pour l'étude du potentiel transformant de cancérogènes chimiques.

Avantages :

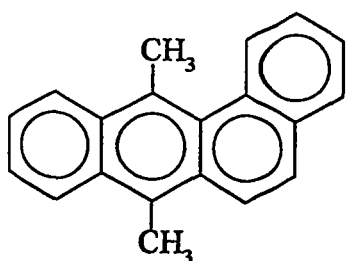
1. les cellules primaires SHE ont gardé les capacités de métabolisation des cellules d'origine.
2. contrairement aux cellules de lignées établies qui sont aneuploïdes, les cellules SHE sont diploïdes.
3. les cellules SHE sont génétiquement stables.
4. le taux de transformation spontanée est faible.
5. les essais sont rapides : le potentiel transformant d'une substance peut être évalué en 9 jours alors que 4 à 6 semaines sont nécessaires au développement de foyers de transformation avec des lignées cellulaires.

Inconvénients :

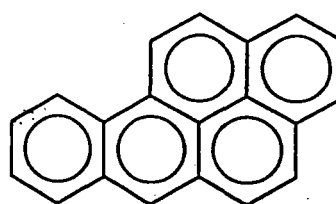
1. les cellules SHE étant des cellules primaires, leur croissance en culture est plus difficile que celle des cellules de lignées établies.
2. la sensibilité variable de différents lots de cellules en fonction de leur embryon d'origine et du lot de sérum utilisé implique la réalisation d'études préliminaires permettant de choisir le couple sérum/cellule approprié.
3. la lecture des essais est subjective et peut entraîner une variabilité inter-laboratoires.



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



diméthylbenz(a)anthracène (DMBA)



benzo(a)pyrène (BaP)

Figure 3. Structure chimique du TPA, du DMBA et du BaP.

Tableau 3. Transformation morphologique de cellules SHE exposées au DMBA (d'après Cruciani *et al.*, 1996).

DMBA (en µg/ml)	Nombre total de colonies	Nombre de colonies transformées	Tf ^a (%)	Pourcentage de sérum dans le milieu ^c	Réf.
0	354	0	0	10	DiPaolo <i>et al.</i> , 1969
0,1	218	37	16,9 ^b		
0	2983	0	0	10	Tu <i>et al.</i> , 1986
0,19 à 3,0	1001	33	3,3 ^b		
0	5158	0	0		
0,19 à 3,0	1065	25	2,3 ^b		
0	7226	0	0	20	
0,04 à 0,3	1551	6	0,4 ^b		
0	4321	0	0		
0,2 à 3,0	1014	6	0,6 ^b		
0	3431	0	0	20	
0,2 à 3,0	2829	12	0,4 ^b		
0	5067	2	<0,1		
0,06 à 0,3	1040	34	3,3 ^b		

^a taux de transformation correspondant au nombre de colonies transformées/nombre de colonies totales x 100.

^b valeur significativement différente du contrôle correspondant ($P < 0,05$).

^c les conditions expérimentales sont : 300 cellules cibles sur une couche nourricière de $6 \cdot 10^4$ cellules irradiées. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM avec 3,7 g/l de NaHCO₃ (pH 7,35).

Tableau 4. Transformation morphologique des cellules SHE traitées par le BaP et/ou le TPA (d'après Cruciani *et al.*, 1996).

Traitement dose (µg/ml) /durée	Nombre total de colonies	Nombre de colonies transformées	Tf ^a (%)	Conditions expérimentales	Réf.
contrôle	1127	6	0,5	pH 7,35	Bessi <i>et al.</i> , 1995
BaP 0,1/1 j.	1309	22	1,7	20% SVF	
TPA 0,1/6 j.	2572	61	2,4 ^b	300 cibles	
BaP + TPA	1503	71	4,7 ^b	4.10 ⁴ nourricières	
contrôle	325	0	0	pH 7,2	Rivedal et Sanner, 1981
BaP 0,05/3 j.	301	1	0,3	20% SVF	
TPA 0,1/3 j.	518	9	1,7	200-250 cibles	
BaP + TPA	398	42	10,6 ^b	6.10 ⁴ nourricières	
contrôle	348	0	0		Rivedal et Sanner, 1982
BaP 0,05/3 j.	660	1	0,2		
TPA 0,1/4 j.	672	12	1,8 ^b		
BaP + TPA	396	54	13,6 ^b		
contrôle	276	0	0		Rivedal et Sanner, 1985
BaP 0,05/2 j.	240	0	0		
TPA 0,1/5 j.	168	2	1,2	pH 7,2	
BaP + TPA	312	20	6,4 ^b	20% SVF 200 cibles 6.10 ⁴ nourricières	
contrôle	500	0	0		Rivedal et Sanner, 1990
BaP 0,05/3 j.	500	2	0,4		
TPA 0,05/4 j.	200	8	4 ^b		
BaP + TPA	304	69	22,7 ^b		
contrôle	2001	1	<0,1		nos résultats
BaP 0,05/3 j.	1176	6	0,5 ^b		
TPA 0,05/5 j.	936	20	2,1 ^b		
BaP + TPA	1386	150	10,8 ^b		
contrôle	3254	4	0,1		nos résultats
BaP 0,1/1 j.	2950	31	1 ^b	pH 7,0	
TPA 0,1/6 j.	2573	43	1,7 ^b	15% SVF	
BaP + TPA	1475	48	3,3 ^b	200 cibles 4.10 ⁴ nourricières	
contrôle	2917	11	0,4		nos résultats
BaP 1/7 j.	1130	14	1,2 ^b		
contrôle	920	23	2,5	pH 6,7	nos résultats
BaP 1/7 j.	805	53	6,6 ^b	20% SVF 150 cibles 4.10 ⁴ nourricières	

^a taux de transformation correspondant au nombre de colonies transformées/nombre de colonies totales x 100.

^b valeur significativement différente du contrôle correspondant ($P < 0,05$).

Deux modifications du protocole décrit par DiPaolo *et al.* (1969) ont été suggérées pour augmenter la sensibilité de l'essai :

- (i) la première est basée sur l'utilisation d'un traitement séquentiel des cellules par un initiateur et un promoteur de manière à détecter les interactions éventuelles entre cancérogènes et à mettre en évidence les cancérogènes non-génotoxiques,
- (ii) la seconde consiste à diminuer le pH du milieu.

♦ Essai de transformation morphologique des cellules SHE : potentiel cancérogène, initiateur et/ou promoteur d'un composé (d'après Cruciani *et al.*, annexe I, publication 5).

A titre d'exemple, nous citerons :

- les résultats obtenus après exposition de cellules SHE à un hydrocarbure aromatique polycyclique, DMBA,
- l'effet transformant du BaP appliqué aux cellules SHE seul ou séquentiellement avec le cancérogène non-génotoxique qu'est le TPA (figure 3).

Le tableau 3 présente les résultats obtenus avec le DMBA par DiPaolo *et al.* (1969) et Tu *et al.* (1986).

Il est à noter la fréquence de Tf maximale observée par Tu *et al.* (1986) au cours d'une étude inter-laboratoires est de 3,3% avec des doses de DMBA comprises entre 0.04 et 0,3 µg/ml alors qu'en utilisant 0,1 µg/ml de DMBA, DiPaolo *et al.* (1969) obtiennent 16,9% de transformation. Ceci souligne que les résultats quantitatifs observés avec cet essai dépendent beaucoup des conditions expérimentales utilisées et, en particulier, de la qualité et de la quantité de sérum de veau foetal (SVF) ajouté au milieu de culture.

Ces résultats confirment d'autre part la très faible fréquence de transformation spontanée observée avec les cellules SHE qui permet d'obtenir des résultats significativement positifs même avec un petit nombre de colonies transformées.

Le protocole "d'initiation/promotion" consiste à traiter les cellules en premier lieu par le BaP (pendant 1 à 3 jours) puis par le TPA (de 3 à 6 jours).

Le tableau 4 met en évidence l'intérêt d'un tel protocole : l'induction de la Tf des cellules est plus forte lorsque l'action initiatrice du BaP est suivie par celle, promotrice, du TPA. De plus, les cellules SHE sont sensibles à l'effet transformant du TPA, démontrant ainsi la valeur de cet essai de transformation morphologique dans le cadre de l'évaluation du potentiel transformant de substances chimiques. D'autres produits, connus comme cancérogènes non-génotoxiques se sont avérés capables de transformer les cellules SHE et de potentialiser les effets d'autres cancérogènes (Bessi *et al.*, 1994, 1995).

Tableau 5. Conséquences de l'utilisation de milieu acide sur les cellules SHE ou l'essai de transformation morphologique.

Conséquences	Réf.
- pas d'effet sur l'efficacité de clonage - augmentation de la prolifération cellulaire : les colonies sont plus grosses - altération de la morphologie des colonies	LeBoeuf et Kerckaert, 1986
diminution de la dépendance vis-à-vis du lot de cellules	LeBoeuf et Kerckaert, 1987
diminution de la variabilité inter-laboratoires : l'utilisation de lots de cellules et de sérum différents entraînent moins de variations dans la réponse obtenue qu'à pH 7,35	LeBoeuf <i>et al.</i> , 1989
augmentation de la fréquence de passage des cellules du stade "transformé" au stade "immortel"	LeBoeuf <i>et al.</i> , 1990
inhibition des communications intercellulaires	Ruch <i>et al.</i> , 1990
diminution du pH intracellulaire (pH _i)	LeBoeuf <i>et al.</i> , 1992
le passage du pH de 7,3 à 6,7 entraîne : - la perte de l'expression de 7 protéines et l'expression de 2 nouvelles ^a - le changement de charge d'une protéine cellulaire majeure ^a - la perte d'une tyrosine phosphorylation et le gain de deux sérine/thréonine phosphorylations ^a - la réduction importante de l'ARNm de la Cx43	Isfort <i>et al.</i> , 1992a
la diminution du pH _i provoque des modifications au niveau cellulaire : - phosphorylation de certaines protéines ^a - accumulation des ARN messagers de <i>c-myc</i> et <i>c-fos</i> - activation de la synthèse protéique	Isfort <i>et al.</i> , 1993
la diminution du pH _i augmente aussi les effets mitogènes du facteur de croissance EGF	
inhibition de la différenciation des cellules et augmentation de leur durée de vie (nombre de doublements avant sénescence)	Kerckaert <i>et al.</i> , 1996
les cellules les plus sensibles à la transformation dans la population cellulaire hétérogène que constituent les SHE sont les moins différenciées	Isfort <i>et al.</i> , 1996b

^a ces modifications ont été mises en évidence à l'aide d'expériences de marquage/migration des protéines, les résultats obtenus sont globaux et ne conduisent pas à l'identification de la fonction des protéines concernées.

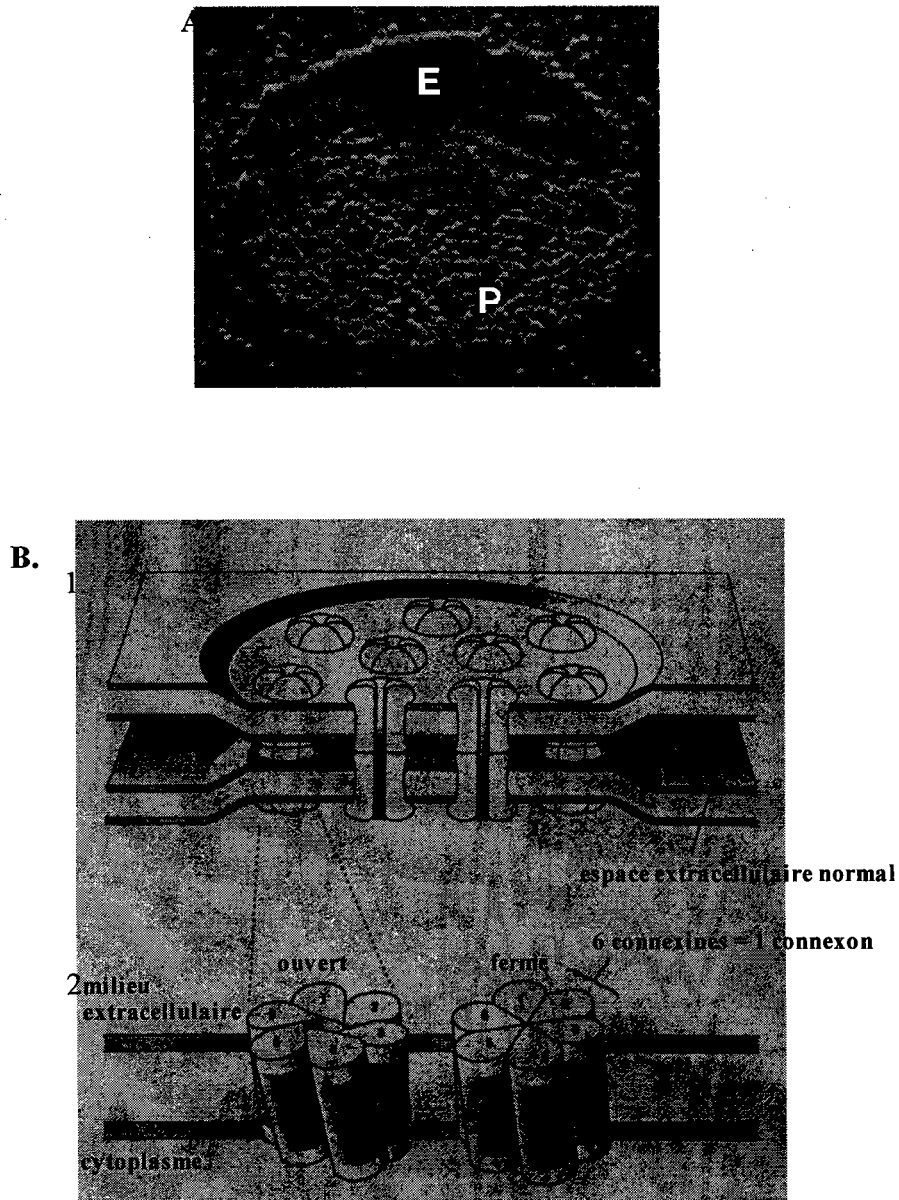


Figure 4. A. Profil d'une plaque jonctionnelle. Photographie de l'empreinte d'une "freeze fracture". Les surfaces qui correspondent aux trous laissés par les connexines (E) ainsi que les particules intra-membranaires (P) sont visibles. x 146.000.

B. Vue schématique des connexons et des plaques jonctionnelles. Les connexons de cellules adjacentes interagissent pour former des canaux intercellulaires (1). Chaque connexon est constitué de l'assemblage de six connexines (2) (d'après Bruzzone *et al.*, 1996).

♦ Essai de transformation morphologique des cellules SHE : réduction de la concentration en bicarbonate du milieu.

L'ajout de 0,75 g de NaHCO_3 par litre de milieu conduit, lorsque le milieu est incubé dans une atmosphère contenant 10% de CO_2 , à un pH de 6,7 ; avec 2,2 g/l de NaHCO_3 le pH est de 7,0 et avec 3,7 g/l le pH est de 7,35.

En 1986, LeBoeuf et Kerckaert ont proposé d'augmenter la sensibilité de l'essai en diminuant le pH du milieu d'essai. En effet, une application de BaP (1 $\mu\text{g/ml}$) induit 1,2 et 6,6% de Tf à pH 7,0 et 6,7 respectivement (tableau 4).

LeBoeuf et ses collaborateurs (références dans le tableau 5) ont étudié les conséquences de l'utilisation de milieu acide sur les cellules SHE et leur transformation morphologique. Selon cette équipe, une telle diminution du pH du milieu offre des avantages tels que l'augmentation de la sensibilité du test, la diminution de la dépendance vis-à-vis des lots de sérum et de cellules ou encore la diminution de la subjectivité de la lecture (tableau 5). Nous remarquons toutefois que le taux de Tf spontanée est supérieur à pH acide : 2,5% à pH 6,7 contre 0,4% à 7,0 (tableau 4).

D.2. Communications intercellulaires.

La croissance et le comportement de toute cellule dans un tissu dépendent de son microenvironnement. Les cellules communiquent entre elles par deux voies principales.

- ♦ La première utilise des molécules extracellulaires comme les hormones ou les facteurs de croissance. L'altération de ces communications est impliquée dans le processus de cancérogénèse ; d'ailleurs, de nombreux oncogènes codent pour des facteurs de croissance ou leur récepteurs.
- ♦ La seconde se fait par contact direct entre les cellules, elle est plus difficile à étudier (Yamasaki, 1990).

a. Structure et formation des jonctions "gap".

Le transfert d'ions et de petites molécules d'une cellule à la cellule voisine est rendu possible grâce à la juxtaposition de deux demi-canaux traversant les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. De multiples canaux de ce type s'aggrègent sur le plan de la membrane plasmique pour former des plaques jonctionnelles de type "gap" ("gap junction plaques"). Chaque demi-canal, appelé connexon, est constitué de six sous-unités protéiques, les connexines (figure 4) qui sont des protéines intégrales de la membrane plasmique synthétisées dans pratiquement tous les types cellulaires. Une autre hypothèse est que les connexons seraient des hexamères de ductine (Finbow et Pitts, 1993). Nous nous attacherons particulièrement à la description des molécules de connexine qui semblent être les constituants majeurs des jonctions de type "gap". Chez les vertébrés, les rares cellules ne produisant pas ces protéines sont les cellules musculaires striées adultes, quelques neurones, les spermatozoïdes et les cellules sanguines (Beyer *et al.*, 1990 ; Bennett *et al.*, 1991 ;

Tableau 6. Caractéristiques des connexines isolées chez les mammifères (d'après Meda, 1996).

Nom ^a	Gène ^b	Poids moléculaire (kDa)	Distribution cellulaire ^c
Cx26	β	26,5	hépatocytes, cellules sécrétrices de glandes endocrines et exocrines, certains kératinocytes, cellules de l'épithélium intestinal
Cx30	β	30,3	?
Cx30,3	β	30,4	cellules des blastocystes, certains kératinocytes
Cx31	β	31	certaines kératinocytes, cellules du trophoctoderme placentaire
Cx31,1	β	31,1	certaines kératinocytes, cellules des épithéliums stratifiés
Cx32	β	32	hépatocytes, cellules sécrétrices des glandes exocrines, certains neurones, oligodendrocytes, cellules de Schwann
Cx33	α	32,9	quelques cellules testiculaires
Cx37	α	37,6	certaines cellules endothéliales, certains kératinocytes, cellules musculaires cardiaques
Cx40	α	40	certaines cellules endothéliales, cellules du système de conduction cardiaque
Cx43	α	43	cellules musculaires cardiaques, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices des glandes endocrines, certains kératinocytes
Cx45	α	45	cellules musculaires cardiaques, cellules épithéliales du poumon, certains kératinocytes
Cx46	α	45,6	fibres du cristallin, cellules musculaires cardiaques
Cx50	α	49,6	fibres du cristallin, cellules épithéliales de la cornée

^a nomenclature : les connexines sont distinguées par leur masse moléculaire.

^b les 13 gènes dérivent d'une seule séquence qui a subi au moins deux duplications au cours de l'évolution. Ces duplications ont permis la divergence de deux groupes de protéines : le groupe α et le groupe β.

^c cette liste ne se veut pas exhaustive, elle ne donne en fait que quelques exemples de cellules synthétisant chaque connexine dans le but d'illustrer la distribution complexe de ces protéines.

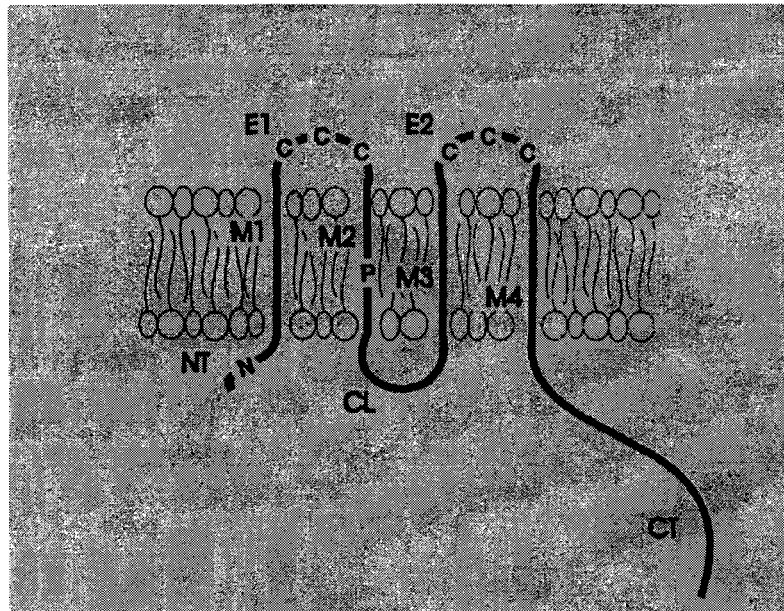


Figure 5. Représentation schématique et topologie d'une connexine dans la membrane plasmique (d'après Bruzzone *et al.*, 1996).

La molécule comporte 4 régions transmembranaires (M1-M4), deux boucles extracellulaires (E1 et E2) contenant des résidus cystéine caractéristiques et trois portions cytoplasmiques : les domaines amino (NT) et carboxy (CT) terminaux et la boucle cytoplasmique centrale (CL).

Meda, 1996). A ce jour, treize connexines (Cx) distinctes ont été identifiées chez les mammifères (tableau 6).

Toutes les connexines ont leurs extrémités amino et carboxyterminales dans le cytoplasme et comportent quatre portions hydrophobes reliées les unes aux autres par une boucle cytoplasmique et deux boucles extracellulaires (figure 5). Les connexines de différentes espèces ont une structure primaire particulièrement bien conservée, surtout au niveau de l'extrémité aminoterminal, des segments transmembranaires et des boucles extracellulaires qui comportent 30 à 50% d'analogie. Chacune de ces boucles contient, notamment, trois résidus cystéine formant des liaisons dissulfure intramoléculaires qui pourraient être nécessaires à la stabilisation de la structure tertiaire de la protéine (Rahman *et al.*, 1993). Les treize connexines diffèrent considérablement entre elles en ce qui concerne la boucle cytoplasmique et l'extrémité carboxyterminale, cette variabilité peut être impliquée dans la régulation de la formation et de la perméabilité jonctionnelles (Beyer *et al.*, 1990 ; Bennett *et al.*, 1991 ; Kumar et Gilula, 1996).

Les connexines s'assemblent en connexons au niveau de l'appareil de Golgi (Musil et Goodenough, 1993). Les connexons sont incorporés dans la membrane plasmique après fusion des vésicules golgiennes (Musil et Goodenough, 1991).

La reconnaissance entre connexons opposés est déterminée par la structure de leurs domaines extracellulaires et par le type de connexine (Haubrich *et al.*, 1996). L'assemblage des demi-canaux en canaux fonctionnels dépend de la présence de molécules Ca^{2+} -dépendantes impliquées dans l'adhésion cellulaire telle que la E-cadhérine (Jongen *et al.*, 1991).

Le devenir des jonctions "gap" est obscur, elles ne semblent pas être recyclées vers la membrane plasmique, mais dégradées. Cette dégradation a peut-être lieu par internalisation des jonctions sous forme de "jonctions annulaires" et digestion dans le cytoplasme par des lysosomes ou protéasomes. Un autre mécanisme proposé est l'action directe de protéasomes sur les connexines intégrées dans la membrane plasmique (Laird, 1996).

Les connexines ont une demi-vie particulièrement courte : 1,5 à 5 heures (Laird *et al.*, 1995 ; Laird, 1996). Ceci rend ce type de communications intercellulaires d'autant plus sensible à toute perturbation de la synthèse des connexines ou de leur assemblage.

Les canaux jonctionnels formant les jonctions "gap" sont perméables à de nombreuses molécules d'un poids moléculaire inférieur à 1000 daltons et d'un diamètre maximal d'environ 1,5-2 nm. Cette limitation de taille implique que de nombreux ions et petites molécules puissent passer, mais que des macromolécules comme les protéines et les acides ribonucléiques ne le peuvent pas.

Une fonction des communications intercellulaires *via* les jonctions “gap” (GJIC) est le maintien de l’homéostasie tissulaire (Loewenstein, 1979). Des fonctions plus spécifiques ont également été montrées dans certains types cellulaires :

- ♦ synchronisation rapide d’une population cellulaire dans un tissu par l’échange de molécules entre cellules stimulées ou non par les hormones (Lawrence *et al.*, 1978),
- ♦ intervention dans l’embryogénèse (Lo, 1996).

b. Régulation de la perméabilité jonctionnelle.

La diminution ou l’absence de GJIC peut résulter de changements dans l’expression des connexines pendant la transcription et la traduction, d’altérations des processus post-traductionnels, d’altérations de l’assemblage des connexons ou de leur insertion dans la membrane plasmique.

♦ Modulation rapide des GJIC.

Les canaux jonctionnels passent rapidement du stade ouvert au stade fermé et *vice versa*, ainsi, l’état fonctionnel des jonctions “gap” dépend de la fraction de temps que chaque canal passe dans chaque stade. Les changements rapides de perméabilité, appelés “gating”, semblent dus à des modifications conformationnels ou covalentes des connexines (Sáez *et al.*, 1993).

Un des modes de “gating” est la fermeture partielle ou totale des canaux jonctionnels par torsion des six sous-unités du connexon. Les molécules de phénylalanine hydrophobes présentes dans la troisième séquence transmembranaire (M3) tapissent alors l’intérieur du canal, provoquant le blocage de tout transport aqueux. La cinétique d’un tel “gating” est de l’ordre de la milliseconde (Holder *et al.*, 1993).

Les concentrations intracellulaires en ions H^+ et Ca^{2+} affectent aussi la perméabilité jonctionnelle. Des quantités élevées de ces ions réduisent le nombre de canaux ouverts. Dans le cas du Ca^{2+} , ces effets semblent être dus à des interactions entre les connexines et des protéines calcium-activées telle que la calmoduline (Sáez *et al.*, 1993).

♦ Phosphorylation.

La phosphorylation semble être l’un des principaux modes de régulation des GJIC (Sáez *et al.*, 1993). Les connexines sont généralement des phosphoprotéines ou contiennent, dans leur séquence, des sites potentiels de phosphorylation, principalement au niveau de leur extrémité carboxyterminale.

Il est probable que la phosphorylation de résidus sérine après insertion des connexons dans la membrane soit nécessaire à l’obtention de Cx43 fonctionnelle (Musil et Goodenough, 1991).

La plupart des traitements qui activent les kinases affectent les GJIC ; par exemple, la phosphorylation de la Cx43 par la PKC provoque une diminution de la perméabilité jonctionnelle alors que la phosphorylation de la Cx32 par la protéine kinase A (PKA) augmente les GJIC (Holder *et al.*, 1993). La PKA induit également une augmentation des GJIC dans les cellules exprimant la Cx43, mais c'est plus probablement par une activation de l'expression du gène de la Cx43 que par sa phosphorylation (Mehta *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que certaines connexines (telles que la Cx26) ne sont pas phosphorylables, d'où l'existence d'autres mécanismes de régulation (Ruch, 1994).

♦ Autres modes de régulation des GJIC.

La perturbation de la fluidité membranaire peut entraîner une inhibition temporaire des GJIC. Ainsi, certains anesthésiques auraient accès à la plupart des compartiments tissulaires et pourraient provoquer des perturbations membranaires dans divers tissus y compris les neurones où ils causeraient des interruptions sensorielles réversibles (Holder *et al.*, 1993).

Il semble, d'autre part, que l'expression des gènes des connexines et l'assemblage des connexons puissent être altérés par des éléments de la matrice extracellulaire et des molécules de l'adhésion cellule-cellule comme les cadhérines (Jansen *et al.*, 1996b,c).

c. Pathologies associées à l'altération des GJIC.

Compte tenu des fonctions cellulaires importantes des connexines, il est concevable que des altérations du couplage jonctionnel soient impliquées dans diverses maladies. Nous citerons deux maladies humaines dues à des mutations au niveau des gènes codants pour la Cx32 et la Cx43.

♦ La maladie de Charcot-Marie et Tooth, est liée à des mutations ponctuelles de la molécule de Cx32 qui entraînent une dégénérescence de la myéline des nerfs périphériques (Bergoffen *et al.*, 1993).

♦ Le syndrome d'Ivemark constituant un ensemble hétérogène et le plus souvent sévère de malformations cardiaques et abdominales, est lié à des altérations du développement embryonnaire dues à des mutations ponctuelles de la Cx43 (Britz-Cunningham *et al.*, 1995).

d. GJIC et cancer.

L'altération des GJIC est souvent liée à la cancérogénicité ; en effet, les cellules transformées ont moins de jonctions "gap" que les cellules normales (Enomoto et Yamasaki, 1985) et leur croissance est inhibée par leur contact avec des cellules normales (Mehta *et al.*, 1986 ; Esinduy *et al.*, 1995). Les effets de nombreuses substances vis-à-vis de ces communications intercellulaires ont été étudiés.

Tableau 7. Effets inhibiteurs de cancérogènes non-génotoxiques sur les GJIC (d'après Budunova, 1994).

Cancérogènes non-génotoxiques	Effet inhibiteur sur les GJIC ^a	Type de cellules
TPA et autres esters de phorbol	fort	V79, CHO, fibroblastes humains et de rongeurs, lignées cellulaires hépatiques de rat, lignées kératinocytaires murines, etc.
mézérene	fort	V79, lignées kératinocytaires et fibroblastiques murines
pesticides organochlorés	fort	V79, hépatocytes, fibroblastes, cellules pulmonaires et gliales
biphényles polyhalogénés	modéré	V79, lignées hépatocytaires, kératinocytes
acides gras insaturés	faible	V79, lignées hépatocytaires
acides biliaires	faible	V79
phénobarbital	faible	V79, hépatocytes, kératinocytes, lignées hépatocytaires
hydroxyanisole butylé	modéré	V79, fibroblastes
hydroxytoluène butylé	modéré	V79, fibroblastes, hépatocytes
aplysiatoxine	fort	V79
téléocidine	fort	V79, fibroblastes
condensé d'asphalte	modéré	V79, kératinocytes
condensé de fumée de cigarette	modéré	V79, fibroblastes, cellules musculaires

^a inhibition des CIJG dans des essais *in vitro* à court terme.

♦ Effets des agents génotoxiques sur les GJIC.

32% (6/19) des cancérogènes génotoxiques étudiés affectent les GJIC, seuls certains agents génotoxiques sont donc capables d'induire des mutations sur les gènes codants pour les connexines (Budunova et Williams, 1994).

♦ GJIC au cours des étapes de promotion et de progression tumorale.

De nombreuses études ont montré la capacité de cancérogènes non-génotoxiques à inhiber les GJIC *in vivo* et *in vitro* : les substances citées dans le tableau 7 inhibent les communications intercellulaires dans différentes lignées cellulaires et cellules primaires en culture. Ces corrélations ont mené à l'hypothèse qu'un blocage des communications a lieu entre cellules normales et initiées au cours de la promotion tumorale, permettant l'expansion clonale des cellules néoplasiques (Yamasaki *et al.*, 1987 ; Trosko *et al.*, 1990).

D'autres données confirment cette hypothèse :

- ♦ certains inhibiteurs de la cancérogénèse (AMPc, rétinoïdes, caroténoïdes et glucocorticoïdes) augmentent les GJIC, empêchant même l'inhibition induite par le TPA (Hossain *et al.*, 1989),
- ♦ l'inhibition des GJIC semble être corrélée avec une inhibition de l'apoptose (Trosko et Goodman, 1994),
- ♦ l'inhibition des GJIC est liée à des étapes plus tardives du développement tumoral : les cellules cancéreuses à fort potentiel métastatique communiquent moins que celles dont le potentiel est faible (Nicolson, 1987 ; Nicolson *et al.*, 1988 ; Kamibayashi *et al.*, 1995),
- ♦ la transfection de Cx43 ou Cx32 dans des cellules transformées dénuées de connexines provoque la diminution de la croissance de ces cellules, les gènes des connexines peuvent ainsi être considérés comme des gènes suppresseurs de tumeur (Budunova, 1994).

♦ Oncogènes et facteurs de croissance.

L'effet des oncogènes sur les GJIC a été montré en infectant les cellules d'une lignée établie par le virus du sarcome de Rous porteur de l'oncogène *v-src* codant pour une tyrosine kinase associée à la membrane plasmique. 15 min après le début de la réplication du virus, les GJIC diminuent de moitié, vraisemblablement par phosphorylation de la Cx43 qui entraîne la fermeture des canaux. *v-src* affecterait donc les GJIC au niveau post-traductionnel. D'autres oncogènes tels que *ras*, *raf*, *mos*, ou *neu*, inhibent aussi les GJIC (Yamasaki, 1990 ; Brissette *et al.*, 1991).

Parmi les facteurs de croissance qui ont un effet sur les GJIC, les plus étudiés sont EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) et TGF- β (transforming growth factor β). Dans les lignées NRK et BALB/c-3T3, EGF et PDGF inhibent les GJIC. Un mécanisme possible pour expliquer l'effet de ces facteurs de croissance est la phosphorylation des connexines par la kinase cytoplasmique activée par les

récepteurs de EGF et PDGF : la kinase MAP. TGF- β induit des effets variables selon le type cellulaire : inhibition des GJIC dans les cellules NRK, les kératinocytes humains et les cellules bronchiques humaines normales et activation des GJIC dans les cellules NIH-3T3 et les cellules bronchiques humaines transformées (Budunova, 1994 ; Budunova et Williams, 1994).

Ces résultats indiquent que l'inhibition des GJIC est un événement critique de la cancérogénèse, ainsi l'étude des GJIC a été proposée pour la détection de cancérogènes. La corrélation entre inhibition des GJIC et induction de la transformation cellulaire n'est néanmoins pas systématique :

- ♦ l'acide rétinolique, un activateur des GJIC et inhibiteur de la transformation des cellules BALB/c-3T3 et C3H10T $\frac{1}{2}$, diminue les communications intercellulaires des cellules SHE et BPNi (lignée cellulaire dérivée des cellules SHE particulièrement sensible au TPA ; Rivedal et Sanner, 1992),
- ♦ des substances comme l'acide okadaïque, le facteur de croissance TGF- β et la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, n'inhibent pas les GJIC bien qu'induisant la transformation des cellules BALB/c-3T3 et C3H10T $\frac{1}{2}$ (Yamasaki, 1990),
- ♦ El-Sabban et Pauli (1991) ont mis en évidence une diminution de la perméabilité jonctionnelle dans le processus d'invasion métastatique.

Nous retiendrons de l'ensemble de ces études que, s'il existe des exceptions à la relation GJIC-cancérogénèse, l'inhibition des GJIC favorise en général la cancérogénicité et constitue un critère qui peut être valablement exploité pour la détection in vitro des propriétés cancérogènes.

d. Techniques d'étude des GJIC.

Les principales méthodes pour l'évaluation de la perméabilité jonctionnelle sont les essais d'inhibition de la coopération métabolique et les essais basés sur le transfert d'un colorant. Ces deux techniques ont particulièrement été utilisées pour l'étude de l'effet de cancérogènes non-génotoxiques qui agissent davantage sur les GJIC que les cancérogènes génotoxiques.

♦ Coopération métabolique.

Le phénomène de transfert entre cellules de petites molécules agissant sur la croissance et la division cellulaire est appelé coopération métabolique (CM). La CM a d'abord été évaluée grâce au transfert d'un métabolite toxique vers des cellules de la lignée fibroblastique V79 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase déficientes (HGPRT⁻) cocultivées avec les mêmes cellules métaboliquement compétentes (HGPRT⁺). Le métabolite toxique, produit par phosphoribosylation d'une purine synthétique dans les cellules HGPRT⁺ est transféré dans les HGPRT⁻ *via* les jonctions "gap" et provoque leur

Tableau 8. Analyse comparative des résultats obtenus avec les essais d'inhibition de la coopération métabolique et les essais de transfert de colorant (d'après Budunova et Williams, 1994).

	Coopération métabolique	Transfert de colorant
nombre total de composés étudiés	270	115
nombre total de composés inhibiteurs des GJIC	149	51
nombre total de composés activateurs des GJIC	4	15
nombre de composés reconnus promoteurs de tumeurs <i>in vivo</i>	55	40
nombre de promoteurs de tumeurs qui inhibent les GJIC	35	25
sensibilité de l'essai ^a	63,6%	62,5%

^a nombre de promoteurs inhibant les communications/nombre total de promoteurs x 100.

mort. Selon le protocole utilisé, la purine synthétique peut être de la 6-thioguanine (6-TG, Yotti *et al.*, 1979) ou le mélange "HAT" : hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (Guy *et al.*, 1981).

Plus de 300 substances ont été testées à l'aide des essais d'inhibition de la CM. Un potentiel promoteur est reconnu *in vivo* pour 55 de ces substances. La sensibilité de l'essai est de 63,6% ; en effet 35 de ces 55 composés provoquent une inhibition de la coopération métabolique des cellules V79 (tableau 8 ; annexe III ; Budunova et Williams, 1994).

♦ Transfert de colorant

Le colorant fluorescent le plus utilisé pour les essais de transfert de colorant (TC) est le jaune de Lucifer. Les essais de TC diffèrent par la manière dont le colorant est introduit dans les cellules donneuses :

- ♦ par injection à l'aide d'une microseringue (Yamasaki *et al.*, 1984 ; Rivedal *et al.*, 1985),
- ♦ par absorption à travers une blessure de la cellule ("scrape loading" ; Budunova et Williams, 1994).

Des variantes des méthodes de microinjection ont été proposées comme :

(i) l'exposition des cellules en suspension à la substance testée, puis leur mise en culture en forte densité de manière à étudier la formation des jonctions "gap" au cours de l'adhésion, puis de la croissance des cellules (Mikalsen, 1990),

(ii) la microinjection du jaune de Lucifer dans un échantillon du foie d'un rat préalablement exposé au produit testé (Krutovskikh *et al.*, 1991).

L'essai le plus largement utilisé est la microinjection de jaune de Lucifer. Les types cellulaires sont variés : BALB/c-3T3, C3H10T½, BPNi, SHE, etc. 40 des 115 substances étudiées ont un potentiel promoteur reconnu *in vivo*. La sensibilité des essais de microinjection est de 62,5% puisque 25 de ces promoteurs inhibent le transfert de colorant (tableau 8 ; annexe III ; Budunova et Williams, 1994).

D'autre part, de nombreuses substances inhibitrices de la cancérogénèse se sont révélées capables d'augmenter le transfert de colorant telles que l'AMPC, les rétinoïdes ou les caroténoïdes (Enomoto *et al.*, 1984 ; Hossain *et al.*, 1989 ; Budunova et Williams, 1994).

♦ Comparaison des deux types de méthodes.

L'annexe III présente la liste des produits dont l'activité *in vivo* est connue et dont les effets sur les GJIC ont été évalués par la CM ou le TC.

Il semble que coopération métabolique et transfert de colorant aient des sensibilités similaires vis-à-vis des cancérogènes non-génotoxiques (63,6 et 62,5% respectivement). En ce qui concerne les 34 produits testés avec les deux méthodes, les résultats s'accordent dans

73,5% des cas. La corrélation est particulièrement bonne pour les esters de phorbol et les pesticides organochlorés. Les différences observées s'expliquent par le fait que les critères évalués ne sont pas identiques. Les essais d'inhibition de la coopération métabolique traduisent en effet l'action d'un cancérigène non-génotoxique sur la formation des jonctions "gap" alors que les méthodes basées sur le transfert de colorant évaluent la fonctionnalité de jonctions "gap" préexistantes (sauf modifications du protocole).

E. Conclusion.

La cancérogénèse est un processus complexe qui implique de nombreux mécanismes différents et dont le résultat est l'expansion clonale de cellules initiées.

Comme nous l'avons constaté, 80% des cancérogènes se sont montrés à même d'induire la transformation des cellules SHE. D'autre part, 62% des substances cancérogènes non-génotoxiques utilisés dans le cadre de l'étude des communications intercellulaires se sont révélés inhibitrices des GJIC. Les systèmes in vitro développés ici semblent donc capables de mettre en évidence le potentiel cancérogène de nombreuses substances, génotoxiques ou non.

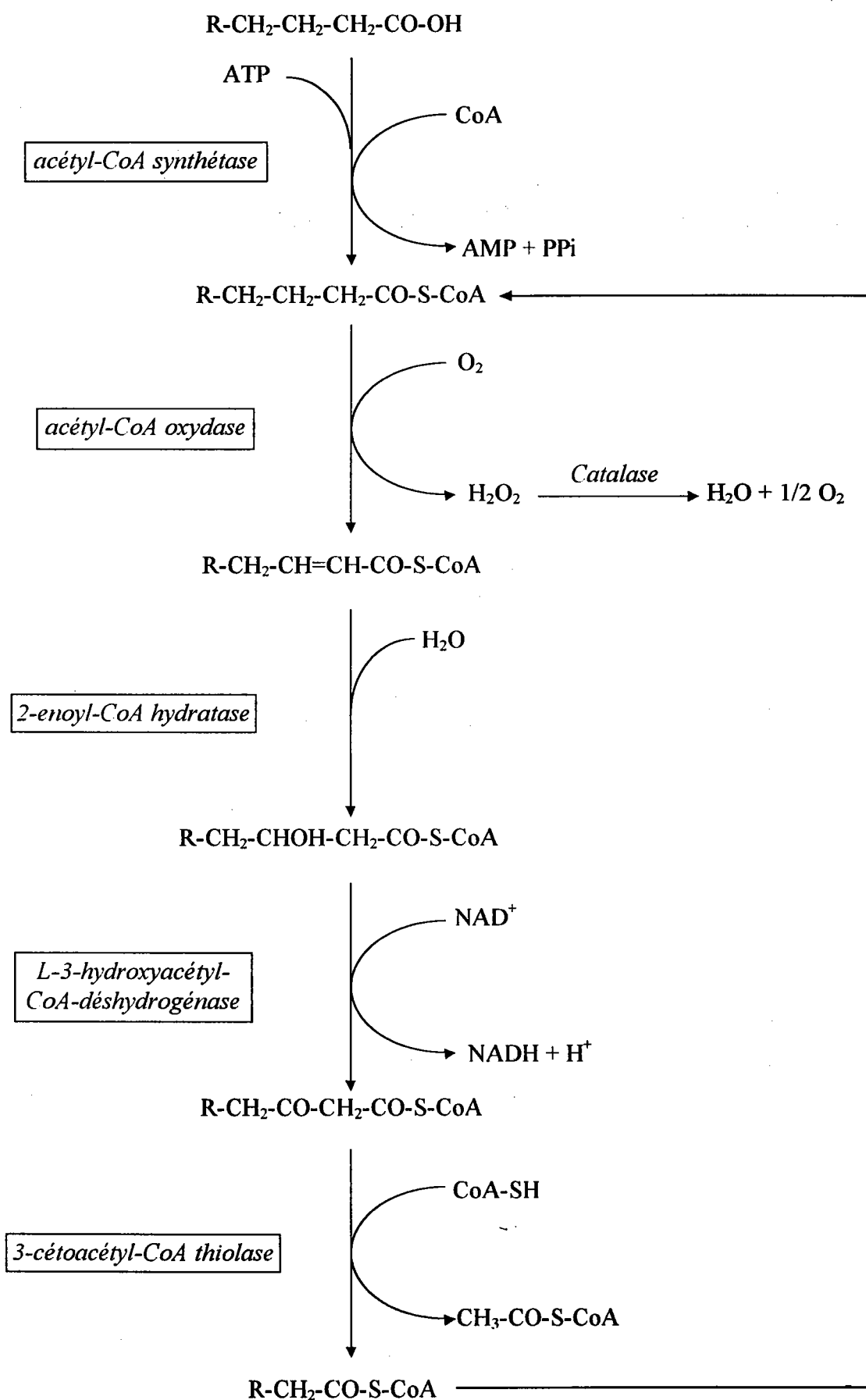


Figure 6. Cycle de la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes (d'après Mannaerts et Van Veldhoven, 1993).

II. LES PROLIFÉRATEURS DES PEROXYSOMES HÉPATIQUES.

Les proliférateurs des peroxysomes hépatiques (HPPs) constituent une classe particulière de cancérogènes chez les rongeurs puisqu'ils sont hépatocancérogènes et ne semblent pas avoir d'activité génotoxique (ECETOC).

A. Caractéristiques de la prolifération peroxysomale.

La prolifération peroxysomale peut être définie comme un processus cellulaire caractérisé par une augmentation de la densité et du volume des peroxysomes et de leur activité β -oxydative.

A.1. Les peroxysomes et la β -oxydation peroxysomale.

Les peroxysomes sont des organites cytoplasmiques limités par une seule membrane, ils sont présents dans les cellules eucaryotes, les champignons et les protozoaires. Dans certains types cellulaires, la matrice finement granulaire des peroxysomes peut contenir des inclusions cristalloïdes telles que le corps nucléoïde constitué d'urate oxydase et présent dans les hépatocytes de rat. Les peroxysomes constituent environ 2% du volume cytoplasmique total et contiennent des enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que de la catalase dont la fonction est de décomposer H_2O_2 (Reddy et Lalwani, 1983 ; Mannaerts et Van Veldhoven, 1993).

La fonction principale attribuée aux peroxysomes est la métabolisation des lipides par la β -oxydation des acides gras saturés présentée dans la figure 6. La première oxydation est catalysée par une acétyl-CoA oxydase qui réduit une molécule d'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Cette oxydase est l'enzyme limitante du cycle ; elle est induite, particulièrement au niveau hépatique, chez les rongeurs traités par des HPPs. Les deux étapes suivantes de la β -oxydation (hydratation et déshydrogénation) sont assurées par une enzyme bifonctionnelle également inductible par les proliférateurs des peroxysomes.

Les acides gras sont dégradés dans les peroxysomes et dans les mitochondries *via* des réactions identiques conduisant à la formation des mêmes acétyl-CoA intermédiaires. Malgré cette similitude, les deux systèmes diffèrent à plusieurs niveaux :

- ♦ les enzymes qui catalysent les réactions successives ne sont pas les mêmes ; par exemple, la première oxydation est assurée par une acétyl-CoA déshydrogénase et non par une oxydase dans les mitochondries,
- ♦ la β -oxydation peroxysomale n'est pas couplée à un système de production d'énergie ; ainsi, l'énergie libérée pendant la première oxydation (production d' H_2O_2) est perdue sous forme de chaleur,

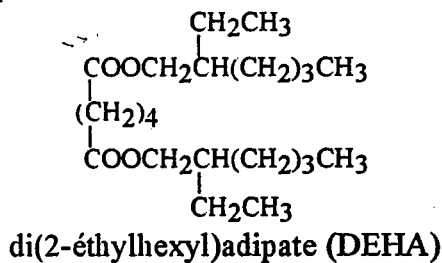
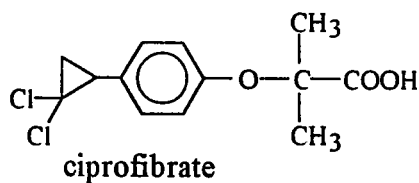
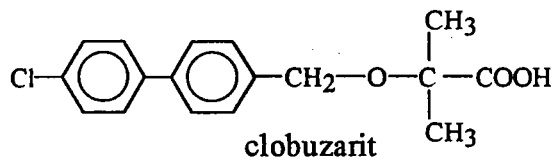
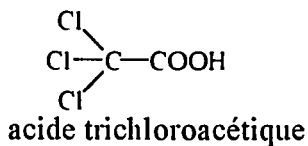
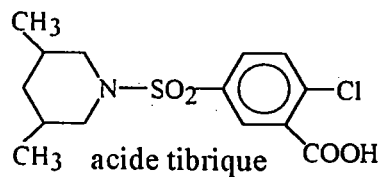
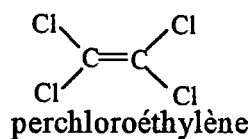
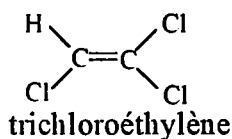
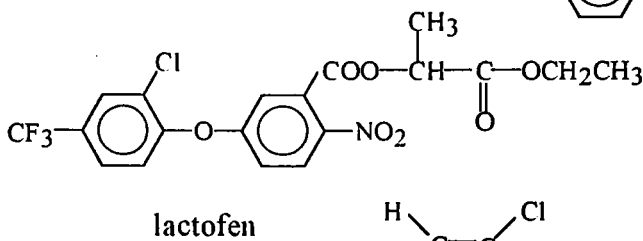
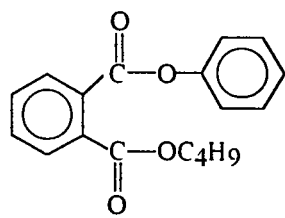
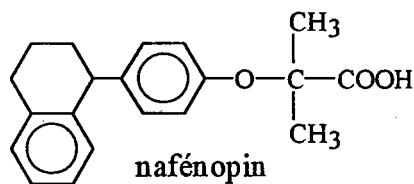
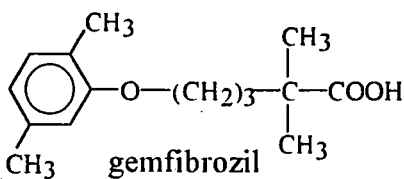
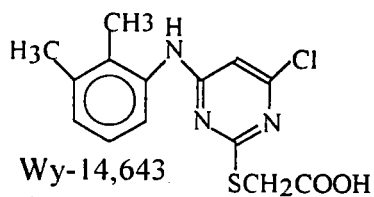
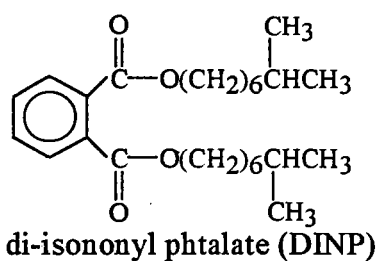
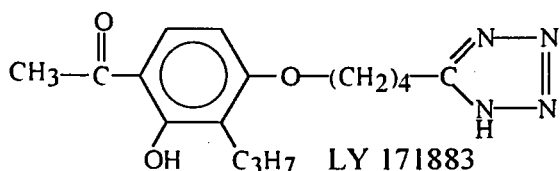
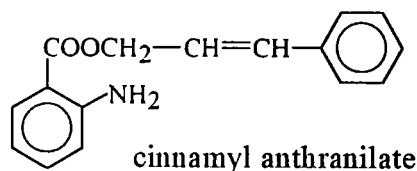
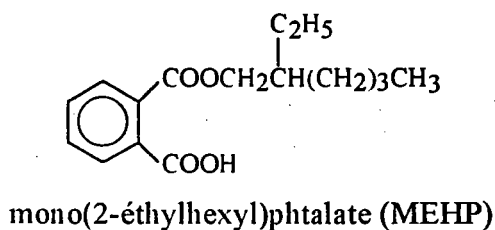
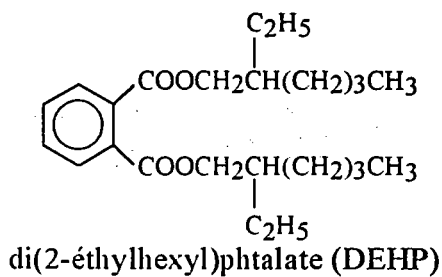
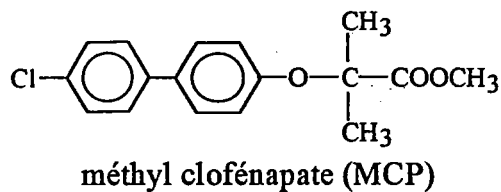
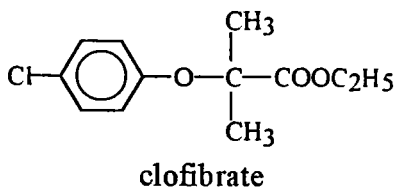


Figure 7. Structure de quelques proliférateurs des peroxysomes.

Tableau 9. Exemple de composés chimiques qui provoquent la prolifération peroxysomale dans le foie des rongeurs (d'après Lake et Lewis, 1993).

Catégorie	Exemples
agents thérapeutiques	acide acétylsalicylique, bezafibrate, bifonazole, ciprofibrate, clobuzarit, clofibrate, DL-040, fénofibrate, gemfibrozil, LY 171883, méthyl clofénapate, nafénopin, tiadénol, Wy-14,643
stéroïdes	déhydroepiandrosterone
herbicides	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, fomesafen, lactofen, acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
agents plastifiants	di(2-éthylhexyl)adipate (DEHA), di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP), di(2-éthylhexyl)terephthalate, di(isodecyl)phtalate, di(isononyl)phtalate, tri(2-éthylhexyl)trimellitate
solvants et produits industriels	paraffines chlorées, acide perfluoro- <i>n</i> -octanoïque, tétrachloroéthylène, trichloroéthylène
arômes alimentaires et produits naturels	cinnamyl anthranilate, citral, linalol

Tableau 10. Effets résultant de la prolifération peroxysomale dans le foie de rat et de souris (d'après Lake et Lewis, 1993).

Poids hépatique

- grossissement dû à une hyperplasie et une hypertrophie des hépatocytes
- augmentation de la synthèse d'ADN (transitoire ou constante)

Modifications morphologiques

- augmentation du nombre et de la taille des peroxysomes
- nombreux peroxysomes sans corps nucléoïde
- augmentation du réticulum endoplasmique lisse
- modifications des lysosomes
- dépôts de lipofuscine
- nodules hépatiques et carcinomes hépatocellulaires

Modifications biochimiques

- induction sélective des enzymes peroxysomales, en particulier celles de la β -oxydation
 - induction des isoenzymes CYP4A des cytochromes P450
 - induction de l'activité carnitine acétyltransférase
 - augmentation de la quantité d'un polypeptide de masse moléculaire 80-kDa due à l'induction des enzymes de la β -oxydation peroxysomale
 - induction des époxyde hydrolases microsomaux et cytosoliques
 - induction de l'UDPglucuronosyltransférase microsomale
 - inhibition des activités glutathion peroxydase, glutathion-S-transférase et superoxyde dismutase
-

♦ alors que les mitochondries dégradent totalement les acides gras (obtention de molécules en C_2), les peroxysomes s'arrêtent après quelques cycles, agissant ainsi comme des raccourcisseurs de chaîne (Mannaerts et Van Veldhoven, 1993).

A.2. Substances induisant la prolifération peroxysomale.

De nombreuses substances chimiques provoquent, lorsqu'elles sont administrées à des rats ou des souris, l'hépatomégalie, la prolifération peroxysomale et l'induction des enzymes peroxysomales liées à la β -oxydation des acides gras. La liste des 71 substances considérées comme HPPs est présentée dans l'annexe IV. Ces substances à caractère nucléophile sont de structures diverses (figure 7). Elles peuvent être regroupées en 6 catégories : agents thérapeutiques/hypolipémiants, stéroïdes, herbicides, agents plastifiants, solvants et produits chimiques utilisés dans l'industrie, arômes alimentaires et produits naturels (tableau 9 ; Reddy et Lalwani, 1983 ; Stott, 1988 ; Bentley *et al.*, 1993). L'exposition humaine à certains de ces produits est donc quotidienne, ce qui explique l'étude de leur mécanisme d'action.

Au cours de ce travail, nous avons étudié deux composés hypolipémiants : le clofibrate et le méthyl clofénapate (MCP). Ces deux composés provoquent une diminution du taux de triglycérides plasmatiques en activant la lipoprotéine lipase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides. Le clofibrate est utilisé en thérapeutique pour lutter contre l'hyperlipémie (Hess *et al.*, 1965) alors que le MCP, dont les effets sur les lipides plasmatiques sont supérieurs à ceux du clofibrate, n'a jamais été commercialisé (Thorp, 1970).

Nous avons également étudié un agent plastifiant, le di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) ajouté aux chlorures de polyvinyle pour en augmenter la souplesse et l'un de ses métabolites primaires le mono(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP).

La plupart des HPPs possèdent, dans leur structure moléculaire, une fonction acide carboxylique ou un groupement ester facilement hydrolysable en acide. Les HPPs ne sont néanmoins pas tous des acides, cette seule caractéristique structurale ne suffit donc pas à expliquer la prolifération peroxysomale (Lake et Lewis, 1993).

A.3. Prolifération peroxysomale chez le rat et la souris.

Le tableau 10 résume les effets hépatiques morphologiques et biochimiques consécutifs à l'exposition des rongeurs (rat ou souris) à un HPP.

L'hépatomégalie est due à la fois à l'hypertrophie et l'hyperplasie des hépatocytes. L'examen morphologique montre une augmentation de la taille et du nombre des peroxysomes.

L'altération biochimique majeure est l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale conduisant à l'accumulation d'acides gras-CoA. Cette accumulation semble être à l'origine

de l'induction des activités des enzymes peroxysomales. Cette induction n'est pas uniforme : alors que les enzymes de la β -oxydation sont fortement activées, d'autres enzymes telles que la catalase ne le sont que très faiblement (Bentley *et al.*, 1993).

Les modifications biochimiques et morphologiques persistent aussi longtemps que le HPP est administré. La rapidité avec laquelle l'activité enzymatique retourne au niveau basal dépend de la demi-vie enzymatique et de l'élimination du produit.

Les HPPs affectent également d'autres tissus que le foie. La prolifération des organites et/ou des modifications au niveau des enzymes peroxysomales ont été montrées dans les reins, les intestins et le coeur. Toutefois, les modifications mises en évidence dans ces organes sont d'amplitude moindre que celles observées dans le foie (Nemali *et al.*, 1988 ; Hinton et Price, 1993).

A.4. Prolifération peroxysomale *in vitro*.

La plupart des caractéristiques de la prolifération peroxysomale *in vivo* ont pu être observées sur des hépatocytes en culture : stimulation de la synthèse de l'ADN, augmentation du nombre et du volume des peroxysomes et induction différentielle des activités enzymatiques. L'induction de l'acétyl-CoA oxydase ainsi que l'augmentation des ARNm des enzymes de la β -oxydation mises en évidence sur des hépatocytes de rat en culture sont bien corrélées avec les données *in vivo* (Bieri *et al.*, 1984 ; Elcombe et Mitchell, 1986 ; Bentley *et al.*, 1993 ; Foxworthy et Eacho, 1994).

Les hépatocytes en culture peuvent aussi être utilisés pour identifier les métabolites actifs de certains composés, pour l'établissement de relations structure-activité, pour des études mécanistiques ou pour la mise en évidence de différences entre les espèces (Lake et Lewis, 1993 ; Bieri, 1993). Les études métaboliques à l'aide d'hépatocytes en culture peuvent néanmoins se révéler incomplètes dans la mesure où les HPPs peuvent subir des biotransformations au niveau d'autres organes que le foie.

D'autres effets des HPPs ont été montrés *in vitro* : la stimulation de la PKC (Bentley *et al.*, 1993), l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Shackleton *et al.*, 1995), l'inhibition de l'apoptose (Gill *et al.*, 1995 ; Bursch *et al.*, 1984 ; Bayly *et al.*, 1994) ou encore l'augmentation de la quantité d'oestrogènes dans le sérum des rats exposés (Eagon *et al.*, 1994).

A.5. Mécanisme de la prolifération peroxysomale.

En 1990, Issemann et Green ont cloné le premier récepteur activé par les HPPs, appelé PPAR ("peroxisome proliferator activated receptor") à partir de foie de souris. D'autres PPAR homologues ont été isolés ensuite dans d'autres espèces (Schoonjans *et al.*, 1996).

La mise en évidence d'une séquence d'ADN (élément de réponse de PPAR : PPRE) reconnue spécifiquement par le PPAR et située dans le promoteur du gène de l'acétyl-CoA

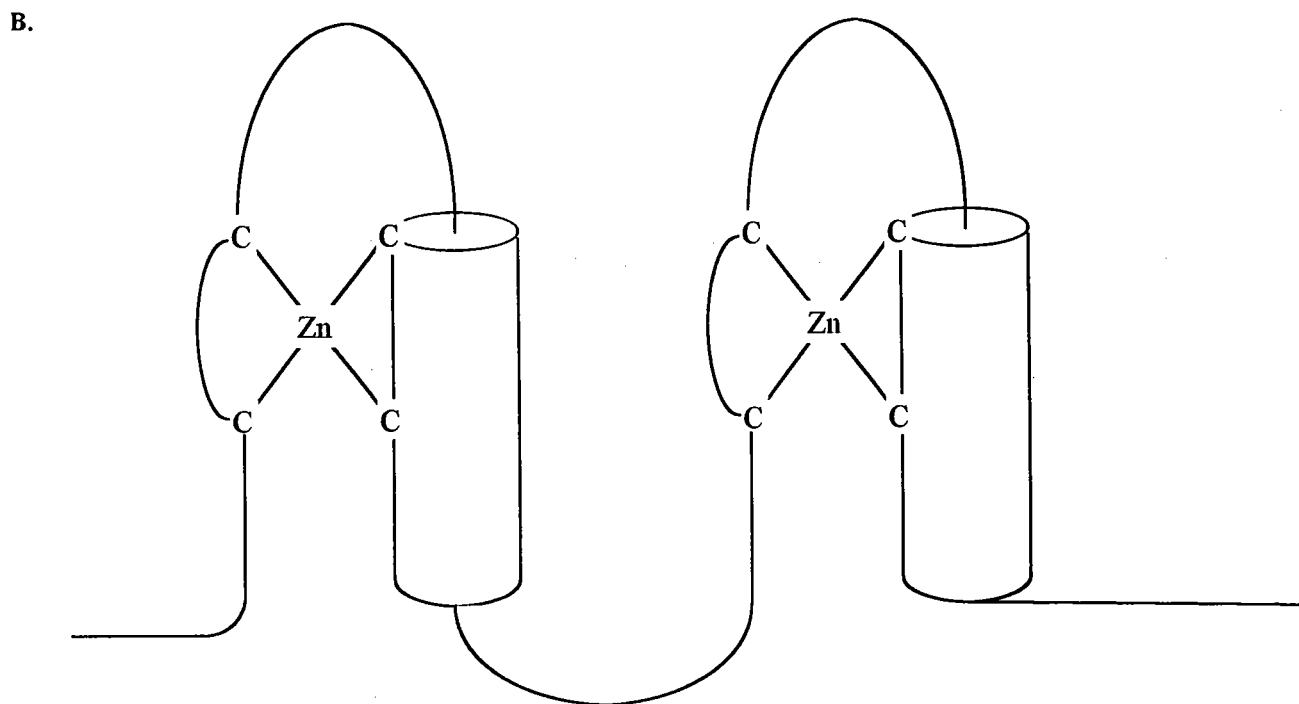
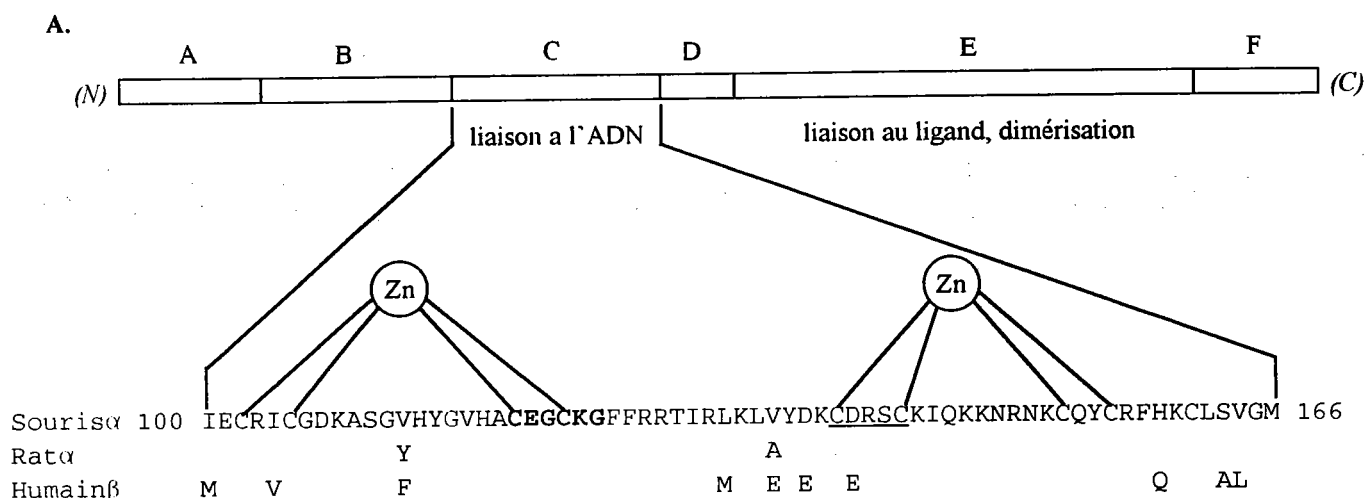


Figure 8. A. Organisation des différents domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires et séquence du domaine de liaison à l'ADN de trois PPAR.

En gras, les acides aminés constituant la "P-box" (Motojima, 1993). Soulignés, les acides aminés constituant la "D-box" (Lemberger *et al.*, 1996).

B. Structure du domaine C du PPAR.

Les cylindres représentent des structures en hélices α (Schoonjans *et al.*, 1996).

Code utilisé pour les acides aminés : A, alanine ; I, isoleucine ; L, leucine ; M, méthionine ; F, phénylalanine ; P, proline ; W, tryptophane ; V, valine ; N, asparagine ; C, cystéine ; Q, glutamine ; G, glycine ; S, sérine ; T, thréonine ; Y, tyrosine ; R, arginine ; H, histidine ; L, lysine ; D, acide aspartique ; E, acide glutamique.

oxydase, a confirmé l'hypothèse de l'activation transcriptionnelle de la β -oxydation peroxysomale par les HPPs (Tugwood *et al.*, 1992).

a. Structure du PPAR.

Le PPAR comporte six sous unités fonctionnelles (figure 8) A/B, C, D et E/F. Le domaine de liaison à l'ADN (C) est constitué de 66 acides aminés. La structure de C est stabilisée par deux atomes de zinc qui se lient chacun à quatre résidus cystéine invariants formant ainsi deux "doigts de zinc". Deux régions très conservées et fonctionnellement importantes ont été identifiées dans le domaine C : la "P-box" et la "D-box".

- ♦ La "P-box" détermine le contact spécifique entre le récepteur et l'ADN et reconnaît des répétitions directes de AGGTCA séparées par un nucléotide.
- ♦ La "D-box" pourrait être impliquée dans des interactions de type protéine-protéine (Schoonjans *et al.*, 1996).

Le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque (RXR) semble le partenaire préférentiel de PPAR dans la formation d'un complexe dimérique (Kliwer *et al.*, 1992 ; Issemann *et al.*, 1993 ; Keller *et al.*, 1993).

b. Gènes cibles.

Le gène codant pour l'enzyme limitante de la β -oxydation (l'acétyl-CoA oxydase) contient dans son promoteur deux éléments de réponse activés par le PPAR (Osumi *et al.*, 1991). De nombreux autres gènes se sont révélés posséder un PPRE dans leur promoteur :

- ♦ le gène de l'acétyl-CoA synthétase (Schoonjans *et al.*, 1995),
- ♦ le gène de la seconde enzyme de la β -oxydation peroxysomale (Zhang *et al.*, 1992),
- ♦ un gène impliqué dans l'activité ω -hydroxylasique du cytochrome P450 4A1 microsomal (Muerhoff *et al.*, 1992),
- ♦ le gène de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthétase mitochondriale (Rodriguez *et al.*, 1994),
- ♦ le gène de l'acétyl-CoA déshydrogénase mitochondriale (Schoonjans *et al.*, 1996),
- ♦ le PPAR α de souris joue un rôle important dans la transcription de nombreux gènes, certains d'entre eux n'étant pas liés au métabolisme lipidique (Motojima *et al.*, 1997).

c. Ligands du PPAR.

Le mécanisme d'activation du PPAR reste obscur, en effet, s'il est évident que les HPPs sont capables d'activer ce récepteur (Issemann et Green, 1990 ; Dreyer *et al.*, 1992), rien ne prouve que ce soit par liaison directe d'autant que ces composés sont de structures variées. Une liaison indirecte pourrait impliquer l'existence de ligands intermédiaires capables d'interagir avec le PPAR.

Tableau 11. Relation entre la prolifération peroxysomale et l'hépatocarcérogénicité induites *in vivo* par 18 HPPs (d'après Ashby *et al.*, 1994).

Substance	Rat				Souris				Autres		
	Souche	PP		HC	Souche	PP		HC	Animal	PP	
		m	f			m	f			m	f
MCP	F344	+		+							
	Wistar	+		+							
BBP	F344		-								
lactofen					CD-1	+	+	+			
clofibrate	SD	+	+	+	C57B1	+		-			
	F344	+		+	Swiss	+		-			
	Wistar	+		-					ouistiti	-	-
DEHA	F344	+	+	-	B6C3F1	+	+	-			
cinnamyl anthranilate	F344	-	+	-	B6C3F1	+	+	+			
clobuzarit	Wistar	+		-	C57B1	+		+	hamster	-	-
DEHP	F344	+	+	+					hamster	-	-
Wy-14,643	F344	+		+							
nafénopin	F344	+		+							
ciprofibrate	F344	+		+	C57B1	+		+			
acide trichloro-acétique					B6C3F1	+		+			
perchloro-éthylène	F344	-	-	-	B6C3F1	+	+	+			
trichloro-éthylène	F344	-		-	B6C3F1	+		+			
	OM	-		-							
gemfibrozil	SD	+		+							
LY 171883					B6C3F1		+	+			
acide tibrique	F344	+		+							
DINP	F344	-	-	-							

Les données concernant le MEHP ne sont pas suffisantes pour être incluses dans ce tableau.
MCP, méthyl clofénapate ; BBP, benzyl butyl phtalate ; DEHA, di(2-éthylhexyl)adipate ; DEHP, di(2-éthylhexyl)phtalate ; DINP, di-isononyl phtalate.
PP, prolifération peroxysomale. m, mâle.
HC, hépatocarcérogénicité. f, femelle.

Les acides gras sont de bons candidats pour le rôle de ligands endogènes : une alimentation très riche en acide gras et des conditions physiologiques caractérisées par un excès d'acide gras stimulent la β -oxydation et la prolifération peroxysomale (Schoonjans *et al.*, 1996). En effet, exceptés les acides gras à chaîne courte comportant moins de 10 carbones, les acides gras monoinsaturés à très longues chaînes et l'acide dodécanoïque sont tous capables d'activer le PPAR à différents degrés (Göttlicher *et al.*, 1992, 1993 ; Schmidt *et al.*, 1992 ; Issemann *et al.*, 1993 ; Sher *et al.*, 1993).

La régulation de la transcription de certains gènes par le PPAR en réponse aux proliférateurs des peroxysomes est responsable d'au moins une partie des effets causés par ces composés.

B. Corrélation entre la prolifération peroxysomale hépatique et l'hépatocancérogénèse.

Reddy et ses collaborateurs (1980) ont été les premiers à suggérer que les produits induisant la prolifération peroxysomale dans les hépatocytes des rongeurs représentaient une classe à part entière de cancérogènes. Cette hypothèse était basée sur le fait que les agents hypolipémiants étudiés avaient tous la capacité d'induire à court terme la prolifération peroxysomale dans le foie des rongeurs et étaient des cancérogènes hépatiques à long terme. Depuis, la littérature concernant les HPPs s'est étoffée et les avis sont partagés : alors que Reddy maintient l'hypothèse d'un lien de cause à effet entre la prolifération peroxysomale et l'hépatocancérogénèse (Chu *et al.*, 1996) ; d'autres auteurs constatent que la corrélation est parfois faible et suggèrent l'existence d'un autre mécanisme que la prolifération peroxysomale pour expliquer l'hépatocancérogénicité des HPPs (Grasl-Kraupp *et al.*, 1993 ; Cattley *et al.*, 1994).

B.1. Prolifération peroxysomale et hépatocancérogénèse chez les rongeurs (rat et souris).

Les corrélations entre prolifération peroxysomale et hépatocancérogénèse, obtenues après traitement statistique des données concernant les 18 HPPs dont la cancérogénicité *in vivo* a été évaluée en détail sont présentées dans le tableau 11 (Ashby *et al.*, 1994).

a. Relation entre l'induction de la prolifération peroxysomale (PP) et l'hépatocancérogénicité (HC).

Les propriétés cancérogènes et prolifératrices d'un même produit sont souvent corrélées.

♦ Chez des rats F344 traités avec 12 g de DEHP/kg de nourriture, on observe une incidence tumorale de 24% et une multiplication par 5 du volume cytoplasmique occupé par les peroxysomes ; alors qu'avec 20 g/kg, l'incidence tumorale passe à 78% et les

peroxysomes augmentent 7 fois. L'incidence tumorale est définie comme le nombre d'animaux présentant des tumeurs hépatiques par rapport au nombre d'animaux traités.

- ♦ Les HPPs "forts", qui provoquent une augmentation du volume occupé par les peroxysomes d'au moins 6 à 8 fois, sont généralement aussi les hépatocancérogènes les plus puissants avec une incidence tumorale d'au moins 70% (Ashby *et al.*, 1994).

- ♦ Les HPPs "faibles", comme le BBP ou le DINP, qui n'induisent la prolifération peroxysomale qu'à fortes doses, ne sont pas hépatocancérogènes ou proliférateurs des peroxysomes dans les conditions utilisées.

La prolifération peroxysomale est donc un bon indicateur précoce de l'hépatocancérogénicité induite par les HPPs.

Toutefois, certains proliférateurs des peroxysomes cités, tels que le cinnamyl anthranilate, le clobuzarit et le di(2-éthylhexyl)adipate (DEHA) ne sont pas hépatocancérogènes.

b. Différences inter-espèces.

La nature et l'amplitude de la réponse obtenue varient avec le sexe, la souche et l'espèce étudiés.

- ♦ Les souris B6C3F1 semblent particulièrement sensibles : le perchloroéthylène et le trichloroéthylène provoquent la prolifération peroxysomale et l'hépatocancérogénèse chez ces souris alors que le rat F344 répond négativement.

- ♦ Le cinnamyl anthranilate cause la prolifération peroxysomale chez la souris, mâle et femelle et chez le rat femelle, mais pas chez le mâle.

- ♦ L'exposition de trois souches différentes de rats au clofibrate a permis la mise en évidence d'une différence de sensibilité inter-souches. En effet, des modifications biochimiques hépatiques plus marquées ont été mises en évidence chez les rats Wistar Lewis que chez les rats F344 eux-mêmes plus sensibles que les rats Sprague Dawley (Yamoto *et al.*, 1996).

Les effets des HPPs n'ont que très rarement été étudiés sur d'autres espèces. Le clobuzarit, qui induit la prolifération peroxysomale hépatique chez le rat et la souris, n'induit pas de tumeurs chez le hamster Syrien lors d'une étude de deux ans (Tucker et Orton, 1995). Le DEHP, administré par injection intrapéritonéale ou par inhalation n'a pas non plus d'effet tumorigène sur cette espèce (Schmezer *et al.*, 1988).

Des études à long terme ont été réalisées sur les primates avec le clofibrate. L'administration journalière de cet HPP à 160 ouistitis (*Callithrix jacchus*) pendant presque 7 ans, ce qui représente la moitié de la durée moyenne de vie de ces animaux, n'a provoqué ni hépatomégalie ni augmentation du nombre de carcinomes hépatocellulaires (Tucker et Orton, 1993).

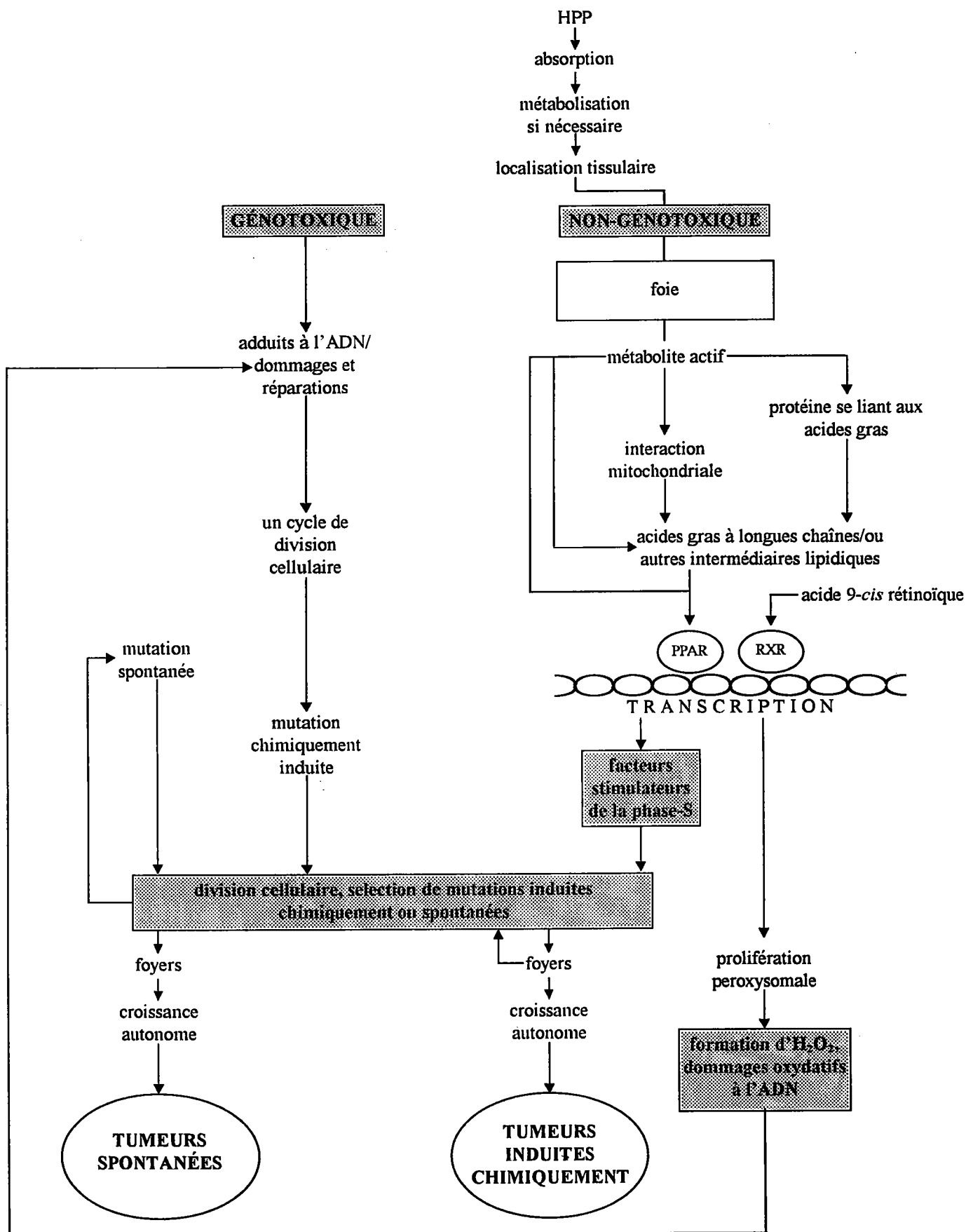


Figure 9. Mécanismes d'action possibles des proliférateurs des peroxysomes (d'après Ashby *et al.*, 1994).

Plus généralement, le rat et la souris apparaissent sensibles à des doses où le cobaye, le hamster ou les primates ne répondent pas (Lhugenot *et al.*, 1988 ; Lake *et al.*, 1984, 1989, 1993 ; Dirven *et al.*, 1993). Cette variabilité inter-espèces peut s'expliquer par :

- ♦ une différence dans l'absorption ou la métabolisation des HPPs entre les espèces, souches ou sexes,
- ♦ la distribution du PPAR et la présence de facteurs qui empêcheraient son activation chez les espèces moins sensibles (Ashby *et al.*, 1994).

*En conclusion, l'analyse des données relatives à la prolifération peroxysomale et à l'induction de carcinomes hépatiques met en évidence une corrélation partielle entre la prolifération peroxysomale hépatique et l'hépatocarcérogénèse. Pour les composés identifiés comme proliférateurs des peroxysomes chez des animaux d'une espèce, une souche et un sexe particulier, et pour lesquels des essais de cancérogénicité ont été réalisés en utilisant des doses équivalentes à celles induisant la prolifération peroxysomale, la corrélation est de 81% (Ashby *et al.*, 1994).*

B.2. Etudes épidémiologiques/risques pour l'homme.

Le risque cancérogène lié à l'utilisation de fibrates dans le cadre de traitements hypolipémiantes visant à diminuer le risque d'accidents cardiovasculaires a été évalué sur l'homme au cours de deux études épidémiologiques (Oliver *et al.*, 1984 ; Huttunen *et al.*, 1994). Un suivi de cinq ans a été réalisé par l'Organisation Mondiale de la Santé sur des patients traités par le clofibrate. Le nombre de morts enregistré dans le groupe des patients traités était plus élevé que dans les groupes contrôles, mais n'était pas dû à une incidence tumorale supérieure (Oliver *et al.*, 1984). Aucune différence dans l'incidence du cancer n'a pu être observée au cours d'un traitement de cinq ans par le gemfibrozil (Huttunen *et al.*, 1994).

D'autre part, les résultats obtenus sur des hépatocytes humains ne montrent pas d'induction de la prolifération peroxysomale dans ces cellules à des doses qui correspondent aux doses thérapeutiques (Bentley *et al.*, 1993 ; Ashby *et al.*, 1994).

C. Mécanismes de la cancérogénicité.

La figure 9 présente les mécanismes par lesquels un HPP est susceptible d'induire la formation de tumeurs. Plusieurs aspects de l'action de ces substances ont été étudiés, tels que leur capacité à interagir avec l'ADN, directement ou par le biais d'un stress oxydatif ainsi que leurs effets mitogènes.

Tableau 12. Essais de génotoxicité *in vitro* effectués avec les proliférateurs des peroxysomes (adapté de Ashby *et al.*, 1994).

Substance	Mutagénicité			SCE		Aberrations chromosomiques					UDS		MN	
	bactérie	levure	cellule	CHO	HR	SHE	CHL	CHO	LH	HR	LH	HR	HH	HR
MCP	-							-	-					
BBP	-	-	-	-				-						
lactofen	+/-							-						
clofibrate	-			+		-	+/-							
DEHA	-		-	+/-	-			+/-		-				
cinnamyl anthralinate	-		+	-			-	-						
DEHP	-	+	+/-	-	-	+		-		-		-		
MEHP				-		+		+						
Wy-14,643	-				+	+			+	+		-	+	+
nafénapin	-				+					+		-		+
ciprofibrate					+					+				+
acide trichloroacétique	-								-					
perchloroéthylène	+/-	-	-	-				-			-	-		
trichloroéthylène	+/-	+/-	+/-	+/-										

Les Références relatives au MEHP sont dans Huber *et al.*, 1996.

+ résultats positifs.

+/- faible positivité.

SCE, échanges de chromatides soeurs.

UDS, synthèse d'ADN non programmée.

MN, micronoyaux.

CHO, cellules issues d'ovaire de hamster Chinois.

HR, hépatocytes de rat.

- résultats négatifs.

SHE, cellules d'embryon de hamster Syrien.

CHL, cellules issues de poumon de hamster Chinois.

LH, lymphocytes humains.

HH, hépatocytes humains.

Tableau 13. Essais de génotoxicité *in vivo* effectués avec les proliférateurs des peroxysomes (adapté de Ashby *et al.*, 1994).

Substance	Aberrations chromosomiques				Micronoyaux			UDS		RSB	MM-BB
	MOR	MOHC	MOS	LR	MOR	MOS	LS	foie R	rein R	foie R	
MCP						-		-		-	-
BBP											
lactofen											
clofibrate	-	-		-						-	
DEHA						-					
cinnamyl anthralinate						-		-			
DEHP	-		-				-			-	
MEHP	-		-							-	
Wy-14,643								-			
nafénopin								-			
ciprofibrate											
acide trichloroacétique			+			+/-				-	
perchloroéthylène	+				-				-		
trichloroéthylène	-		-			+/-					

Les références relatives au MEHP sont dans Huber *et al.*, 1996.

+ résultats positifs.

RSB, rupture d'ADN simple brin.

UDS, synthèse d'ADN non programmée.

MOHC, moelle osseuse de hamster Chinois.

MM-BB, mutation sur souris transgéniques (Muta-Mouse et Big-Blue).

+/- faible positivité.

LS, lymphocytes de souris.

LR, lymphocytes de rat.

MOS, moelle osseuse de souris.

- résultats négatifs.

R, rat.

MOR, moelle osseuse de rat.

C.1. Génotoxicité.

Des résultats de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* sont disponibles pour 13 des 18 composés étudiés pour leurs capacités à induire la prolifération peroxysomale et l'hépatocarcinogénèse (tableau 11). Le tableau 12 présente les résultats des études *in vitro* et le tableau 13 ceux des études *in vivo*. Les données relatives au MEHP ont été ajoutées dans le but d'être comparées à celles du DEHP.

Le MCP et le BBP, sont les deux seuls agents totalement dénués d'activité génotoxique.

In vitro, le test d'Ames et les essais de cytogénétique sur cellules CHO sont restés négatifs avec les deux substances.

In vivo, les essais visant à montrer la formation de micronoyaux chez la souris et de synthèse d'ADN non programmée chez le rat sont négatifs avec le MCP. La faible solubilité du MCP conduit néanmoins Lefevre *et al.* (1994) à mettre en doute l'interprétation des résultats obtenus sur des souris transgéniques.

D'autres composés comme le clofibrate, le lactofen, le DEHA et le cinnamyl anthralinate présentent un profil majoritairement négatif *in vitro* et totalement négatif *in vivo*.

In vitro, le clofibrate induit des échanges de chromatides soeurs dans les cellules CHO (sans relation dose-effet) et des aberrations chromosomiques dans les cellules CHL (Ashby *et al.*, 1994).

Les résultats négatifs observés *in vivo* avec le clofibrate incluent des études réalisées sur le foie de rat (Elliott et Elcombe, 1987) ainsi que sur la moelle osseuse de rat (Kawachi *et al.*, 1980) et de hamster Chinois (Linnainmaa, 1984).

Lorsque les DEHP et le MEHP sont administrés par voie transplacentaire à des embryons de hamster Syrien, un effet clastogène est observé après mise en culture des cellules (Tomita *et al.*, 1982). Ceci bien que le hamster soit assez peu sensible à la prolifération peroxysomale et à l'induction de cancers hépatiques par les HPPs.

Les profils de génotoxicité induite par le nafénopin, le ciprofibrate et le Wy-14,643 sont semblables. En effet, on observe des réponses positives avec les essais visant à mettre en évidence les échanges de chromatides soeurs, les aberrations chromosomiques et les micronoyaux, certaines de ces études ayant été réalisées sur des hépatocytes de rat. Le Wy-14,643 est clairement clastogène *in vitro*, ce composé apparaît comme génotoxique, mais sans qu'il se lie directement à l'ADN (Ashby *et al.*, 1994).

Les résultats obtenus avec l'acide trichloroacétique et le perchloroéthylène ne sont nettement positifs que dans le cas de la mise en évidence *in vivo* d'aberration chromosomiques alors que l'activité mutagène du trichloroéthylène est plus marquée *in vitro*.

Tableau 14. Résultats relatifs à l'induction d'un stress oxydant *in vivo* par les HPPs étudiés.

Substance	Paramètre	Réponse	Référence
clofibrate ou acide clofibrique	GSH	→	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
	GSSG	↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
	GSH transférase	↘	Lake <i>et al.</i> , 1987
		↘	Tamura <i>et al.</i> , 1990b
		↘	Nishimura <i>et al.</i> , 1995
	SOD	↘	Elliott et Elcombe, 1987
	H ₂ O ₂	↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
	OH•	↗	Elliott <i>et al.</i> , 1986
	peroxydation lipidique	→	Elliott et Elcombe, 1987
		↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990b
	lipofuscine	↗	Lake <i>et al.</i> , 1987
		↗	Reddy <i>et al.</i> , 1982
		↗	Marsman <i>et al.</i> , 1992
	ruptures ADN	→	Elliott et Elcombe, 1987
		→	Tamura <i>et al.</i> , 1991
	adduits 8-OHdG	↗	Cattley et Glover, 1993
MCP	GSH peroxydase	↘	Elliott et Elcombe, 1987
	SOD	↘	Elliott et Elcombe, 1987
	OH•	↗	Elliott <i>et al.</i> , 1986
	lipofuscine	↗	Reddy <i>et al.</i> , 1982
	ruptures ADN	→	Elliott et Elcombe, 1987
DEHP	GSH	→	Conway <i>et al.</i> , 1989
		↗	Perera <i>et al.</i> , 1986
		↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
	GSSG	↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
	GSH peroxydase	↘	Lake <i>et al.</i> , 1987
		↘	Perera <i>et al.</i> , 1986
		↘	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
		↘	Conway <i>et al.</i> , 1989
		↘	Tomaszewski <i>et al.</i> , 1986
		↘	Elliott et Elcombe, 1987
	GSH transférase	↘	Lake <i>et al.</i> , 1987
		↘	Perera <i>et al.</i> , 1986
		↘	Tamura <i>et al.</i> , 1990b
	SOD	↘	Elliott et Elcombe, 1987
	vitamine E	→	Conway <i>et al.</i> , 1989
	H ₂ O ₂	↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990a
		↗	Tomaszewski <i>et al.</i> , 1986
	OH•	↗	Elliott <i>et al.</i> , 1986
	peroxydation lipidique	→	Elliott et Elcombe, 1987
		→	Tamura <i>et al.</i> , 1991
		↗	Tamura <i>et al.</i> , 1990b

De l'ensemble de ces données, Ashby et al. (1994) concluent que, comparés aux cancérogènes génotoxiques classiques, les HPPs considérés ici ont un profil majoritairement non-génotoxique, leur hépatocancérogénicité est plus probablement due aux modifications biochimiques qu'ils induisent dans le foie des rongeurs qu'à une altération directe de la structure et de l'intégrité de l'ADN.

C.2. Stress oxydatif

L'hypothèse du rôle du stress oxydatif dans le processus cancérogène induit par les HPPs est basée sur le fait que la β -oxydation peroxysomale engendre la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au cours de sa première étape. Une surproduction d' H_2O_2 peut conduire à un stress oxydatif susceptible d'entraîner des dommages à l'ADN (Cerutti, 1985 ; Borek, 1991).

De nombreuses études visant à déterminer l'effet des HPPs sur les enzymes antioxydantes hépatiques ont été effectuées. Seule une faible induction de l'activité catalasique est mesurable après exposition aux HPPs (Nemali *et al.*, 1988), alors que la glutathion peroxydase (sélénium dépendante), la superoxyde dismutase et la glutathion transférase sont inhibées (tableau 10). Le tableau 14 présente celles réalisées *in vivo* avec les quatre HPPs étudiés.

Les hépatocytes des animaux dans lesquels une prolifération peroxysomale a été mise en évidence présentent :

- ♦ des taux de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyl élevés,
- ♦ un dépôt de lipofuscine, pigment résultant de la lipoperoxydation et de la dégradation des macromolécules cellulaires par les radicaux libres ; ce pigment n'a néanmoins été observé que dans des régions du foie où aucun nodule ni tumeur n'ont été mis en évidence (Reddy *et al.*, 1982).

L'exposition de rats F344 au clofibrate ou au DEHP provoque une augmentation du taux d'adduits de 8-OH-désoxyguanosine à l'ADN. Toutefois, les analyses ont été réalisées à partir d'hépatocytes entiers et non de noyaux isolés, les adduits détectés pourraient donc constituer des adduits à l'ADN mitochondrial, 16 fois plus sensible que l'ADN nucléaire au stress oxydatif (Richter *et al.*, 1988 ; Sausen *et al.*, 1995). D'autre part, DEHP et DEHA induisent la même augmentation de bases altérées chez le rat F344 alors que seul le DEHP est cancérogène pour cet animal (tableau 11).

Il semble donc que le foie des animaux-traités avec des agents proliférateurs des peroxysomes hépatiques soit le siège d'un stress oxydatif résultant d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène. Toutefois :

- ♦ il n'a pas été prouvé que le stress oxydatif induit par les HPPs soit responsable de dommages à l'ADN nucléaire,
- ♦ aucune corrélation n'a pu être trouvée entre les marqueurs de l'oxydation et le potentiel cancérogène des HPPs.

Tableau 14. Suite.

Substance	Paramètre	Réponse	Référence
DEHP	diènes conjugués	→	Perera <i>et al.</i> , 1986
		→	Conway <i>et al.</i> , 1989
		↘	Tomaszewski <i>et al.</i> , 1986
		↗	Lake <i>et al.</i> , 1987
	lipofuscine	↗	Conway <i>et al.</i> , 1989
		↗	Lake <i>et al.</i> , 1987
	ruptures ADN	→	Elliott et Elcombe, 1987
		→	Tamura <i>et al.</i> , 1991
MEHP	8-OHdG	↗	Takagi <i>et al.</i> , 1990a
		↗	Takagi <i>et al.</i> , 1990b
	peroxydation lipidique	→	Elliott et Elcombe, 1987
	ruptures ADN	→	Elliott et Elcombe, 1987

SOD : superoxyde dismutase.

GSH : glutathion.

GSSG : glutathion oxydé.

OH• : radical hydroxyle.

8-OHdG : adduit de 8-OH-déoxyguanosine.

Ashby et al. (1994) en concluent que les dommages oxydatifs provoqués par les HPPs ne suffisent pas à expliquer le potentiel hépatocancérogène de ces substances, mais qu'ils y contribuent probablement.

C.3. Rôle de la prolifération cellulaire.

L'hépatomégalie observée après exposition de rats ou de souris aux HPPs n'est pas seulement due à la prolifération peroxysomale, mais aussi à une stimulation marquée de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire pendant les deux premières semaines d'administration des composés (Smith-Oliver et Butterworth, 1987 ; Marsman *et al.*, 1988 ; Styles *et al.*, 1988 ; Rao et Reddy 1989 ; Barrass *et al.*, 1993).

L'hypothèse proposée est qu'un effet mitogène même faible et chronique peut avoir des conséquences cancérogènes indirectes en augmentant la probabilité de fixation des dommages endogènes à l'ADN. En effet, certains auteurs ont montré une plus forte incidence tumorale induite par les HPPs chez des animaux vieux que chez des jeunes (Cattley *et al.*, 1991 ; Kraupp-Grasl *et al.*, 1991).

La prolifération cellulaire provoquée par les HPPs est néanmoins de courte durée : après ces deux semaines, la réplication de l'ADN revient graduellement au niveau du contrôle, ceci sans interruption du traitement (Marsman *et al.*, 1988 ; Barrass *et al.*, 1993). Cet effet transitoire va à l'encontre d'une contribution significative de la prolifération cellulaire dans la cancérogénicité des HPPs.

Par ailleurs, les HPPs activent certains proto-oncogènes : le clofibrate et le ciprofibrate induisent *c-myc* et *c-Ha-ras* dans différents tissus chez le rat (Cherkaoui-Malki *et al.*, 1990). Des mutations de *c-Ha-ras* ont été mises en évidence dans des tumeurs hépatiques induites chez la souris par le MCP (Stanley *et al.*, 1994) et le Wy-14,643 active *c-met* et *c-myc* dans le foie normal et tumoral chez le rat (Miller *et al.*, 1996).

Le rôle de la prolifération cellulaire dans la cancérogénèse induite par les HPPs est encore mal connu. Il est probable que cette prolifération intervienne à différents degrés dans la formation de tumeurs sans toutefois être suffisante à elle seule pour induire la cancérogénèse (Ashby et al., 1994).

La cancérogénèse induite par les HPPs semble être liée à de nombreux mécanismes parmi lesquels : la prolifération peroxysomale/le stress oxydatif, la prolifération cellulaire, l'activation de proto-oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, la modulation de la production de facteurs de croissance, l'inhibition de l'apoptose, etc. Tous ces mécanismes peuvent agir simultanément pour conduire à la cancérogénèse ou à l'expansion de tumeurs spontanées (Ashby *et al.*, 1994).

Tableau 15. Induction de la transformation cellulaire par les HPPs.

Substance	Conc. (µM)*	Système	Réponse**	Réf.
clofibrate	41	SHE	++	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
	25/25/25	SHE ^{C/I/P}	++/-/++	Dhalluin <i>et al.</i> , 1996
	+300/-300	SHE+/-	-/-	Tsutsui <i>et al.</i> , 1993
	5/5	C3H ^{C/P}	-/++	Lillehaug <i>et al.</i> , 1986
DEHP	7,7	SHE	++	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
	77	SHE	++	Mikalsen et Sanner, 1993
	10,2	SHE	++	Sanner et Rivedal, 1985
	25,6	SHE	++	Barrett et Lamb, 1985
	1300	SHESA7 ^a	+	Hatch et Anderson, 1985
	+30/-3	SHE+/-	++/+	Tsutsui <i>et al.</i> , 1993
	+1000/-40	C3H+/-	+/+	Lawrence et McGregor, 1985
	2560	FRERLV ^b	+	Suk et Humphreys, 1985
	1250	JB6 ^c	++	Diwan <i>et al.</i> , 1985
	100/100/10	C3H ^{C/I/P}	-/-/-	Sanchez <i>et al.</i> , 1987
	+125000/-157	3T3+/-	-/-	Matthews <i>et al.</i> , 1985
	37700	3T3	-	Matthews <i>et al.</i> , 1993a
MEHP	18	SHE	++	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
	+200/-300	SHE+/-	-/+	Tsutsui <i>et al.</i> , 1993
	1500/1500/100	C3H ^{C/I/P}	-/-/-	Sanchez <i>et al.</i> , 1987
	359	3T3	+	Matthews <i>et al.</i> , 1993b
DEHA	85300	3T3	-	Matthews <i>et al.</i> , 1993b
MEHA	2320	3T3	-	Matthews <i>et al.</i> , 1993b
Wy-14,643	+3/-100	SHE+/-	+/-	Tsutsui <i>et al.</i> , 1993
tiadénol	57	SHE	++	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
	5/20	C3H ^{C/P}	-/-	Lillehaug <i>et al.</i> , 1986
niadénate	20/5	C3H ^{C/P}	-/++	Lillehaug <i>et al.</i> , 1986
2,4-D	450	SHE	-	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
2,4,5-T	195	SHE	-	Mikalsen <i>et al.</i> , 1990a,b
trichloro-éthylène	1100	FRE ^c	++	Price <i>et al.</i> , 1978

C/I/P, C/P le protocole utilisé a pour but de mettre en évidence les effets cancérigène (C), initiateur (I) et/ou promoteur (P) de la substance testée ; quand rien n'est indiqué, l'étude porte sur le pouvoir cancérigène seul (pas de traitements séquentiels).

+/- essai réalisé avec ou sans activation externe.

* correspond à la plus faible concentration positive testée.

** - pas d'effet ; + induction de la transformation des cellules ; correspond au protocole indiqué dans la colonne voisine (C/I/P, C/P ou +/- activation métabolique).

^a cellules SHE infectées par le virus SA7.

^b cellules d'embryon de rat (Fischer) infectées par le virus de la leucémie de Rauscher.

^c cellules épidermiques de souris.

^d lignée épithéliale issue de foie de rat.

D. Transformation cellulaire et inhibition des communications intercellulaires induites par les HPPs.

Seul un petit nombre des 71 produits considérés comme HPPs a été étudié dans des systèmes visant à mettre en évidence des effets sur la transformation cellulaire ou les communications intercellulaires.

D.1. Induction de la transformation cellulaire.

Le tableau 15 présente un résumé des études réalisées sur l'induction par les HPPs de la transformation morphologique de cellules en culture.

Le DEHP est le HPP le plus étudié sur les systèmes de transformation cellulaire et il semble qu'il soit transformant dans la plupart des cas. Le composé provoque également l'indépendance d'ancrage de cellules épidermiques de souris (JB6 ; Diwan *et al.*, 1985) et de cellules d'embryon de rats infectées par le virus de la leucémie de Rauscher (FRERLV ; Suk et Humphreys, 1985). Dans les cellules C3H10T $\frac{1}{2}$ (Sanchez *et al.*, 1987), le DEHP s'est montré négatif :

- comme cancérogène, après une période d'exposition de 24 à 72 h, suivie de 6 semaines d'expression de la transformation,
- comme agent initiateur, utilisé avant l'exposition des cellules au promoteur qu'est le TPA,
- et comme agent promoteur après initiation par la MNNG.

Ces résultats peuvent être dus aux protocoles d'expositions utilisés : combinaison d'expositions courtes (24 à 72 h) avec de longues périodes d'expression de la transformation et utilisation de concentrations très faibles (10 μ M) au cours des expositions plus longues.

La lipase qui produit le MEHP à partir du DEHP *in vivo* est localisée dans le pancréas, la métabolisation du DEHP est donc particulièrement efficace dans le tractus gastro-intestinal et moindre dans le foie et l'épithélium intestinal (Albro, 1986 ; Huber *et al.*, 1996). Le MEHP semble moins actif que le DEHP à concentrations équivalentes sur les cellules SHE bien que le MEHP soit considéré comme le métabolite actif du DEHP *in vivo* (Mikalsen *et al.*, 1990a,b ; Tsutsui *et al.*, 1993).

Une faible positivité est induite sur le système BALB/c-3T3 par le MEHP (Matthews *et al.*, 1993b). Dans le système C3H10T $\frac{1}{2}$, les résultats sont négatifs, comme ceux du DEHP testé dans les mêmes conditions (Sanchez *et al.*, 1987).

Au cours des études réalisées par Mikalsen *et al.* (1990a,b), le clofibrate s'est montré transformant sur les cellules SHE en densité clonale et après 7 jours d'exposition. Dhalluin *et al.* (1996) ont montré que le clofibrate agit à la fois seul et en interaction avec le TPA. Les résultats de Tsutsui *et al.* (1993) semblent par contre indiquer que le clofibrate est

Tableau 16. Inhibition des communications intercellulaires par les HPPs.

Substance	Conc. (μ M)*	Système		Réponse	Réf.
		cellule	mesure	**	
DEHP	0,3	V79	CM	–	Kornbrust <i>et al.</i> , 1984
	35,9	V79	CM	+	Malcolm et Mills, 1989
	785	V79	CM	+	Vang <i>et al.</i> , 1993
	77	SHE	TC	+	Mikalsen et Sanner, 1993
	18	V79	CM	+	Elmore <i>et al.</i> , 1985
	500	V79	CM	–	Umeda <i>et al.</i> , 1985
MEHP	200	PRH	TC	+	Leibold <i>et al.</i> , 1994
	10	PMH	CM	+	Klaunig <i>et al.</i> , 1988
MCP	1,6	V79	CM	–	Trosko <i>et al.</i> , 1982
Nafénopin	0,8	V79	CM	+	Trosko <i>et al.</i> , 1982
	32	PRH	TC	+	Leibold <i>et al.</i> , 1994
Wy-14,643	3,1	V79	CM	+	Trosko <i>et al.</i> , 1982
	100	PRH	TC	+	Leibold <i>et al.</i> , 1994
2,4-D	675	V79	CM	+	Rubenstein <i>et al.</i> , 1984
2,4,5-T	300	V79	CM	+	Rubenstein <i>et al.</i> , 1984
	78	V79	CM	+	Toraason <i>et al.</i> , 1992

* correspond la plus faible concentration positive testée.

** - pas d'effet, + inhibition des GJIC.

CM, étude de l'inhibition de la coopération métabolique.

TC, étude basée sur le transfert d'un colorant.

PRH, PMH, hépatocytes primaires de rat (PRH) ou de souris (PMH).

inactif sur les cellules SHE même à forte concentration. La différence avec les résultats précédents peut s'expliquer par la procédure d'exposition utilisée par Tsutsui *et al.* (1993) : les cellules SHE ne sont exposées au clofibrate que pendant 2 ou 48 h (avec ou sans fraction microsomale de foie de rat respectivement) avant d'être mises en culture en densité clonale.

Lillehaug *et al.* (1986) ont étudié les effets de trois HPPs (clofibrate, tiadénol et niadénate) sur des cellules C3H10T $\frac{1}{2}$, les trois produits se sont révélés non transformants quand ils étaient utilisés seuls (24 h d'exposition et 6 semaines de croissance des cellules). Toutefois, le niadénate et le clofibrate présentent une activité transformante après application de 3-méthylcholanthrène (3-MC).

Il est intéressant de noter que les essais réalisés sur le système SHE avec le clofibrate et le DEHP par Mikalsen *et al.*, ont été effectués à des concentrations proches de celles mesurées dans les milieux biologiques *in vivo*. En effet, la concentration plasmatique de clofibrate chez l'homme est d'environ 50 μ M quand il est utilisé à doses thérapeutiques. La concentration en DEHP contenu dans les produits sanguins stockés dans des sacs plastiques en chlorure de polyvinyle est supérieure à 75 μ M (Mikalsen *et al.*, 1990a).

Les effets transformants du clofibrate, du DEHP et du MEHP ont été obtenus après deux applications des composés sur les cellules ; aucune étude n'a été réalisée avec les cellules SHE dans le but de mettre en évidence les interactions possibles des quatre HPPs avec un initiateur ou un promoteur.

Le potentiel transformant du MCP n'a pas été étudié.

Parmi les autres HPPs, certains comme le trichloroéthylène, le Wy-14,643 ou le tiadénol induisent la transformation des cellules SHE. D'autres, tels que les herbicides organochlorés 2,4-D et 2,4,5-T ne sont pas transformants sur ces cellules (tableau 15).

D.2. Inhibition des communications intercellulaires.

Le DEHP est le représentant des HPPs le plus étudié sur les GJIC (tableau 16). Les résultats s'accordent à montrer un effet inhibiteur du DEHP sur les communications intercellulaires mesurées par des essais d'inhibition de la coopération métabolique ou par des essais basés sur la microinjection de jaune de Lucifer. Le résultat négatif obtenu par Kornbrust *et al.* (1984) peut s'expliquer par l'utilisation d'une concentration faible de DEHP (300 nM) ; alors qu'Umeda *et al.* (1985) ont probablement utilisé une concentration trop élevée (500 μ M) et cytotoxique de DEHP.

Le MEHP induit une inhibition des GJIC entre les hépatocytes de souris lorsqu'il est utilisé à 10 μ M (Klaunig *et al.*, 1988) et entre les hépatocytes de rat lorsqu'ils sont exposés à 200 μ M de MEHP (Leibold *et al.*, 1994).

Le MCP à très faible concentration (1,6 μM ; Trosko *et al.*, 1982) n'inhibe pas la coopération métabolique entre les cellules V79.

Les effets du clofibrate sur les GJIC n'ont pas été évalués.

Le Wy-14,643, le nafénopin, la 2,4-D et la 2,4,5-T inhibent les communications intercellulaires.

E. Conclusion.

Les HPPs, lorsqu'ils sont administrés *in vivo* à des rongeurs induisent, à court terme, des modifications enzymatiques et morphologiques comme :

(i) l'augmentation du nombre et/ou du volume des peroxysomes dans les hépatocytes, associée à une activation de certaines enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale,

(ii) la prolifération cellulaire des hépatocytes.

Les HPPs sont hépatocancérogènes à plus long terme mais ils ne semblent pas agir en provoquant des dommages directs à l'ADN. En effet, ces composés, de même que leurs métabolites, ne sont pas électrophiles et présentent des capacités génotoxiques faibles.

Les cellules initiées sont présentes à cause de dommages oxydatifs spontanés et il est évident que leur nombre augmente avec l'âge de l'organisme. L'exposition aux HPPs a pour conséquence l'activation du PPAR qui est à l'origine de l'induction des enzymes de la β -oxydation peroxysomale et de la production de radicaux hydroxyl. Ces radicaux semblent présents en quantités insuffisantes pour induire à eux seuls le processus cancérogène mais ils peuvent provoquer une augmentation de la population initiée. La prolifération cellulaire induite par les HPPs peut ensuite permettre la croissance des cellules initiées en foyer de transformation. A un stade plus tardif du développement néoplasique une inhibition de l'apoptose peut aussi intervenir.

Ainsi, l'action des HPPs se situe à plusieurs niveaux du processus de cancérogénèse, l'absence de réactivité directe de ces composés ou de leurs métabolites avec l'ADN de même que la multiplicité de leurs cibles cellulaires tendent à classer les HPPs comme des cancérogènes non-génotoxiques.

Ces données expliquent le choix des HPPs pour l'étude des critères de la cancérogénèse *in vitro*, à savoir la transformation morphologique et l'inhibition des communications intercellulaires.

MATERIEL ET METHODES

I. Produits chimiques utilisés.

benzo(a)pyrène : BaP, $C_{20}H_{12}$
 masse moléculaire : 252,3 g/mol
 n° CAS : 50-32-8.

12-*O*-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate : TPA, $C_{36}H_{56}O_8$
 masse moléculaire : 616,8 g/mol
 n° CAS : 16561-29-8.

clofibrate : $C_{12}H_{15}O_3Cl$
 masse moléculaire : 242,7 g/mol
 n° CAS : 637-07-0.

méthyl clofénapate : MCP, $C_{17}H_{17}O_3Cl$
 masse moléculaire : 304,77 g/mol
 n° CAS : 21340-68-1.

di(2-éthylhexyl)phtalate : DEHP, $C_{24}H_{38}O_4$
 masse moléculaire : 390,56 g/mol
 n° CAS : 117-82-7.

mono(2-éthylhexyl)phtalate : MEHP, $C_{16}H_{22}O_4$
 masse moléculaire : 278,35 g/mol
 n° CAS : 4376-20-9.

II. Milieux de culture.

Deux milieux de culture dont la composition est décrite en annexe IV ont été utilisés.

- le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) auquel sont ajoutés 3,7 ou 2,2 g/l de $NaHCO_3$ pour atteindre un pH de 7,35 ou de 7,0 respectivement (GIBCO-BRL, France),
- le milieu DMEMM (milieu DMEM modifié) qui diffère du précédent par l'utilisation d'une concentration en rouge de phénol de 5 mg/l au lieu de 15 mg/ml (HyClone, USA) et auquel 0,75 g/l de $NaHCO_3$ sont ajoutés pour obtenir un pH de 6,7.

Ces deux milieux de base sont commercialisés sous forme lyophilisée, il sont donc remis en solution et stérilisés par double filtration sur 0,2 μm au fur et à mesure des besoins. 10 à 15% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% d'une solution d'antibiotiques à 50000 $\mu g/ml$ de streptomycine et 50000 IU/ml de pénicilline sont ajoutés avant utilisation. Le milieu liquide est additionné de 2% de L-glutamine à 200 mM si le milieu reconstitué a plus de trois semaines.

Remarques

♦ Les milieux DMEM de pH 7,35 et 7,0 et le milieu DMEMM de pH 6,7 ont été utilisés au cours des essais de transformation morphologique des cellules SHE. Le milieu DMEM à pH 7,0 a été utilisé pour la culture des cellules SHE et V79 au cours de toutes les expériences relatives aux communications intercellulaires. Pour simplifier les commentaires, nous parlerons de “milieu complet” pour le milieu DMEM de pH 7,0 avec SVF et 1% d’antibiotiques sachant que la quantité de sérum ajoutée est toujours de 15% pour les cellules SHE et 10% pour les cellules V79.

♦ L’incubation des cellules dans une atmosphère humidifiée à 37°C se fait toujours avec 10% de CO₂ pour les cellules SHE et avec 5% de CO₂ pour les cellules V79.

♦ Les cellules SHE ont été obtenues à partir d’embryons et préparées au laboratoire. Les cellules V79, résistantes et sensibles à la 6-thioguanine nous ont été données par le Dr. Z. Elias de l’INRS de Nancy.

♦ Tous les produits chimiques cités ont été dissous dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO), les solutions ont été conservées à -20°C et diluées avec le milieu juste avant traitement des cellules.

♦ Pour les expériences relatives à la phosphorylation et à la localisation des connexines, seules les cellules V79 sensibles à la 6-TG ont été utilisées (des expériences préliminaires ont montré que les V79 sensibles et résistantes répondaient de manière identique).

♦ Les deux types cellulaires (V79 et SHE) sont conservés dans l’azote liquide, une étape de “décongélation - mise en culture - croissance” précède toute utilisation des cellules.

III. Essai de transformation morphologique sur cellules SHE.

A. Principe général de l’essai.

Ce protocole, originalement décrit par Berwald et Sachs (1963, 1965) et modifié par Pienta *et al.* (1977) permet d’évaluer le potentiel transformant d’une substance sur des cellules primaires diploïdes.

L’essai est basé sur la formation de colonies qui présentent un phénotype transformé, ces colonies sont obtenues après 7 jours de culture de cellules SHE ciblesensemencées en densité clonale. Les cellules cibles sont cultivées sur une couche nourricière de cellules SHE irradiées à 5000 rads qui ne se divisent plus mais favorisent la croissance des cellules cibles. La substance testée est mise en solution dans le milieu de culture et laissé au contact des cellules pendant les 7 jours de l’essai.

B. Préparation des cellules.

Des hamsters femelles, âgées d'environ 3 mois sont accouplées pendant une nuit en période d'oestrus, avec des mâles de 3 à 4 mois. Le premier jour de gestation correspond au jour où les femelles sont séparées des mâles. Pour garantir la présence d'une femelle fécondée, 2 ou 3 femelles sont accouplées.

Après 12 à 13 jours de gestation, une des femelles gravides est sacrifiée après anesthésie à l'éther et les embryons prélevés stérilement. Les embryons sont alors rincés 2 fois au tampon phosphate (PBS) et les organes différenciés à ce stade comme les yeux, le coeur et les viscères sont retirés.

Au cours des étapes suivantes, les embryons sont préparés individuellement ou par lots de 2. Ils sont découpés finement et subissent trois digestions successives en Erlenmeyer par la dispase : 10 ml de dispase à 1,2 unité/ml. La digestion est réalisée sous agitation magnétique pendant 10 min à 37°C.

Le surnageant de cette 1^{ère} digestion est éliminé, la fraction tissulaire est reprise et soumise à 2 autres digestions par 25 ml de dispase à 1,2 unité/ml pendant 15 min à 37°C.

Les surnageants de 2^{de} et 3^{ème} digestions sont récupérés après filtration sur gaze stérile afin d'éliminer les petits fragments et agglomérats cellulaires. L'action de la dispase est stoppée par ajout de milieu complet de pH 7,0 contenant 15% de SVF.

Les surnageants sont centrifugés pendant 10 min à 1000 tours/min. Les cellules contenues dans les culots sont remises en suspension dans du milieu complet de pH 7,0. Les cellules viables sont dénombrées en présence de bleu trypan,ensemencées à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 10 cm de diamètre (Corning) et mises à incuber. Le milieu est renouvelé après 24 h.

Après 48 h d'incubation, les cellules (à 80-90% de confluence) sont détachées par trypsinisation (trypsine 0,25% dans du PBS) et congelées dans du milieu de pH 7,0 à 4°C contenant 10% de SVF et 10% de DMSO. La congélation se fait par paliers successifs : ½ h à 4°C, 3 h 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 est ensuite testé pour évaluer l'efficacité de clonage (EC) et la transformation morphologique (Tf) induite par 1 µg/ml BaP (4 µM). Le lot de cellules donnant la meilleure réponse, pour les deux critères cités, sera retenu pour servir de stock de cellules cibles au cours des essais de transformation. Les cellules des lots non utilisés seront remises en culture pour servir de cellules nourricières après irradiation à 5000 rads et stockage dans l'azote liquide.

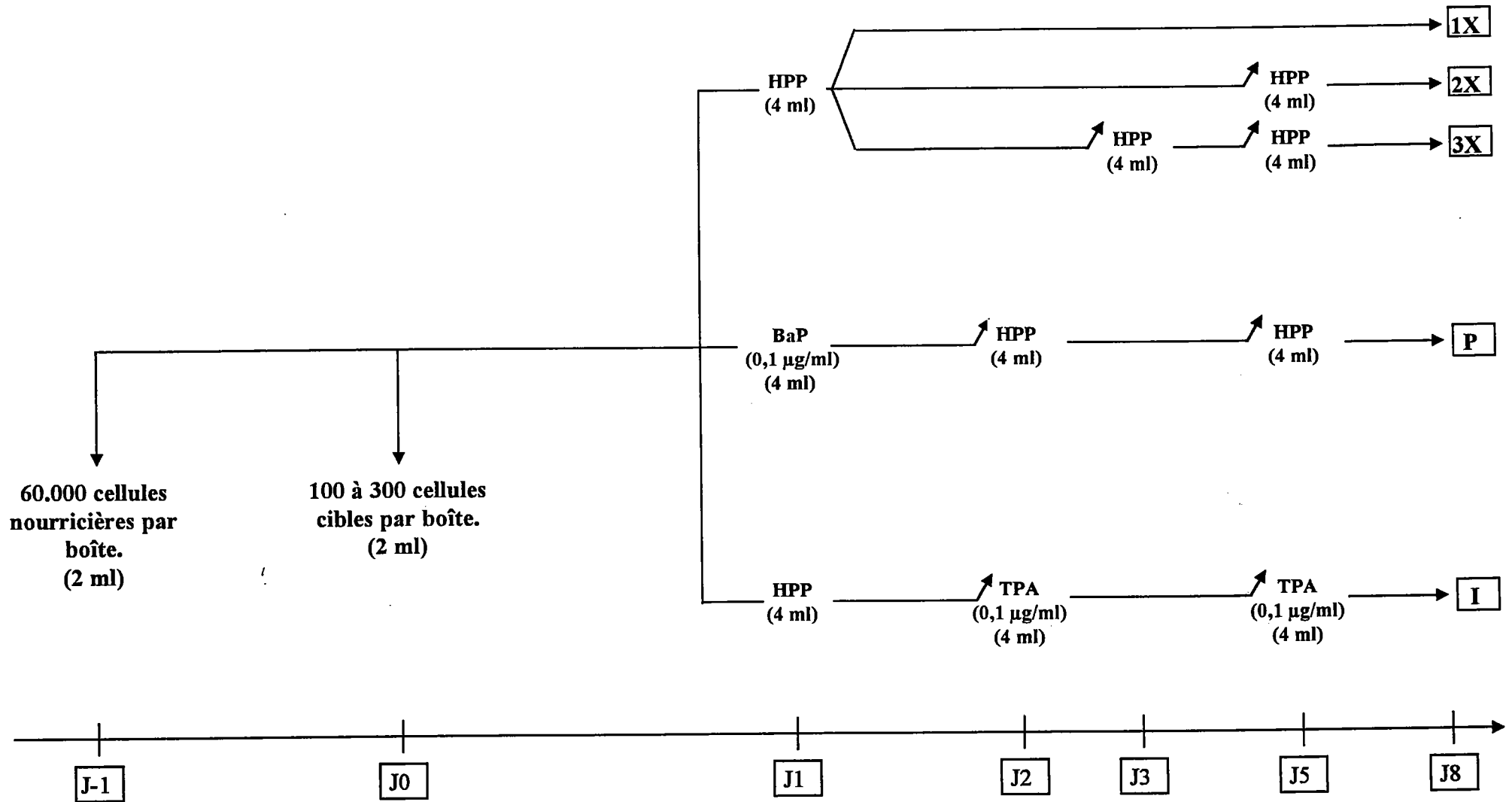


Figure 10. Protocoles utilisés pour l'étude de la transformation des cellules SHE à pH 7,35 et 7,0 :

- ♦ effets du HPP testé après une (1X), deux (2X) ou trois (3X) applications,
- ♦ effets du traitement séquentiel par le BaP et le HPP (P),
- ♦ effets du traitement séquentiel par le HPP et le TPA (I).

↗ : changement de milieu.

C. Protocole d'initiation/promotion.

♦ Principe.

Le protocole d'initiation/promotion a été proposé par Chouroulinkov et Lasne (1978) pour augmenter les performances de l'essai. Ce protocole permet de mettre simultanément en évidence le potentiel transformant d'une substance et son caractère initiateur et/ou promoteur de tumeur.

♦ Protocole.

60.000 cellules nourricières sont mises en culture à J-1 dans 2 ml de milieu complet (pH 7,35 ou 7,0) dans des boîtes de 6 cm de diamètre (Corning).

A J0, 100 à 300 cellules cibles sont ajoutées dans 2 ml de milieu complet.

Trois types de traitements sont réalisés selon le protocole schématisé dans la figure 10 :

Effet transformant complet.

- pour une application (1X), le HPP testé est ajouté à J1 dans 4 ml de milieu complet, le milieu reste inchangé pendant les 7 jours de l'essai,

- pour deux applications (2X), le premier traitement à J1 est réalisé comme précédemment, à J5 le milieu est retiré et remplacé par 4 ml de milieu complet neuf contenant la même concentration du HPP testé,

- pour trois applications (3X), le premier traitement est réalisé à J1, le milieu est ensuite retiré et remplacé à J3 et J5 par du milieu complet neuf contenant la même concentration du HPP testé.

Effet promoteur (P).

A J1, les cellules sont exposées à un initiateur connu : le BaP à la concentration non transformante de 0,1 µg/ml (0,4 µM). Après 24 h de traitement, le milieu est retiré et remplacé par du milieu neuf contenant le HPP testé à la concentration voulue, un second traitement par le HPP est réalisé à J5 par renouvellement du milieu.

Effet initiateur (I).

Le HPP testé est ajouté à J1 et laissé au contact des cellules pendant 24 h. A J2 et J5 le milieu est retiré et remplacé par du milieu complet neuf contenant 0,1 µg/ml (0,16 µM) de TPA.

Dans tous les cas, à J8, les boîtes sont vidées et les cellules rincées au PBS, fixées à l'éthanol absolu et colorées au Giemsa (10% dans de l'eau distillée).

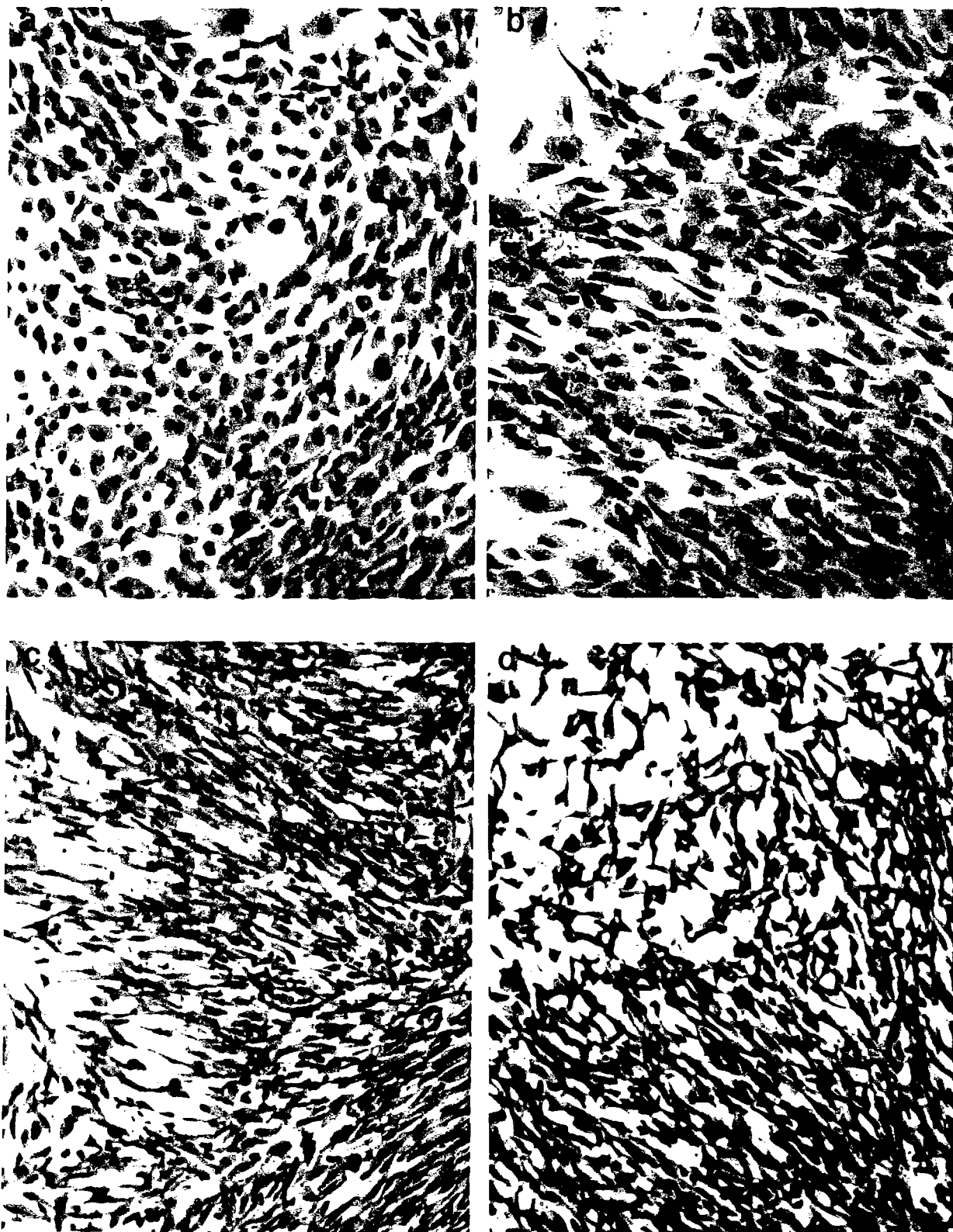


Figure 11. Colonies normales de cellules SHE cultivées dans du milieu de pH 7,35 (a), 7,0 (b) ou 6,7 (c) ; et colonie transformée par le BaP 1 $\mu\text{g/ml}$ (4 μM) dans du milieu de pH 7,0 (d).

10 boîtes sont réalisées pour chaque concentration de HPP testé et chaque type de traitement. Le BaP à 1 µg/ml (4 µM) est utilisé comme témoin positif : les cellules sont exposées de J1 à J8 sans changement de milieu. A chaque type de traitement correspond un contrôle négatif dans lequel le HPP est remplacé par une quantité de DMSO équivalente (0,2% au maximum). Chaque série d'essai est réalisée au moins deux fois.

L'efficacité de clonage et la fréquence de transformation morphologique sont évaluées par observation des colonies à la loupe binoculaire (Olympus) (figure 11).

D. pH acide.

♦ Principe

L'utilisation de milieu acide (pH 6,7) a été préconisée par LeBoeuf *et al.* (1986, 1987) pour augmenter la sensibilité de l'essai avec seulement une application de la substance. La procédure utilisée simplifie donc l'expérimentation (procédure 1X de la figure 10).

♦ Protocole

Les différences par rapport au protocole précédent concernent:

- l'utilisation de milieu acide (pH 6,7),
- le nombre de cellules nourricières (40.000)ensemencées dans les boîtes à J-1,
- le nombre de cellules cibles (75 à 150)ensemencées à J0,
- les traitements sont réalisés seulement à J1 sans renouvellement de milieu pendant les 7 jours de l'essai.

E. Expression des résultats.

A l'inverse des cellules constituant les colonies normales qui croissent de manière ordonnée et respectant l'inhibition de contact, les cellules constituant des colonies transformées ont tendance à s'enchevêtrer et à croître anarchiquement. De plus, l'architecture cellulaire étant modifiée, les cellules transformées présentent une augmentation du ratio noyau/cytoplasme (figure 11d).

L'efficacité de clonage est définie comme le nombre de colonies formées/le nombre de cellules ciblesensemencées x 100. Ce pourcentage permet d'évaluer la toxicité de la substance étudiée.

La fréquence de transformation morphologique est le nombre de colonies transformées/le nombre total de colonies comptées x 100.

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

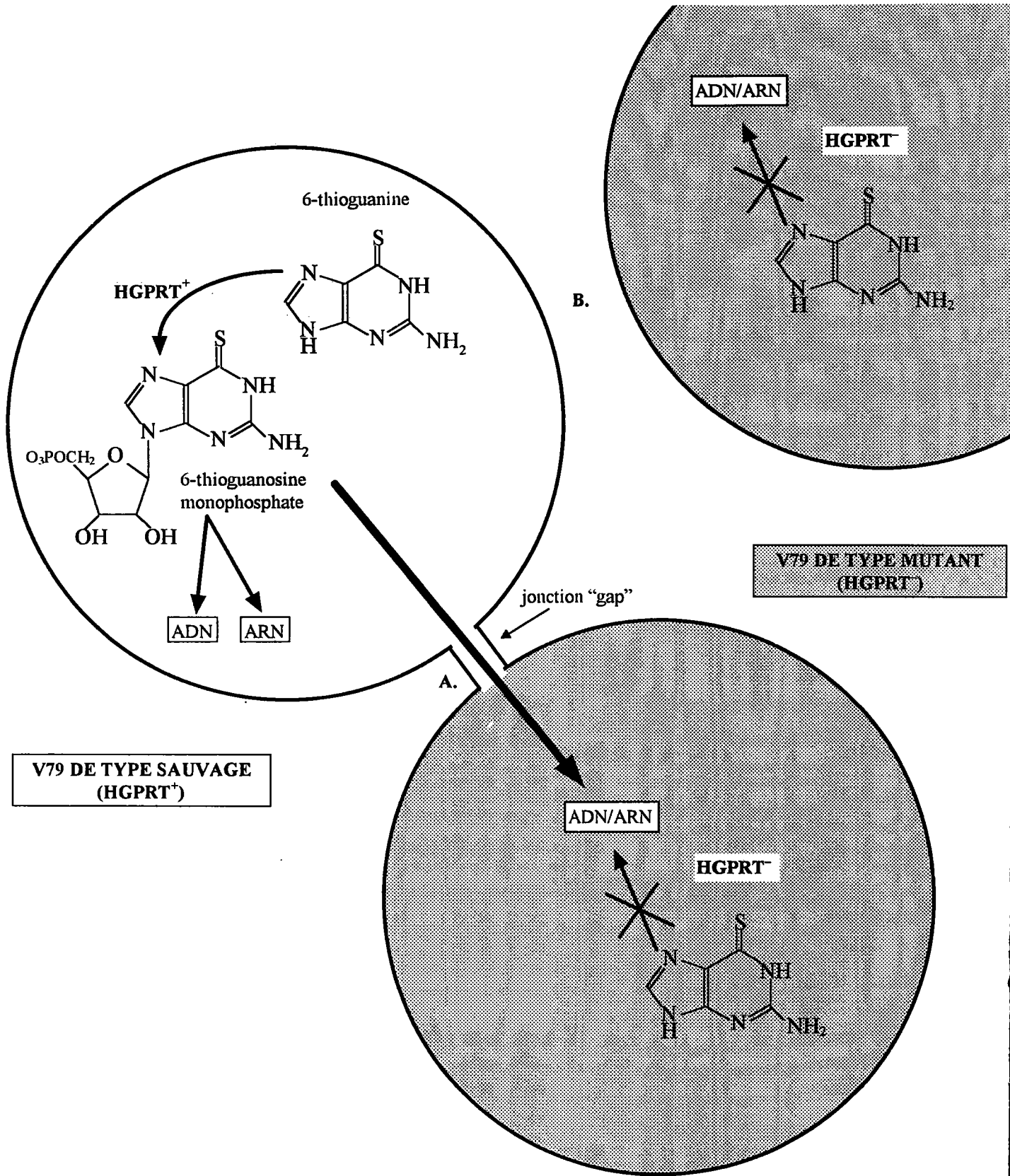


Figure 12. Illustration du mécanisme de la coopération métabolique entre cellules de la lignée V79 (d'après Trosko *et al.*, 1982).

Les jonctions "gap" sont opérationnelles, le métabolite toxique de la 6-TG passe dans les cellules HGPRT⁻ qui ne pourront pas se développer (A).

Les GJIC sont inhibées, la 6-thioguanosine monophosphate ne peut pas passer dans les cellules HGPRT⁻ lesquelles pourront former des colonies après 8 jours (B).

IV. Études des communications intercellulaires.

A. Par inhibition de la coopération métabolique des cellules V79.

♦ Principe.

L'essai d'inhibition de la coopération métabolique (CM) des cellules de hamster chinois V79 (Yotti *et al.*, 1979) est basé sur la survie de cellules mutantes, déficientes en hypoxanthine-guanine phosphoribosyle transférase (HGPRT⁻) ensemencées en densité clonale en présence d'une quantité importante de cellules de type sauvage HGPRT⁺.

L'enzyme HGPRT catalyse la conversion de l'hypoxanthine et de la guanine en nucléoside 5'-monophosphate correspondant. Elle peut aussi catalyser la phosphoribosylation de plusieurs analogues de purines tels que la 6-thioguanine (6-TG), la 8-azaguanine et la 6-mercaptopurine. Le métabolite produit est alors incorporé à l'ADN et provoque la mort cellulaire (figure 12). Les cellules HGPRT⁻ ne peuvent pas phosphoribosyler les purines et sont donc résistantes à la toxicité des analogues de purines cités plus haut.

Quand des cellules de mammifères sont cultivées à une densité permettant le contact entre les cellules, des jonctions de type "gap" se forment. Quand des cellules HGPRT⁺ et HGPRT⁻ sont en contact dans du milieu contenant un analogue de purine, le métabolite toxique formé dans les cellules HGPRT⁺ (sensibles à la 6-TG ; 6-TGs) passe dans les HGPRT⁻ (résistantes à la 6-TG ; 6-TGr) lorsque les jonctions sont fonctionnelles. Ceci induit une toxicité et la disparition des cellules résistantes. En présence d'une substance inhibitrice des GJIC, ce transfert n'a pas lieu et les cellules 6-TGr se développent normalement.

Un effet inhibiteur de la coopération métabolique entre cellules se traduira donc par la croissance des cellules HGPRT⁻ avec formation de nombreuses colonies après une semaine de culture. L'absence d'effet inhibiteur aura au contraire pour conséquence la mort de la plupart des cellules 6-TGr (HGPRT⁻) et la formation de seulement quelques colonies isolées.

L'essai consiste donc à cocultiver une forte densité de cellules V79 HGPRT⁺ (6-TGs) avec un petit nombre de V79 mutantes HGPRT⁻ (6-TGr) en présence à la fois de 6-thioguanine et du produit testé. Après 8 jours de culture, le comptage des colonies de cellules 6-TGr ayant survécu permet d'évaluer le taux de récupération des cellules résistantes initialement ensemencées et donc l'inhibition de la CM induite par les différentes doses de produit testé.

♦ Protocole.

A J0, les cellules sont mises en cultures dans 4 ml de milieu complet dans des boîtes de 6 cm de diamètre à raison de :

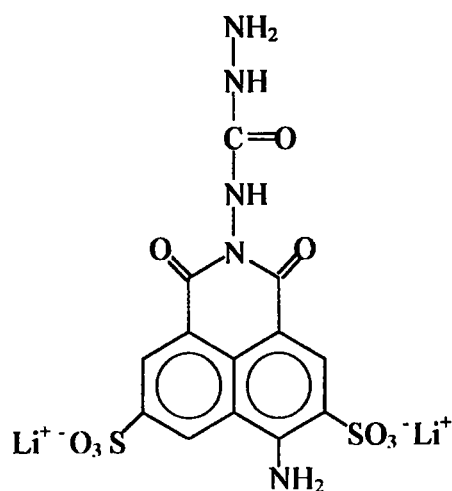


Figure 13. Structure moléculaire du jaune de Lucifer (sel de dilithium, PM = 457,24 g/mol).

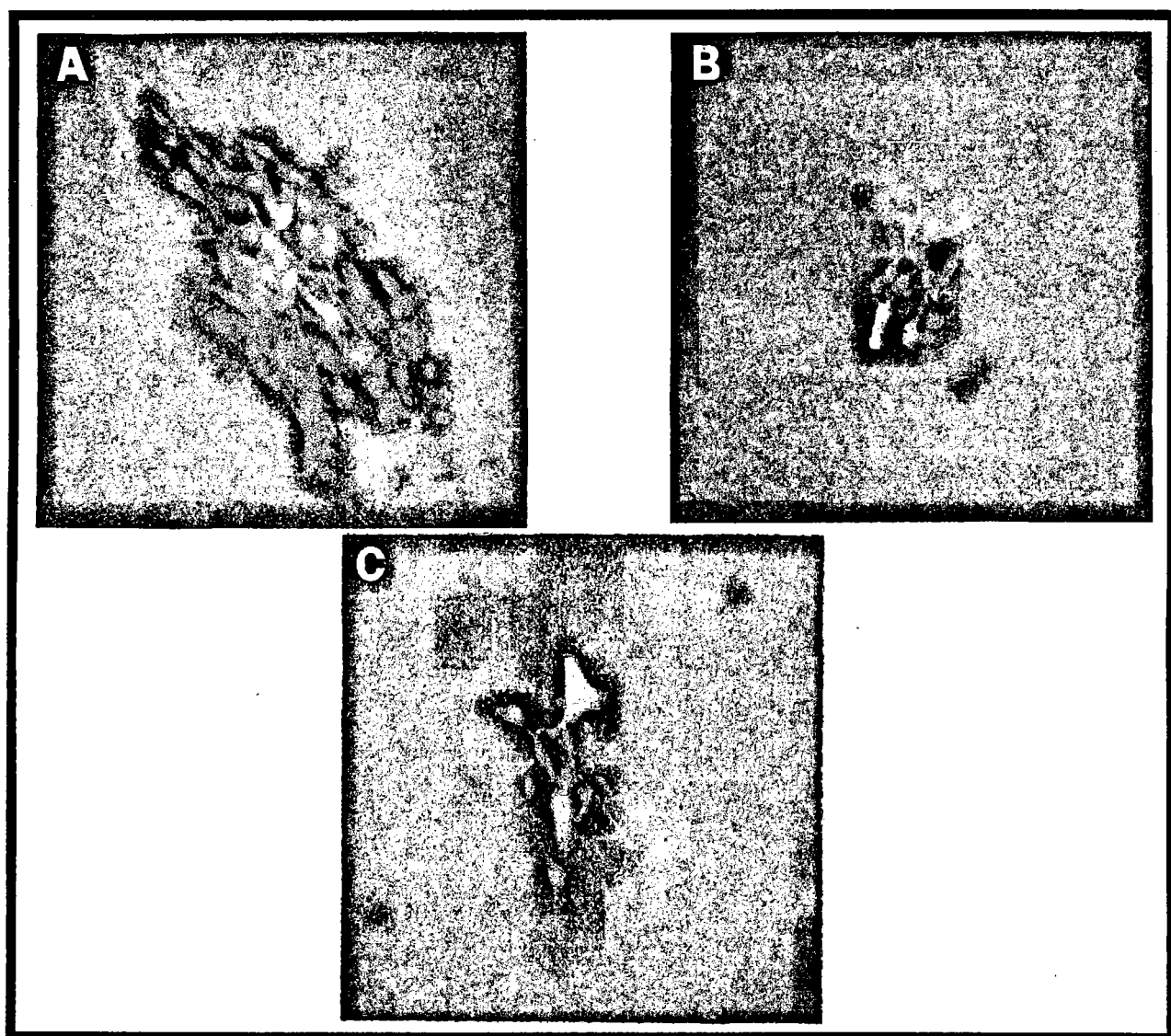


Figure 14. Tapis de cellules SHE (A) et V79 (B) non-traitées après injection de jaune de Lucifer. Cellules SHE exposées au TPA 0,1 µg/ml (0,15 µM) pendant 1 h (C).

- ♦ 700.000 cellules V79 6-TGs (HGPRT⁺) et 100 cellules V79 6-TGr (HGPRT⁻) dans les boîtes de la série A pour l'étude de l'inhibition de la coopération métabolique,
- ♦ 100 cellules V79 6-TGr dans les boîtes de la série B servant à évaluer la cytotoxicité du produit testé sur les cellules résistantes.

Après 4 heures d'incubation correspondant au temps nécessaire à la fixation des cellules, les cellules sont traitées par ajout de 4 ml de milieu contenant le produit à tester et la 6-TG (5 µg/ml en concentration finale dans le milieu).

Les cultures sont alors mises à incuber dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à J3 où le milieu est retiré et remplacé par du milieu ne contenant que la 6-TG à 5 µg/ml.

A J8, les boîtes sont vidées, rincées au PBS, les cellules sont fixées au méthanol absolu et colorées au Giemsa (10%).

A chaque dose de produit testé correspondent dix boîtes de la série A et dix boîtes de la série B, le TPA à 1 ng/ml (1,6 nM) est utilisé comme témoin positif ; la concentration maximale de DMSO utilisée est de 0,15%.

Le taux de récupération des cellules résistantes est défini comme le rapport du nombre de colonies comptées dans les boîtes de la série A/au nombre de colonies dans les boîtes de la série B ayant subi le même traitement x 100.

♦ Analyse statistique:

La significativité des résultats des essais d'inhibition de la CM a été calculée à partir du nombre de colonies comptées dans *n* boîtes par une analyse de variance (Anova).

B. Par transfert de jaune de Lucifer.

♦ Principe.

Cette méthode simple et rapide de l'évaluation du caractère fonctionnel des communications intercellulaires est basée sur l'injection d'un colorant fluorescent dont la molécule est suffisamment petite pour traverser les jonctions "gap" des cellules : le jaune de Lucifer (figure 13 ; Stewart, 1978). Les cellules sont cultivées en tapis et l'injection de colorant a lieu lorsque ce tapis a atteint environ 75-80% de confluence. Le nombre de cellules couplées à la cellule injectée dans les cultures traitées permet de mettre en évidence, par comparaison avec le contrôle correspondant, une action sur les GJIC.

♦ Protocole.

Les conditions de l'essai sont identiques pour les cellules SHE et V79.

			NT			M1		E1
rat	1	MGDWSALGKL	LDKVQAYSTA	GGK	VWLSVLF	IFRILLLGTA	VE	SAWGDEQS
souris								AFRCNTQQPG
humain								
				M2				CL
r	61	CENVCYDKSF	PISHVRE	WVL	QIIFVSVPTL	LYLA	HVFYVM	RKEEKLNKKE
s								EELKVAQTDG
h								
						M3		
r	121	VNVEMHLKQI	EIKKFKYGIE	EHGKVKMRGG	ILRTYIISIL	FKSVFEVAF		LIQWYIYGFS
s								
h		D					I	
			E2			M4		
r	181	LSAVYTCKRD	PCPHQVDCFL	SRPTEKTI	IFI	IFMLVVSLVS	LALNIIELFY	VFFKGVKDRV
s								
h								
r	241	KGRSDPYHAT	TGPLSPSKDC	GSPKYAYFNG	CSSPTAPLSP	MSPPGYKLVT	GDRNNSSCRN	
s								
h		K	S	A	A	Q		
					CT			
r	301	YNKQASEQNW	ANYSAEQNRM	GQAGSTISNS	HAQPFDFPDD	NQNAKVAAG	HELQPLAIVD	
s						S		
h							S	L
r	361	QRPSSRASSR	ASSRPRPDDL	EI				
s								
h								

Figure 15. Séquence protéique de la Cx43 chez le rat et acides aminés homologues chez la souris et l'homme. En gras, l'épitope reconnu par l'anticorps dirigé contre la Cx43 utilisé au cours de notre étude.

La molécule comporte 4 régions transmembranaires (M1-M4), deux boucles extracellulaires (E1 et E2) contenant des résidus cystéine caractéristiques et trois portions cytoplasmiques : les domaines amino (NT) et carboxy (CT) terminaux et la boucle cytoplasmique centrale (CL).

Les cellules sont mises en culture dans 2 ml de milieu complet dans des boîtes de 3 cm de diamètre (Corning). Le nombre de cellulesensemencées peut être modulé en fonction de la vitesse de division des cellules qui peut varier d'un lot à l'autre. Au cours de cette étude, nous avonsensemencé :

- 125.000 cellules/ml pour réaliser la microinjection environ 48 h plus tard,
- 50.000 cellules/ml pour réaliser la microinjection environ 72 h plus tard.

Les cultures sont laissées à incuber à 37°C dans une atmosphère à 10 ou 5% de CO₂, selon le type cellulaire utilisé, jusqu'au moment du traitement. Le milieu complet est alors remplacé par le même milieu sans antibiotique contenant soit le produit testé à la concentration voulue, soit le TPA comme témoin positif (0,15 µM ; 0,1 µg/ml), soit le DMSO comme témoin solvant (0,2% au maximum).

Après un temps d'exposition qui peut varier de 5 min à 4 h pour les essais courts et de 24 à 48 h pour les traitements prolongés, le jaune de Lucifer (à 10% dans LiCl 0,33 M) est injecté dans environ 15 cellules par boîte sous un microscope à inversion (IMT-2, Olympus) à l'aide d'un capillaire finement étiré (étireuse verticale, Narishige). Le milieu d'incubation n'est pas changé avant les injections. Après que les injections aient été réalisées, les cultures sont placées à l'étuve pendant 5 min, puis sont rincées au PBS et fixées au PBS contenant 2% de formaldéhyde. Une fois la fixation réalisée, le comptage des cellules fluorescentes couplées à chaque cellule injectée est réalisé au microscope (figure 14).

♦ Analyse statistique.

L'analyse statistique a été effectuée par une analyse de variance (Anova).

La significativité est évaluée en comparant les résultats obtenus dans les boîtes traitées avec ceux obtenus dans le contrôle-DMSO correspondant. Les comparaisons concernent le "nombre de cellules couplées à une cellule injectée" (moyenne ± SEM pour *n* injections) même si les résultats sont parfois présentés en "pourcentages du contrôle".

V. Études des connexines.

Nous avons étudié à la fois la phosphorylation et la localisation de la connexine 43 dans les deux types cellulaires. Dans tous les cas, nous avons utilisé des anticorps primaires polyclonaux obtenus par immunisation de lapins et dirigés contre les 19 derniers acides aminés de l'extrémité carboxyterminale de la connexine 43 de rat (figure 15). Ces anticorps nous ont été fournis par le Dr. E. Rivedal (Department for Environmental and Occupational Cancer à Oslo).

A. Mise en évidence de la connexine 43 et de ses formes phosphorylées par "Western blot".

♦ Principe.

Cette technique permet de visualiser la connexine 43. Après migration des protéines extraites d'une culture cellulaire sur un gel de polyacrylamide et transfert sur une membrane de nitrocellulose, une double hybridation est réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la protéine cible, puis des anticorps dirigés contre les anticorps précédents. Les anticorps secondaires sont marqués par une enzyme et la révélation se fait par ajout de son substrat dont le produit est coloré.

♦ Protocole.

Le protocole utilisé est identique pour les cellules SHE et V79, les compositions des tampons et des gels se trouvent dans l'annexe V.

Les cellules sont mises en culture dans des petites boîtes (3 cm de diamètre) et traitées de manière à être confluentes à 75-80% au moment de l'échantillonnage. Toutes les étapes décrites ensuite sont réalisées à température ambiante. Les cellules sont détachées et mises en suspension dans 200 µl de tampon d'échantillonnage.

Chaque échantillon est placé dans un cône diluteur et soniqué de manière à casser l'ADN qui perturberait le pipetage et le dépôt sur le gel. Avant dépôt, une aliquote de 10 µl de chaque échantillon est prélevé, les protéines sont précipitées dans l'acétone, centrifugées et resolubilisées dans NaOH 1M. Le dosage des protéines est réalisé grâce au kit-protein Bio-Rad.

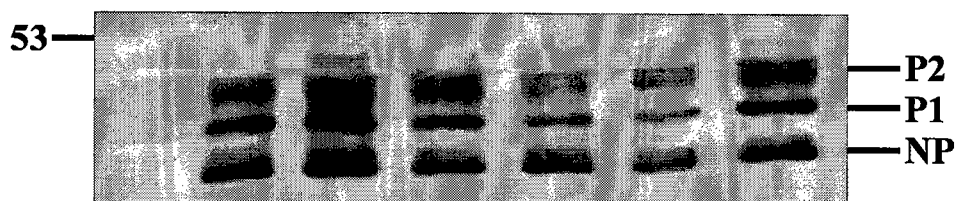
8 µg (5 µl) de protéines sont déposés dans les puits du gel de concentration (utilisation du matériel Bio-Rad : Mini-Protean II). 2,5 µl d'étalon de poids moléculaires (Bio-Rad, prestained SDS-PAGE) sont également déposés dans un puits. La migration à travers le gel de concentration et le gel de séparation dure environ 45 min à 200 volts (la migration est arrêtée quand le front est à 2 mm du bord inférieur du gel).

Le transfert sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) a lieu dans le Mini Trans-Blot Module Bio-Rad adapté à la cuve Mini-Protean, pendant 1 h à 100 volts.

Une fois le transfert terminé, les membranes sont laissées pendant 1 h dans la solution bloquante (5% lait écrémé déshydraté dans du PBS) pour éviter les interactions non-spécifiques entre protéines et anticorps primaires.

L'hybridation avec les anticorps primaires est réalisée en enfermant les membranes dans des petits sacs plastiques de manière à limiter le volume d'anticorps utilisé. Les anticorps primaires sont dilués au 1/1500 dans la solution d'hybridation (1% lait écrémé

A.



B.

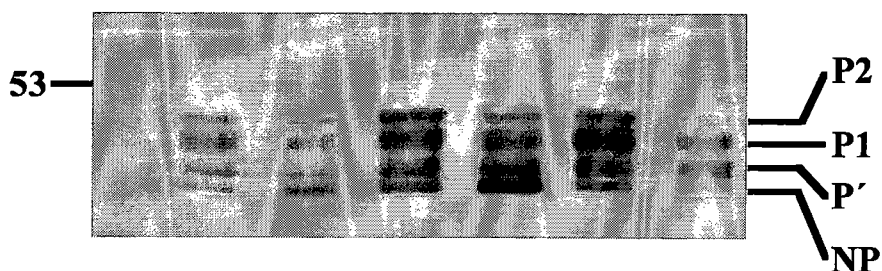


Figure 16. Western blot de la connexine 43 obtenu à partir de cellules SHE (A) et V79 (B).

La colonne de gauche correspond à l'étalon de poids moléculaires, les autres colonnes aux protéines extraites de cultures non-traitées.

Les cellules SHE présentent un profil de trois bandes principales : les bandes NP (non-phosphorylée), P1 et P2.

La connexine 43 des cellules V79 migre sous forme de quatre bandes principales : les bandes NP, P', P1 et P2.

L'utilisation d'une nomenclature identique (Sáez *et al.*, 1993) pour nommer les protéines phosphorylées ne signifie pas que les groupements phosphates sont identiques dans les deux types cellulaires.

déshydraté dans du PBS). Les membranes sont laissées au contact des anticorps primaires pendant 1 h sous agitation douce.

Après trois lavages de 10 min dans du PBS contenant 1% de Tween 40/80, l'hybridation avec les anticorps secondaires est réalisée suivant le même procédé : les anticorps, dirigés contre les anticorps de lapins, sont dilués au 1/1000 dans la solution d'hybridation.

Les membranes sont à nouveau rincées trois fois dans du PBS contenant 1% Tween 40/80 et la révélation est réalisée en les mettant au contact de la solution de révélation (chloronaphtol + H₂O₂, substrats de la "horse radish peroxydase" à laquelle l'anticorps secondaire est lié de manière covalente). Quelques minutes d'attente sont nécessaires à l'apparition d'une coloration violette. Les membranes sont ensuite rincées à l'eau et séchées.

Lorsque ce type d'expérience est réalisé avec les cellules SHE, on observe dans les témoins non-traités 3 bandes majeures (figure 16A) correspondant aux différentes formes phosphorylées de la connexine 43. Avec les cellules V79, 4 bandes sont obtenues (figure 16B).

B. Localisation de la connexine 43 par immunofluorescence.

♦ Principe.

Cette technique permet de localiser la connexine 43 dans des cellules vivantes cultivées en tapis, en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine.

♦ Protocole.

Les cellules V79 ou SHE sont mises en culture et traitées de manière à atteindre 75-80% de confluence au début du marquage. Toutes les étapes décrites ensuite sont réalisées à température ambiante.

Après rinçage au PBS, les cellules sont fixées et perméabilisées à -20°C pendant ½ h dans du méthanol absolu. Les cultures sont lavées dans du PBS et les éventuels sites de liaison non-spécifiques sont bloqués en laissant les cellules au contact de PBS contenant 10 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB) pendant 1 h.

Le PBS contenant 10 mg/ml SAB est retiré et remplacé par du PBS contenant 10 mg/ml SAB et les anticorps primaires dirigés contre la Cx43, dilués au 1/500.

Une heure plus tard, les cellules sont rincées trois fois au PBS et la seconde hybridation est réalisée pendant 1h à l'aide des anticorps secondaires dilués au 1/1000 dans du PBS contenant 10 mg/ml SAB. Ces anticorps secondaires sont biotinylés et dirigés contre les anticorps de lapin.

A.



B.

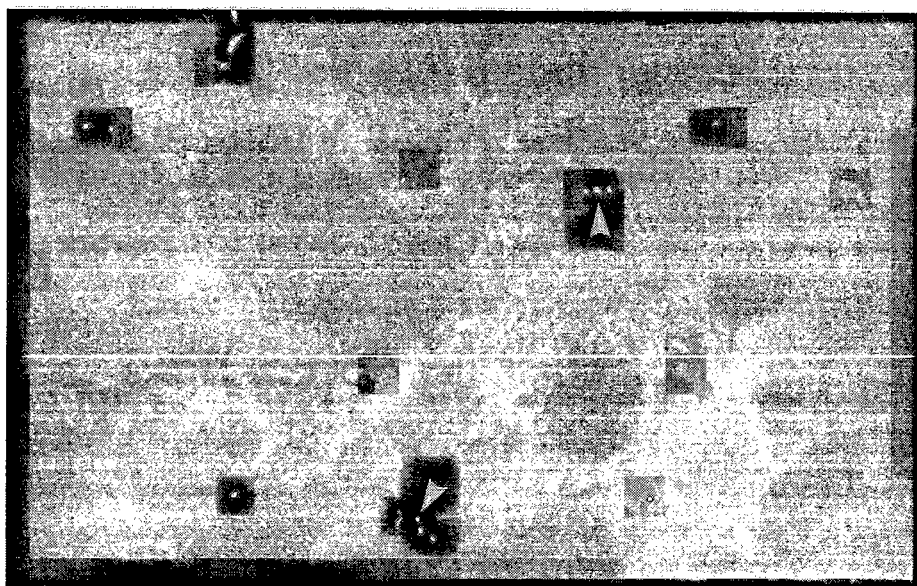


Figure 17. Signal fluorescent produit par la connexine 43 dans des cellules SHE (A) et V79 (B) non traitées.

Les triangles indiquent des plaques jonctionnelles à la bordure des cellules. Les flèches montrent les taches intracellulaires présentes dans les cellules SHE. La barre représente environ 10 μ M.

Après trois rinçages au PBS, la streptavidine, qui a une très forte affinité pour la biotine est ajoutée (diluée au 1/1000 dans du PBS contenant 10 mg/ml SAB) et laissée au contact des cellules pendant 1 h.

Après 5 ou 6 nouveaux lavages au PBS, les cellules sont “plastifiées” entre une lamelle de verre et la surface de la boîte par ajout de 20 µl de Mowiol (poly vinyle alcool, Aldrich).

La streptavidine utilisée est marquée par de la fluorescéine isothiocyanide (FITC), fluorescente sous UV. Les cellules sont donc observées grâce à un microscope à épifluorescence (figure 17).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

OBJECTIF GENERAL DE L'ETUDE

Dans ce travail, quatre substances appartenant à la catégorie des HPPs ont été étudiées in vitro comme modèles de cancérrogènes agissant par des mécanismes épigénétiques.

Leurs effets sur la transformation morphologique des cellules SHE et les communications intercellulaires ont été évalués dans le but de tester les capacités de ces deux critères à prédire un potentiel cancérrogène, et à identifier des cancérrogènes non mutagènes.

Parmi les dérivés sélectionnés, le DEHP et le clofibrate avaient déjà fait l'objet d'études in vitro et s'étaient révélés transformants dans certaines conditions. L'étude a été étendue à deux autres substances moins bien connues :

- le MEHP, métabolite actif du DEHP,*
- le MCP, analogue structural du clofibrate, mais nettement plus actif in vivo comme hépatocancérrogène et totalement dénué de génotoxicité in vitro.*

Les effets des HPPs sur les communications intercellulaires étant mal connus, nous avons étudié tout particulièrement l'action des quatre substances choisies sur :

- le caractère fonctionnel des GJIC,*
- la phosphorylation et la localisation de la connexine 43.*

Deux modèles cellulaires ont été utilisés. La transformation cellulaire a été étudiée à l'aide des cellules SHE, les communications intercellulaires sur les cellules SHE et les cellules de la lignée V79.

Ces objectifs nous ont amenés à procéder par étapes, qui ont consisté à :

1. comparer *in vitro* le MCP et le clofibrate, et déterminer si leurs effets sur la transformation morphologique et les communications intercellulaires reflétaient leur activité et leur degré de toxicité *in vivo*,
2. élargir l'étude de la transformation cellulaire aux quatre HPPs, tout en étudiant les conditions expérimentales qui favorisent l'expression du phénotype transformé,
3. étudier l'action des quatre HPPs sur les communications intercellulaires, en particulier *via* les jonctions "gap".

I. Transformation morphologique et inhibition des communications intercellulaires des cellules SHE par le clofibrate et le MCP (annexe I, publication 1).

Cruciani V., Rast C., Durand M.-J., Nguyen-Ba G. et Vasseur P., 1997. Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 18, 701-706.

A. Introduction

Le clofibrate et le MCP sont deux analogues structuraux, hypolipémiants, inducteurs de la prolifération peroxysomale (Reddy, 1974) et hépatocancérogènes in vivo (Reddy et al., 1982). Le MCP a des effets plus puissants que le clofibrate. Au plan de la cancérogénèse notamment, Reddy et al. (1982) ont montré qu'une même incidence tumorale était obtenue pour des doses cinq fois plus faibles de MCP que de clofibrate : 100% de tumeurs hépatiques étaient relevés après 75 semaines d'une administration quotidienne de 1000 ppm de MCP à des rats F344, contre 5000 ppm de clofibrate pour une incidence tumorale de 90%.

Nous avons étudié et comparé le potentiel transformant de ces deux HPPs sur les cellules SHE et leurs effets sur les communications intercellulaires.

Cette étude permettait simultanément d'évaluer le pouvoir prédictif de ces deux critères pour la détection in vitro des cancérogènes. Il était intéressant de voir si la toxicité plus élevée du MCP in vivo, était reflétée par l'induction de la transformation morphologique et l'inhibition des communications intercellulaires via les jonctions "gap" (GJIC).

Les essais de transformation morphologique ont été réalisés dans du milieu DMEM de pH 7,0 contenant 15% de sérum de veau foetal. Trois modalités ont été utilisées parallèlement :

- les cellules ont été exposées à chacune des substances étudiées en solution dans le milieu d'essai pendant 7 jours. Les essais ont été réalisés sans changement du milieu ou avec renouvellement du milieu une et deux fois pendant l'exposition,*

- les substances étudiées ont été appliquées en traitement séquentiel, suivant le protocole d'initiation/promotion préconisé par Chouroulinkov et Lasne (1978) :*

- . soit pendant la phase d'initiation (24h) précédant une exposition au TPA,*
- . soit pendant la phase de promotion qui suit un traitement par le BaP.*

Les GJIC ont été étudiées par microinjection de jaune de Lucifer dans des cellules en tapis confluent et par le suivi de son transfert aux cellules voisines (Rivedal et al., 1985).

Tableau 17. Effets du clofibrate et du MCP sur la transformation morphologique des cellules SHE à pH 7,0.

Concentration (μM)	Changements de milieu	clofibrate			MCP		
		EC ^a (%)	Colonies transformées		EC ^a (%)	Colonies transformées	
			ratio ^b	%		ratio ^b	%
(a) HPP seul							
0	/	32	2/1432	0,1	32	4/1447	0.3
50		32	4/1431	0,3	28	7/1239	0.6
100		34	3/1517	0,2	23	8/1013	0.8
150		31	10/1371	0,7*	24	4/1090	0.4
0	J5	38	1/1687	0,1	38	2/1698	0.1
50		36	2/1599	0,1	26	4/1157	0.3
100		34	10/1528	0,7**	26	6/1180	0.5
150		35	4/1552	0,3	28	7/1251	0.6
0	J3 et J5	41	3/1842	0,2	41	3/1832	0.2
50		37	2/1652	0,1	27	7/1226	0.6
100		40	10/1788	0,6*	30	9/1332	0.7*
150		40	7/1814	0,4	25	9/1141	0.8*
(b) BaP + HPP							
0,4 + 0	J2 et J5	29	11/1294	0,9	29	13/1297	1,0
0,4 + 50		24	7/1096	0,6	20	26/877	3,0***
0,4 + 100		22	5/989	0,5	21	23/964	2,4*
0,4 + 150		21	3/947	0,3	21	32/932	3,4***
(c) HPP + TPA							
0 + 0,16	J2 et J5	30	22/1347	1,6	30	23/1336	1,7
50 + 0,16		26	10/1181	0,8	23	33/1038	3,2*
100 + 0,16		24	21/1082	1,9	18	41/804	5,1***
150 + 0,16		27	10/1212	1,1	19	39/855	4,6***

(a) exposition au HPP seul appliqué une, deux ou trois fois ; (b) exposition séquentielle au BaP (0,4 μ M) pendant 24 h suivi de deux applications du HPP à J2 et J5 ; (c) exposition séquentielle au HPP pendant 24 h suivi de deux applications de TPA (0,16 μ M) à J2 et J5.

^a efficacité de clonage.

^b nombre de colonies transformées/nombre total de colonies.

* valeur significativement différentes de leur contrôles respectifs (test du χ^2 ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

B. Résultats.

B.1. Transformation morphologique des cellules SHE.

Le clofibrate et le MCP ont été testés à 50, 100 et 150 μM au cours de trois expériences indépendantes (tableau 17).

Les deux substances, **testées seules selon le protocole standard**, induisent la transformation morphologique des cellules SHE de manières comparables :

- les résultats positifs obtenus avec le clofibrate sont significatifs sans relation dose-effet à 100 μM avec renouvellement du milieu,
- le MCP augmente la fréquence de transformation dès 50 μM , avec renouvellement du milieu à J3 et J5 ; néanmoins les résultats ne deviennent significatifs qu'à partir de 100 μM .

D'une manière générale, la fréquence de transformation est d'autant plus nette et les résultats plus significatifs que le milieu contenant le HPP testé est renouvelé une ou deux fois au cours de l'essai. Cette exposition des cellules en conditions semi-statiques maintient la concentration du composé testé proche du niveau initial.

Lorsque les essais sont réalisés **selon le protocole initiation/promotion**, le clofibrate et le MCP donnent des résultats différents. Des effets d'interaction avec le BaP et le TPA ont été observés avec le MCP à toutes les concentrations testées, mais non avec le clofibrate.

Le MCP potentialise les effets transformants du BaP et du TPA :

- la fréquence de transformation morphologique (Tf) des cellules initiées par le BaP est de 1,0% et atteint 3,4% avec 150 μM de MCP appliqué pendant la phase de promotion.
- la fréquence de Tf est de 1,7% dans le contrôle TPA et passe à 3,2% lors de l'exposition des cellules à 50 μM de MCP pendant la phase d'initiation.

B.2. Communications intercellulaires

Les cellules SHE ont été exposées au clofibrate et au MCP jusqu'à 200 μM pendant des périodes de 5 min à 24 h (figure 18A). Les concentrations étudiées sont plus élevées que celles testées dans les essais de transformation morphologique, les essais de microinjection étant réalisés sur des cellules en tapis, moins sensibles à la cytotoxicité que des cellules en densité clonale.

Le clofibrate n'a pas d'effet sur le transfert de jaune de Lucifer jusqu'à la concentration de 150 μM . Par contre, à partir 175 μM , il induit une forte inhibition des GJIC dès les 5 premières minutes d'exposition ; cette inhibition est suivie d'un retour au niveau du contrôle à partir de 15 min. Lorsque la concentration de clofibrate augmente (200 μM), la durée de l'inhibition observée est plus longue, mais ne dépasse pas 2 h.

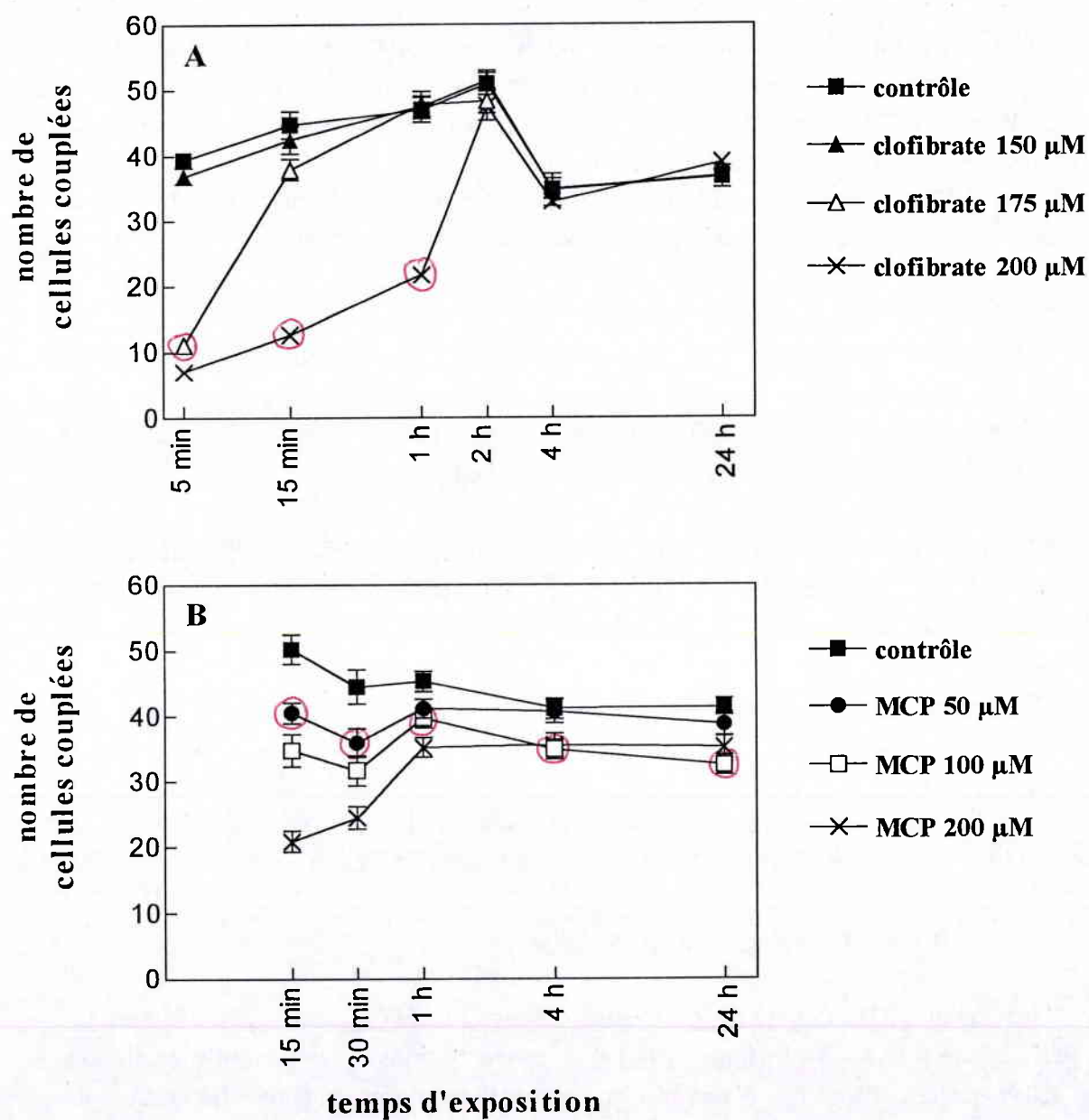


Figure 18. Inhibition des GJIC mesurée par microinjection de jaune de Lucifer dans les cellules SHE après exposition au clofibrate et au MCP.

$n=37-95$ pour les différentes concentrations de clofibrate (A).

$n=33-105$ pour les différentes concentrations de MCP (B).

$P<0,01$ pour toutes les concentrations supérieures ou égales à $\bigcirc$.

Le MCP inhibe les GJIC dès 50 μM : l'effet d'inhibition persiste pendant 1 h et diminue ensuite avec un retour au niveau du contrôle après 4 h de traitement (figure 18B). Avec des concentrations de MCP plus élevées (100 et 200 μM), l'inhibition est encore significative bien que faible après 24 h d'exposition.

L'exposition a été prolongée à 48 et 72 h, dans des essais complémentaires : aucune inhibition significative des GJIC n'a alors été observée avec le clofibrate (175 à 250 μM) ou le MCP (50 à 200 μM).

C. Discussion.

La capacité du clofibrate à induire la transformation morphologique des cellules SHE lorsqu'il est utilisé seul est qualitativement en accord avec les résultats publiés par Mikalsen *et al.* (1990a,b). Ces auteurs obtiennent une augmentation significative du taux de Tf des cellules après deux applications de clofibrate dès 50 μM alors que, dans notre cas, l'induction de la transformation n'est significative dans les mêmes conditions qu'à 100 μM .

Nous n'avons pas observé d'interaction entre le BaP et le clofibrate. Mochizuki *et al.* (1982) ont cependant mis en évidence *in vivo* l'activité promotrice de ce HPP qui augmente l'incidence des tumeurs induites par la diéthylnitrosamine sur des rats F344. L'absence de corrélation entre ces résultats et les nôtres pourrait être liée au fait que les HPPs n'interagissent pas avec tous les initiateurs, mais ont une activité promotrice "initiateur-dépendante". En effet, Cattley *et al.* (1994) ont mis en évidence que le Wy-14,643 et le clofibrate ne sont pas promoteurs *in vivo* sur le foie de rat préalablement initié par le 2-acétyl-aminofluorène, mais qu'ils sont actifs après action de la diéthylnitrosamine.

Les résultats obtenus au cours de cette étude n'ont pas mis en évidence d'interaction entre le clofibrate et le TPA. Pourtant, une potentialisation des effets du TPA par le clofibrate avait été observée au cours d'une précédente étude (Dhalluin *et al.*, 1996 ; annexe 1, publication 6) : la fréquence de transformation induite par le TPA à la concentration de 0,16 μM avait été augmentée par un traitement préalable des cellules par 25, 100 et 200 μM de clofibrate. Les conditions expérimentales étaient quasiment identiques si l'on excepte le milieu d'essai utilisé alors à pH 7,35 au lieu de 7,0 et les lots de sérum et de cellules : une influence du pH sur la biodisponibilité et sur les effets du clofibrate pourrait expliquer les résultats différents entre les séries d'essais.

Le MCP est capable de potentialiser les effets du BaP et du TPA. La synergie entre MCP et BaP pourrait s'expliquer par l'activité mitogène du HPP démontrée *in vivo* (Styles *et al.*, 1988 ; Barrass *et al.*, 1993 ; Styles, 1993). Néanmoins, aucune augmentation de l'efficacité de clonage n'a pu être observée au cours de cette étude pour étayer cette hypothèse.

L'augmentation des effets du TPA (promoteur) par le MCP, pourrait amener à conclure à un potentiel initiateur du MCP. Le MCP est cependant l'un des HPPs les plus dénués d'activité génotoxique (Ashby *et al.*, 1994). L'hypothèse avancée pour expliquer l'interaction MCP-TPA est celle d'une activation de la PKC. Cette action du MCP serait Ca^{2+} -dépendante : une augmentation par des HPPs de la concentration de Ca^{2+} cytosolique par mobilisation des réserves de calcium du réticulum endoplasmique a été décrite dans des hépatocytes de rat (Ochsner *et al.*, 1990 ; Shackleton *et al.*, 1995). La potentialisation des effets du TPA par le calcium a été démontrée et conduit à l'activation de la PKC (May *et al.*, 1985 ; Wolf *et al.*, 1985). Des interactions analogues à celle du MCP et du TPA ont été rencontrés avec d'autres cancérigènes non-génotoxiques, comme le chlordane (Bessi *et al.*, 1995).

Le MCP a des effets plus marqués que le clofibrate sur l'inhibition des communications intercellulaires *via* les jonctions "gap". Il a une action plus prolongée et inhibe le transfert de colorant dès 50 μM ; le clofibrate n'est effectif qu'à partir de 175 μM . Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette inhibition par les deux HPPs :

- ♦ une action des composés sur la structure des connexines,
- ♦ une perturbation de la structure membranaire par les deux HPPs qui sont lipophiles,
- ♦ un effet sur la phosphorylation des connexines.

Les deux dernières hypothèses nous semblent peu probables :

- (i) l'internalisation des deux composés dans la membrane ne suffit pas à expliquer leurs effets puisque tous les composés lipophiles n'inhibent pas systématiquement les GJIC,
- (ii) le profil d'inhibition des GJIC observé après exposition des cellules aux HPPs est très différent de celui provoqué par le TPA qui agit par phosphorylation des connexines (Oh *et al.*, 1991). En effet, l'inhibition maximale du transfert de colorant induite par le TPA est observée après 30 min à 1 h d'exposition des cellules.

Jansen et Jongen (1996) ont étudié les GJIC dans des kératinocytes primaires de souris initiés au DMBA. Ils ont mis en évidence un effet rapide du clofibrate capable d'inhiber les communications intercellulaires dès 7,5 min d'exposition. L'hypothèse avancée par ces auteurs est celle d'une induction d'un stress oxydatif et d'une peroxydation lipidique qui perturbent la fluidité membranaire. Cette explication nous semble discutable puisqu'elle impliquerait que la β -oxydation peroxysomale engendre une surproduction d' H_2O_2 en moins de 7,5 min (5 min dans notre cas). Par ailleurs, Mikalsen *et al.*, (1990b) n'ont pu mettre en évidence de prolifération peroxysomale dans les cellules SHE après traitement par les HPPs dans des conditions proches de celles utilisées ici.

Cette étude a mis en évidence le potentiel transformant du MCP sur les cellules SHE et confirmé celui du clofibrate. L'activité de ces deux HPPs est comparable dans les cellules traitées par ces seules substances. Par contre le MCP apparaît être un inducteur de la transformation morphologique des cellules SHE plus puissant que le clofibrate

quand il est associé à d'autres cancérogènes comme le BaP et le TPA dont le MCP potentialise les effets.

Le clofibrate et le MCP induisent une inhibition des GJIC : cette inhibition est rapide et transitoire. Le MCP provoque l'inhibition des communications intercellulaires à des doses inférieures à celles du clofibrate et de manière plus prolongée.

Ces résultats confirment que l'étude in vitro de la transformation morphologique des cellules SHE et des communications intercellulaires permet d'identifier des potentialités cancérogènes.

II. Effets des conditions expérimentales sur le potentiel transformant du clofibrate, du MCP, du DEHP et du MEHP vis-à-vis des cellules SHE (annexe I, publication 2).

Cruciani V., Rast C., Alexandre S., Nguyen-Ba G. et Vasseur P. Influence of experimental procedures on the transforming effects of four peroxisome proliferators on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Carcinogenesis*, soumis

A. Introduction.

Nous avons évalué les effets transformants des 4 HPPs sur les cellules SHE et étudié si leurs potentialités pouvaient être influencées par les conditions d'exposition cellulaire, notamment le pH du milieu.

Cette étude était motivée par les données bibliographiques et nos précédents résultats, notamment par le fait que :

- *les résultats des essais de transformation cellulaire entrepris sur les mêmes substances par plusieurs auteurs conduisaient à des réponses différentes, laissant supposer que les conditions expérimentales pouvaient jouer sur la réponse (Sanner et Rivedal, 1985 ; Jones et al., 1988 ; Mikalsen et al., 1990a,b ; Mikalsen et Sanner 1993 ; Tsutsui et al., 1993),*

- *l'interaction du clofibrate et du TPA mise en évidence à pH 7,35 et non retrouvée à pH 7,0 laissait suggérer une influence du pH sur les effets de cette substance,*

- *LeBoeuf et al. (1986, 1987, 1996) et Isfort et al. (1996c) militent fortement en faveur de l'utilisation d'un milieu d'essai de pH acide (6,7) dans les essais de transformation morphologique des cellules SHE,*

- *l'essai de transformation morphologique des cellules SHE figure au programme de normalisation de l'OCDE (1996) ; une connaissance plus systématique des performances de cet essai en fonction des conditions expérimentales est nécessaire avant de recommander un ou des protocoles expérimentaux.*

Les effets des quatre HPPs ont été évalués à pH 7,35, 7,0 et 6,7 ; seul le MEHP n'a pas été étudié au pH le plus élevé.

Les cellules ont été traitées avec chacune de ces substances selon le protocole standard, sans changement ou avec renouvellement du milieu pendant les 7 jours d'exposition.

Des traitements séquentiels incluant le BaP ou le TPA ont été effectués parallèlement selon le protocole initiation/promotion proposé par Chouroulinkov et Lasne (1978), à pH 7,35 et 7,0.

Tableau 18. Concentrations de HPPS induisant une augmentation significative de la transformation morphologique des cellules SHE dans différentes conditions expérimentales.

Substance	Protocole	pH		
		7,35	7,0	6,7
clofibrate	1 ^a	-	150	-
	2 ^a	-	100	
	3 ^a	50-100-200	100	
	BaP ^b	-	-	
	TPA ^c	100-200	-	
MCP	1 ^a	-	-	5
	2 ^a	-	-	
	3 ^a	-	100-150	
	BaP ^b	100	50-100-150	
	TPA ^c	100-200	50-100-150	
DEHP	1 ^a	75	-	-
	2 ^a	-	25-50-75	
	3 ^a	-	25-50	
	BaP ^b	100	-	
	TPA ^c	-	-	
MEHP	1 ^a	NT	-	25-50
	2 ^a	NT	50-100-150	
	3 ^a	NT	100-150	
	BaP ^b	NT	-	
	TPA ^c	NT	-	

^a les cellules sont exposées une ,deux ou trois fois au produit.
^b exposition des cellules à 0,4 µM BaP pendant 24 h puis deux applications du HPP.
^c exposition des cellules au HPP pendant 24 h puis deux applications de 0,16 µM TPA.
- pas d’induction de la fréquence de transformation quelle que soit la concentration de HPP utilisée.
NT ; non testé.

B. Résultats.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 18 et détaillés dans la publication 2 en annexe I (tables II, III, IV et V).

B.1. Pouvoir transformant des HPPs à pH 7,35.

Le clofibrate induit significativement la transformation morphologique des cellules SHE lorsqu'il est appliqué trois fois à 50, 100 et 200 μM (milieu renouvelé deux fois), ce qui correspond à des valeurs de Tf de 2,5, 2,1 et 3,1% respectivement.

Le MCP par contre est sans effet à ce pH.

Des résultats significatifs ont été obtenus avec le DEHP à 75 μM , mais le taux de transformation observé reste faible (0,9%).

Lorsque les HPPs sont **appliqués pendant la phase de promotion** sur des cellules initiées par le BaP, des effets d'interaction sont observés avec le MCP et le DEHP tous deux utilisés à 100 μM sans relation dose-effet (figure 19A).

Appliqués pendant la phase d'initiation avant le traitement par le TPA, le clofibrate et le MCP potentialisent les effets du promoteur :

- le taux de Tf de cellules SHE exposées au clofibrate à 100 et 200 μM pendant 24 h, puis au TPA, atteint 4,3 et 5,0% respectivement contre 1,8% dans le contrôle-TPA correspondant (figure 20A).

- le MCP, bien que dénué d'activité transformante lorsqu'il est utilisé seul à pH 7,35, augmente le taux de Tf de 1,3% pour le contrôle-TPA, à 3,0 et 3,6% aux concentrations de 100 et 200 μM respectivement (figure 20A).

Le DEHP reste sans effet.

B.2. Pouvoir transformant des HPPs à pH 7,0.

A pH 7,0, les quatre substances testées induisent significativement le phénotype transformé des colonies de cellules SHE, et ce aux concentrations de :

- 100 et 150 μM pour le clofibrate, lequel est cependant moins actif qu'à pH 7,35. Les fréquences de transformation induites à pH 7,0 (0,6 à 0,7%) sont nettement plus faibles qu'à pH 7,35 (2,1 à 3,1%),

- 100 et 150 μM pour le MCP après deux renouvellements du milieu pendant l'essai : le taux de transformation obtenu est du même ordre de grandeur que pour le clofibrate à pH 7,0,

- 25, 50 et 75 μM de DEHP, ce dernier étant plus transformant à pH 7,0 qu'à pH 7,35. Des expériences complémentaires avec des concentrations plus faibles ont confirmé le potentiel transformant du DEHP dès 12 μM ,

- 50, 100 et 150 μM de MEHP.

**Traitement séquentiel des cellules SHE par 0,4 μ M BaP
(24 h) et un HPP (2 applications).**

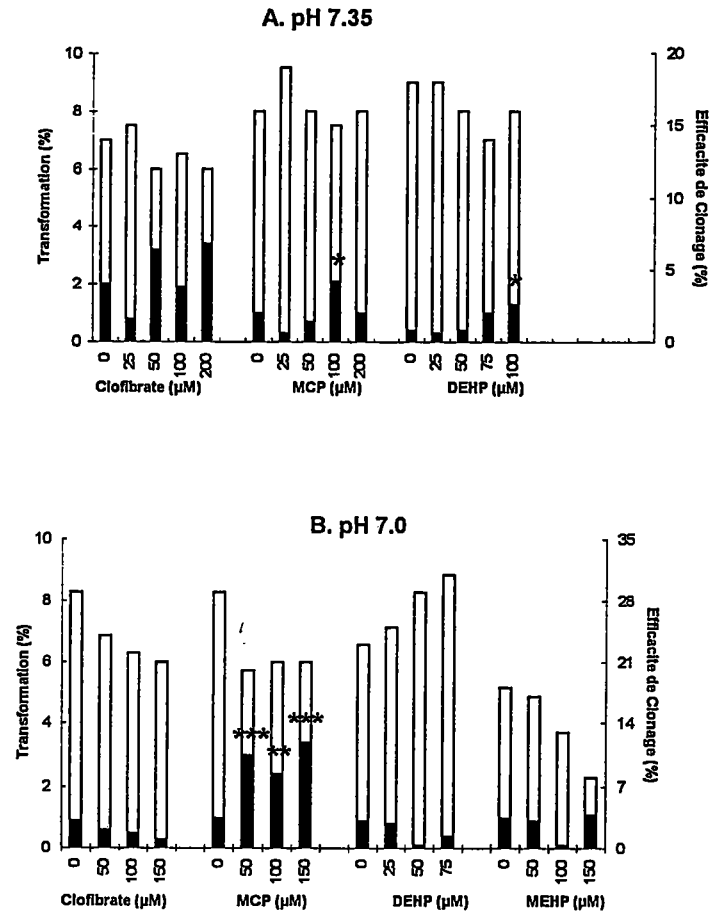


Figure 19. Fréquence de transformation (■) et efficacité de clonage (□) induites par l'exposition séquentielle de cellules SHE au BaP (0,4 μ M) pendant 24 h suivi de deux applications du HPP testé à pH 7,35 (A) ou pH 7,0 (B). Ces résultats ont été obtenus à partir d'au moins trois expériences indépendantes excepté pour le MEHP (25 μ M) à pH 7,35 (deux expériences). * fréquence de transformation significativement différente de celle obtenue dans le contrôle correspondant (* $P<0,05$; ** $P<0,02$; *** $P<0,001$). Le nombre total de colonies comptées se situe entre 694 et 1234 à pH 7,35 et entre 428 et 1460 à pH 7,0.

**Traitement séquentiel des cellules SHE par un HPP (24 h)
et 0,16 μ M TPA (2 applications).**

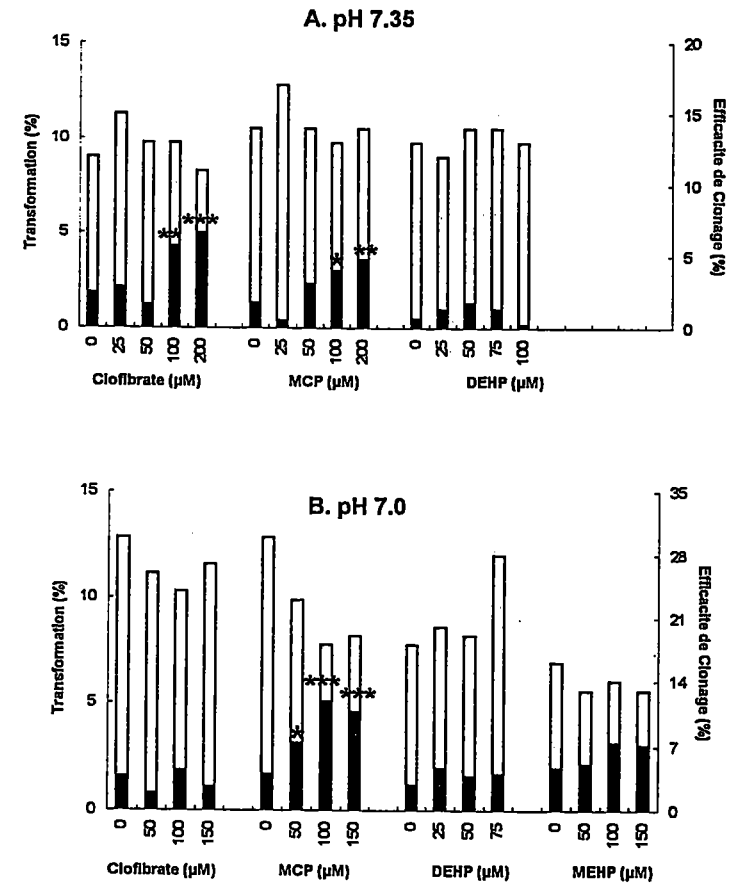


Figure 20. Fréquence de transformation (■) et efficacité de clonage (□) induites par l'exposition séquentielle de cellules SHE au HPP testé pendant 24 h suivi de deux applications de TPA (0,16 μ M) à pH 7,35 (A) ou pH 7,0 (B). Ces résultats ont été obtenus à partir d'au moins trois expériences indépendantes excepté pour le MEHP (25 μ M) à pH 7,35 (deux expériences). * fréquence de transformation significativement différente de celle obtenue dans le contrôle correspondant (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$). Le nombre total de colonies comptées se situe entre 301 et 1052 à pH 7,35 et entre 683 et 1347 à pH 7,0.

Des effets de **synergie** ne sont observés qu'avec le MCP à ce pH :

- la synergie entre le BaP et le MCP est plus prononcée à pH 7,0 qu'à pH 7,35 et s'exprime pour toutes les concentrations de MCP testées (figure 19B),
- il en est de même de l'interaction entre le MCP et le TPA, plus marquée à pH 7,0 et enregistrée dès la concentration de 50 μM de MCP (figure 20B).

B.3. Pouvoir transformant des HPPs à pH 6,7.

Deux substances, le MCP et le MEHP, induisent la transformation cellulaire à ce pH :

- la réponse est positive avec 5 μM de MCP avec un taux de transformation de 4,3% contre 2,2% pour le contrôle-DMSO. Les doses de MCP testées à pH 6,7 sont plus faibles que précédemment à cause de l'importante cytotoxicité de la substance à ce pH,
- le MEHP induit une augmentation de la fréquence de Tf jusqu'à 3,8% pour 25 et 50 μM de MEHP contre 1,8% dans le contrôle-DMSO.

Le clofibrate et le DEHP restent sans effet sur la fréquence de transformation des cellules SHE à pH 6,7.

C. Discussion.

Les résultats obtenus à pH 7,0 avec le DEHP et le MEHP sont en accord avec ceux de Mikalsen *et al.* (1990a,b) et Mikalsen et Sanner (1993). En effet, ces auteurs observent une induction significative de la Tf lorsque les cellules sont exposées deux fois à 12 μM de DEHP ou 25 μM de MEHP.

L'utilisation du milieu d'essai à pH 7,0 a permis de détecter le potentiel transformant des quatre HPPs étudiés. Ces résultats nous inciteraient à recommander ce pH pour les essais de transformation morphologique des cellules SHE.

Par contre, nous n'avons pas observé d'induction systématique du pouvoir transformant des HPPs à 6,7 avec lequel deux des substances testées sont restées négatives.

Il est intéressant de noter que des analogues structuraux peuvent réagir différemment selon le pH, ainsi :

- le clofibrate est le plus actif à pH 7,35. Le MCP par contre voit son potentiel transformant augmenter lorsque le pH du milieu est plus acide,
- de même, le DEHP est transformant à pH 7,35 et surtout 7,0, mais sans effet au pH acide. Son métabolite, le MEHP, est au contraire plus actif à pH 6,7.

Ces différents profils de réponse en fonction du pH peuvent s'expliquer par une influence du pH du milieu sur la biodisponibilité des composés. Les HPPs étant des molécules ionisables, leur biodisponibilité dépend des formes non dissociées (non ionisées) lipophiles : le rapport des concentrations entre les formes ionisées et non ionisées est régi par le pH du milieu et la valeur de leur pKa (la valeur du pKa, qu'il serait utile de connaître, n'est cependant pas une donnée facile à trouver : nous n'avons pas trouvé celles des

substances testées et de leurs métabolites). Ces facteurs chimiques ne sont pas seuls à influencer la réponse obtenue et les facteurs biologiques, comme l'état physiologique des cellules aux différents pHs, doivent également être pris en compte.

La sensibilité des cellules SHE à l'induction de la transformation morphologique augmente lorsque le milieu contenant le HPP testé est renouvelé au cours du test.

La sensibilité plus faible de l'essai lorsque le milieu n'est pas renouvelé peut s'expliquer par :

- l'adsorption de la substance testée sur les parois de polystyrène des boîtes de culture qui entraîne une chute rapide de la concentration du composé dans le milieu,
- la biosorption de la substance par les cellules, suivie d'une biotransformation qui peut aboutir, soit à la formation d'un métabolite doté de propriétés transformantes, soit à la désactivation de la substance testée.

Dans tous les cas, le renouvellement du milieu assure le maintien de la substance active à une concentration suffisante pour que la transformation ait lieu.

Des résultats positifs peuvent être obtenus sans changer le milieu, mais les taux de transformation sont plus faibles. Ainsi le DEHP (75 μM) à pH 7,35 et le clofibrate (150 μM) à pH 7,0 induisent la transformation après une seule application du milieu, mais les taux de Tf sont assez bas et à la limite de la significativité.

Chouroulinkov et Lasne (1978) recommandent l'utilisation d'un traitement séquentiel incluant un initiateur ou un promoteur. Ce protocole révèle des interactions éventuelles et augmente en général l'intensité de la réponse. Le taux de Tf obtenu avec un protocole initiation/promotion est supérieur à celui résultant du traitement des cellules par les HPPs seuls : ceci est particulièrement évident avec le MCP aux pHs 7,35 et 7,0. Les synergies entre BaP/MCP, et entre MCP/TPA sont d'autant plus nettes à pH 7,35 que le MCP est dénué d'activité transformante lorsqu'il est utilisé seul à ce pH.

L'interaction est généralement maximale au pH avec lequel l'activité des substances utilisées est la plus élevée :

- l'interaction BaP/clofibrate n'est observée qu'à pH 7,35 où ce HPP a le plus d'effets,
- les interactions du MCP avec le BaP et le TPA sont maximales à pH 7,0 comme l'activité du MCP seul,
- l'influence du pH sur la biodisponibilité du BaP ou du TPA est aussi à prendre en compte ; néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de leurs effets entre les pH 7,0 et 7,35.

Les résultats obtenus dans cette étude à pH 6,7 ne confirment pas les résultats de LeBoeuf *et al.* (1989, 1990, 1992 ; LeBoeuf et Kerckaert, 1986, 1987) qui observent une augmentation de la sensibilité et la reproductibilité de l'essai en utilisant un milieu à ce pH. Ces auteurs (LeBoeuf *et al.*, 1996) observent par ailleurs une positivité (i) à partir de 330 μM de clofibrate, concentration très supérieure à celles que nous avons testées ; et (ii) à des concentrations de DEHP comprises entre 1,6 et 12,5 μM ; par contre, aucune augmentation

de la fréquence de transformation morphologique n'est observée à 25 μ M. Nous avons réalisé des expériences complémentaires avec des concentrations de DEHP inférieures à 25 μ M sans pouvoir trouver de résultats significatifs à pH 6,7.

Ces différents résultats peuvent s'expliquer par les lots de sérum de veau foetal (SVF) utilisés, dont la qualité dépend de leur origine et de leur composition. Le sérum influence l'efficacité de clonage et l'expression de la transformation des cellules (observation personnelle ; Schuman *et al.*, 1979 ; Rivedal et Sanner, 1983 ; Tu *et al.*, 1986), que ce soit par les facteurs de croissance ou par les facteurs protéiques (Rivedal et Haddeland, 1996) qu'il contient. Ces constituants sériques sont des facteurs de variabilité, laquelle persistera tant que ces facteurs n'auront pas été identifiés et contrôlés.

Il faut souligner qu'à pH acide, les colonies des témoins présentent une morphologie différente de celle obtenue au pH physiologique : cette morphologie peut être qualifiée d'altérée, comme en cas de cytotoxicité (annexe I, publication 2, figure 1). Ceci explique le taux de transformation élevé des contrôles-DMSO à pH acide, très supérieur (2,2%) à ceux des témoins à pH 7,0 (0,29%) ou 7,35 (0,17%). L'examen du phénotype des colonies est rendu plus difficile lorsqu'il est réalisé sur la base de témoins altérés.

Cette étude confirme l'influence des conditions expérimentales sur le potentiel transformant des HPPs vis-à-vis des cellules SHE.

Il est clair que le pH du milieu influence la réponse observée : le pH 7,0 semble le plus à même de mettre en évidence les effets transformants des HPPs. Sans information particulière sur la physicochimie de la substance testée, c'est le pH que nous pourrions recommander pour des essais. Si l'on dispose de données indiquant une meilleure biodisponibilité du composé testé à une autre valeur de pH, il serait évidemment judicieux d'en tenir compte.

Il apparaît préférable également de renouveler le milieu d'essai pendant la période d'exposition des cellules, ce qui augmente la probabilité d'expression du phénotype transformé.

Il serait criticable de généraliser à partir de l'étude de quatre substances. Toutefois, ces résultats nous amènent à suggérer une stratégie pour la détection in vitro des substances cancérigènes à l'aide de l'essai de transformation des cellules SHE. Celle-ci consisterait à :

- effectuer en premier lieu un essai à pH 7,0 avec renouvellement du milieu ; en second lieu ou parallèlement, faire un essai à pH 6,7*
- en cas de réponse négative, utiliser le protocole d'initiation/promotion, de manière à augmenter la sensibilité du test. En plus de son intérêt au plan appliqué, le protocole d'initiation/promotion permettrait une étude plus fondamentale des effets d'interactions entre substances chimiques.*

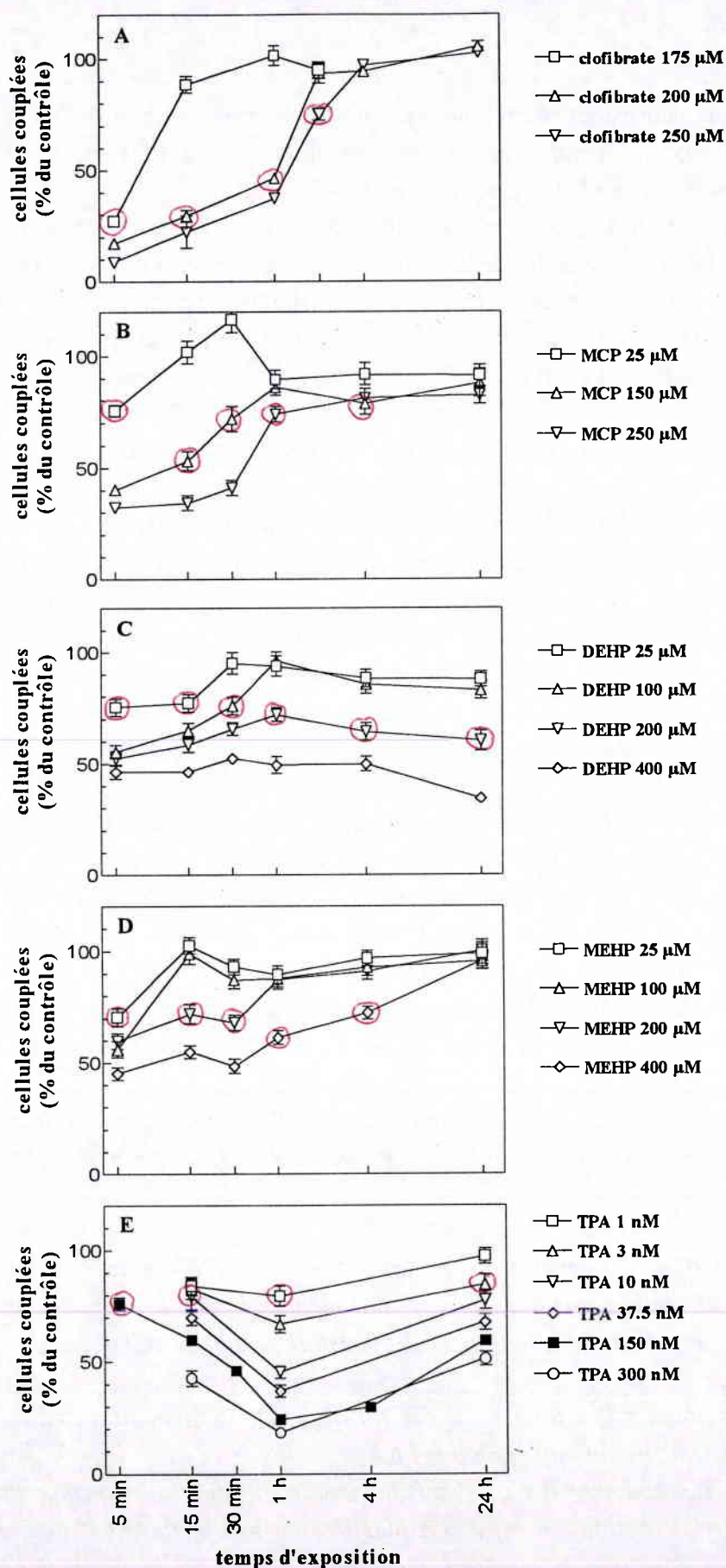


Figure 21. Inhibition des GJIC, mesurée par microinjection de jaune de Lucifer dans les cellules SHE après exposition aux HPPs et au TPA.

Pour chaque temps d'exposition, $P < 0,01$ à toutes les concentrations supérieures ou égales à ○.

III. Effets de quatre HPPs et du TPA sur les communications intercellulaires des cellules primaires SHE et de la lignée cellulaire V79 (annexe I, publication 3).

Cruciani V., Mikalsen S.-O., Vasseur P. et Sanner T. Effects of peroxisome proliferators and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin 43 in two hamster fibroblast systems. *International Journal of Cancer*, accepté.

A. Introduction.

Nous avons élargi l'étude des communications intercellulaires entreprises sur le clofibrate et le MCP, au DEHP et au MEHP ainsi qu'au TPA, modèle d'inhibiteur des GJIC.

Il a été montré dans la première partie de ce travail que le clofibrate et le MCP agissent sur les GJIC à partir de 175 μ M et 50 μ M respectivement. Les deux composés inhibent le transfert de colorant entre les cellules SHE de manière :

- *rapide puisque l'effet maximum est atteint dès 5 min d'exposition,*
- *transitoire avec un retour au niveau du contrôle après 4 h d'exposition.*

L'étude a été réalisée sur les cellules SHE par mesure du transfert de colorant entre cellules à confluence.

Nous avons d'autre part étudié sur les cellules V79 l'inhibition de la coopération métabolique (Yotti et al., 1979) qui reflète le caractère fonctionnel des communications. Le transfert de colorant a été mesuré sur ces cellules, afin de comparer les résultats à la coopération métabolique.

B. Résultats.

B.1. Communications intercellulaires entre cellules SHE.

Les profils d'inhibition du transfert de colorant après exposition des cellules au DEHP et au MEHP sont identiques à ceux des deux HPPs étudiés précédemment : l'inhibition est rapide et de courte durée, notamment aux concentrations les plus faibles.

Le DEHP (25 à 400 μ M) inhibe les GJIC dès 5 min à toutes les concentrations testées (figure 21C). Un retour au niveau du contrôle est observé à 25 et 100 μ M à partir d'une heure d'exposition ; à 200 et 400 μ M, l'inhibition persiste pendant 24 h.

La réponse au MEHP (25 à 400 μ M) présente un profil similaire à celui du DEHP ; mais son action est plus brève et l'inhibition n'est plus visible à 24 h (figure 21D).

La comparaison des quatre HPPs montre qu'après 4 h d'exposition :

- aucune des concentrations de clofibrate n'est inhibitrice,
- les trois autres HPPs inhibent encore les communications intercellulaires à la concentration de 400 μ M pour le MEHP, 200 μ M pour le DEHP et 150 μ M pour le MCP.

Tableau 19. Résultats obtenus sur les GJIC des cellules SHE après ré-exposition des cellules SHE aux HPPs.

Substance (concentration en μM)	GJIC (% du contrôle)			
	procédure A		procédure B	
	(exposition pendant 4h)		(expo. pendant 4 h + 5 min)	
	m $\pm$ SEM	n	m $\pm$ SEM	n
clofibrate (250)	83 $\pm$ 3	57	16 $\pm$ 2 ¹	60
MCP (250)	98 $\pm$ 3	68	46 $\pm$ 2 ¹	76
DEHP (100)	102 $\pm$ 2	70	48 $\pm$ 2 ¹	75
MEHP (200)	104 $\pm$ 3	68	52 $\pm$ 2 ¹	65

¹ résultat significativement différent de celui obtenu en A ($P < 0.001$) évalué sur les données brutes.

Les pourcentages sont calculés en fonction des contrôles correspondants :

procédure A, 40.7 ± 1.1 , $n=78$,

procédure B, 41.8 ± 1.1 , $n=79$.

Procédure A : les microinjections sont réalisées après 4 h d'exposition des cellules au HPP.

Procédure B : les microinjections sont réalisées après que les cellules aient été exposées pendant 4 h et le milieu remplacé par du milieu neuf contenant la même concentration du HPP (ce qui correspond à 4 h + 5 min).

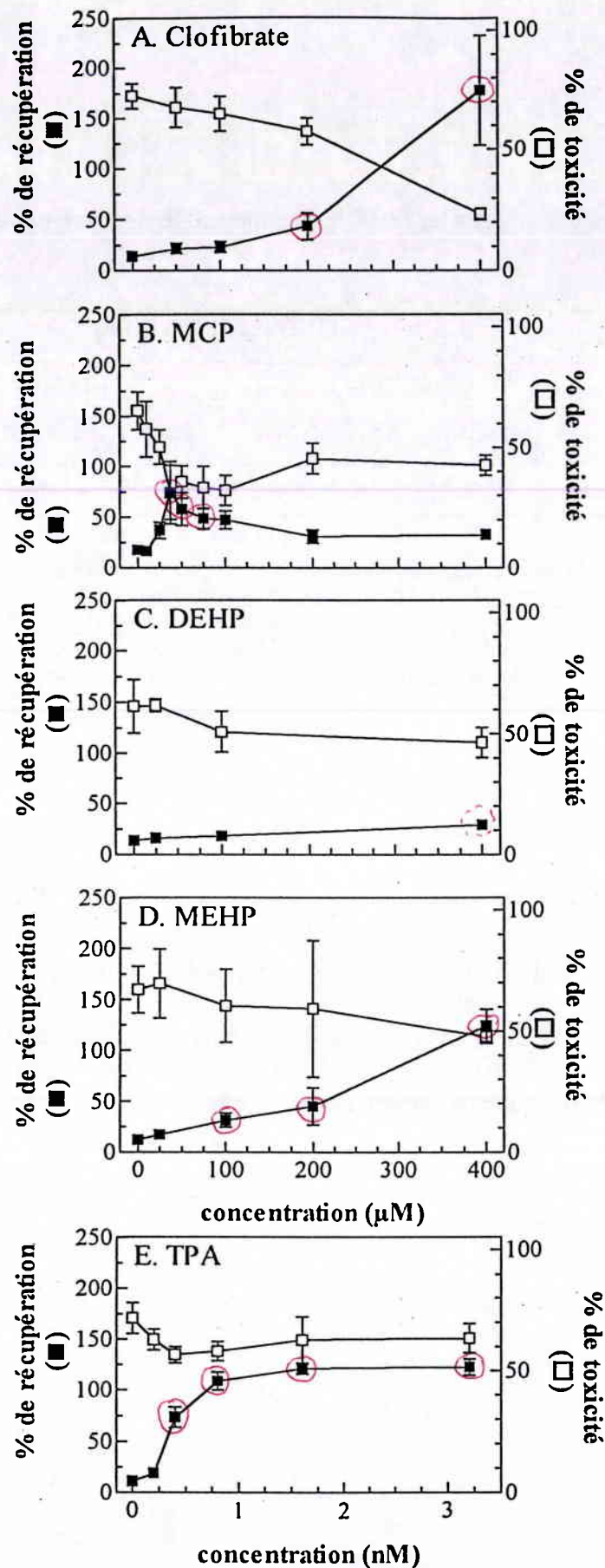


Figure 22. Inhibition de la coopération métabolique des cellules V79 par les HPPs et le TPA.
 L'inhibition de la CM est associée à une augmentation du pourcentage de récupération des cellules V79 résistantes à la 6-thioguanine cocultivées avec des cellules sensibles, la survie est évaluée par le nombre de colonies de cellules résistantes formées dans les boîtes ne contenant pas de sensibles. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une Anova avec post-test de Dunnett. Le taux de récupération est significativement différent de celui du contrôle avec $P < 0,01$ pour $\bigcirc$ et avec $P < 0,05$ pour $\bigcirc$.

A. Influence sur les GJIC des cellules V79 d'une exposition pendant 30 min aux HPPs (évaluation des communications intercellulaires par transfert de jaune de Lucifer).

Substance (concentration en μM)	GJIC (% du contrôle)	
	moyenne $\pm$ SEM	nombre d'injections
clofibrate (400)	$28 \pm 5^*$	24
MCP (400)	84 ± 7^a	21
DEHP (400)	$32 \pm 4^*$	17
MEHP (400)	$46 \pm 7^*$	19

^a L'effet très faible du MCP à cette concentration peut s'expliquer par une cytotoxicité se traduisant par la diffusion du colorant dans de nombreuses cellules.

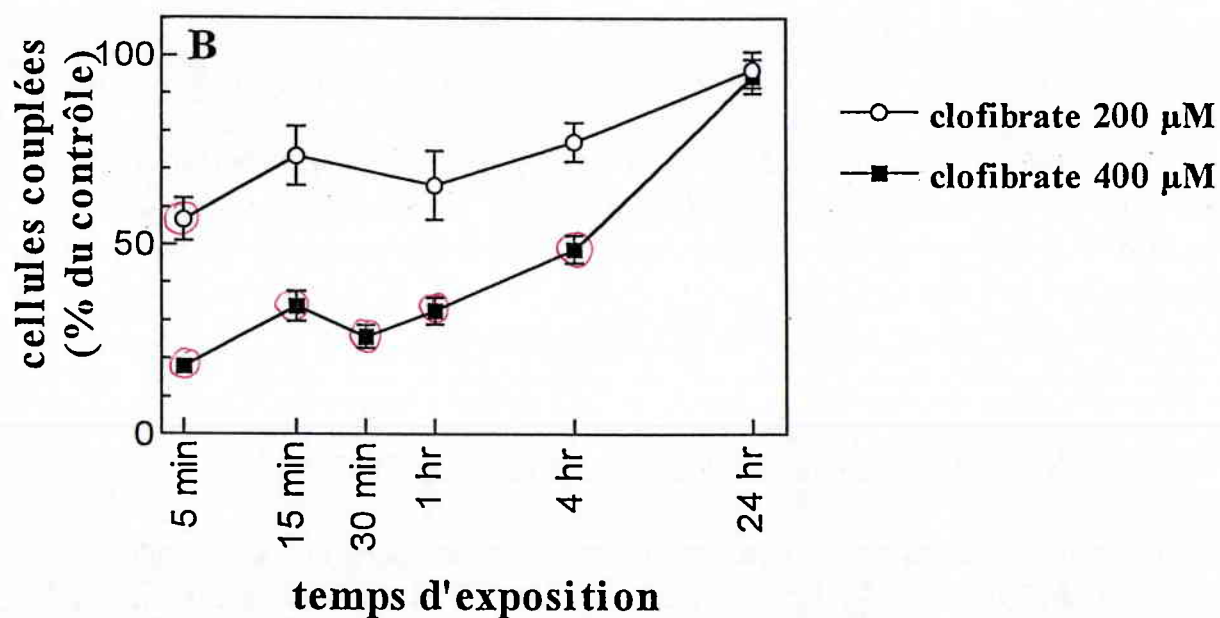


Figure 23. Inhibition du transfert de colorant dans les cellules V79 après exposition aux HPPs.

Tableau des résultats obtenus après 30 min d'exposition des cellules V79 au clofibrate, MCP, DEHP et MEHP (A). * Statistiquement différent du contrôle correspondant ($P < 0,01$).

Inhibition du transfert de colorant dans les cellules V79 exposées au clofibrate à 200 et 400 μM pendant 5 min à 24 h (B). $n=29-60$ pour les deux concentrations. $P < 0,01$ aux concentrations $\bigcirc$.

Par comparaison aux HPPs, le TPA inhibe également les GJIC après 5 min d'exposition (à 0,15 μM , figure 21E). Son action s'intensifie jusqu'à 1 h de contact et tend à se normaliser lentement ensuite. Toutefois, après 24 h d'exposition le niveau de communication des cellules est encore significativement différent du contrôle, sauf à la concentration de 1 nM.

Ces effets rapides des HPPs peuvent s'expliquer par : (i) l'inactivation des composés par les cellules, (ii) l'adsorption des composés sur le plastique des boîtes de culture qui diminue la concentration de HPP présente dans le milieu, (ii) l'acquisition par les cellules d'une résistance aux composés.

Nous avons étudié cette dernière hypothèse à l'aide d'un protocole de ré-exposition des cellules SHE :

Les cellules sont exposées au HPP pendant 4 h, le milieu est alors remplacé par du milieu contenant la même concentration du composé et les injections effectuées immédiatement. Les résultats (tableau 19) montrent à nouveau, pour tous les HPPs, une inhibition significative des GJIC ; nous en déduisons que les cellules SHE n'ont pas acquis de résistance au composé après 4 h d'exposition.

B.2. Communications intercellulaires entre cellules V79.

Étude de la coopération métabolique.

Le MCP provoque jusqu'à 50% d'inhibition de la coopération métabolique à concentrations faibles (37, 50 et 75 μM), mais cytotoxiques. Le clofibrate, le DEHP et le MEHP ne sont actifs qu'à fortes concentrations : 100, 200 et 400 μM pour le MEHP, 200 et 400 μM pour le clofibrate et 400 μM pour le DEHP (figure 22).

Le TPA (0,1 à 3,2 nM) provoque une inhibition dose-dépendante de la coopération métabolique à des concentrations non cytotoxiques (figure 22E). L'inhibition est significative dès 0,4 nM. Le TPA a été utilisé à 1,6 nM comme témoin positif dans les expériences d'inhibition de la coopération métabolique réalisées avec les HPPs.

Étude du transfert de colorant.

Nous avons étudié le transfert de colorant entre les cellules V79 cultivées en tapis et exposées aux HPPs, dans le but d'évaluer la relation entre le transfert de colorant et la coopération métabolique.

Les effets des HPPs sur le transfert de jaune de Lucifer ont été étudiés à de fortes concentrations (400 μM), correspondant à celles inhibant la coopération métabolique.

Une exposition de 30 min à 400 μM de clofibrate, de DEHP ou de MEHP (figure 23A), induit une inhibition de 55 à 75% des GJIC. Le MCP est cytotoxique à la concentration de 400 μM .

Le profil d'action du clofibrate à 200 et 400 μM a été étudié de manière plus approfondie pendant une période de 5 min à 24 h. Comme dans les cellules SHE, le clofibrate inhibe le transfert de colorant de manière rapide et brève dans les cellules V79 (figure 23B). Le TC revient au niveau du contrôle après 24 h de contact avec 200 et 400 μM de clofibrate.

C. Discussion.

Les HPPs inhibent généralement les communications intercellulaires. Néanmoins, à l'exception des travaux de Mikalsen et Sanner (1993), Krutovskikh *et al*, (1995) et Jansen et Jongen, (1996), peu d'études relatives aux effets des HPPs en fonction du temps ont été réalisées.

Nous avons observé que l'inhibition des GJIC par les HPPs est rapide et transitoire dans les cellules SHE : seules les fortes concentrations provoquent une inhibition qui persiste plus d'une heure.

Nous avons montré, à l'aide du protocole basé sur la ré-exposition des cellules SHE, que l'effet réversible des composés sur les GJIC n'est pas lié à l'acquisition par les cellules d'une résistance aux HPPs. L'effet transitoire observé peut ainsi être associé à :

- la métabolisation et l'inactivation des composés par les cellules elles-mêmes,
- la diminution de la concentration des composés dans le milieu par suite d'une adsorption sur le plastique des boîtes de cultures utilisées.

L'action de courte durée des HPPs sur les GJIC peut expliquer l'inhibition assez faible de la coopération métabolique des cellules V79. En effet, la coopération métabolique implique que les communications intercellulaires soient fonctionnelles. Si ces communications sont inhibées, la coopération métabolique l'est par voie de conséquence et les cellules résistantes à la 6-thioguanosine monophosphate vont pouvoir se développer. Dans le cas où l'inhibition des communications est brève et la coopération vite rétablie, le métabolite toxique parviendra finalement à passer dans les cellules résistantes et à empêcher leur multiplication.

Cette étude a montré que le clofibrate, le MCP, le DEHP et le MEHP présentaient un profil d'action similaire sur les GJIC. L'inhibition mesurée par transfert de colorant sur cellules SHE est rapide et de courte durée ; elle est observée à des concentrations élevées de ces substances (50 à 200 μM).

L'inhibition de la coopération métabolique des cellules V79 est relativement faible même aux fortes concentrations des HPPs testés.

Le MCP est le plus actif de tous les HPPs testés, sur les deux systèmes cellulaires.

Les deux modèles cellulaires, SHE et V79, répondent généralement de manière analogue à l'inhibition des GJIC par les HPPs. Cependant, le DEHP, bien qu'actif sur les cellules SHE, est sans effet sur la coopération métabolique des cellules V79.

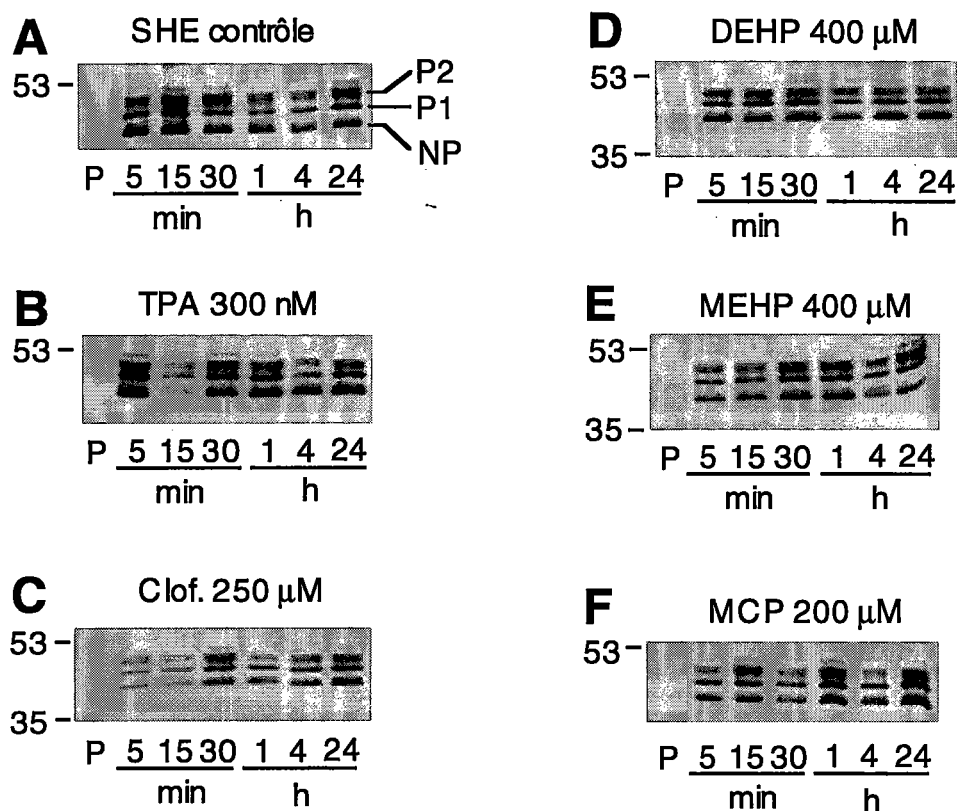


Figure 24. Influence de l'exposition (de 5 min à 24 h) des cellules SHE au TPA et aux HPPs sur le profil de phosphorylation de la Cx43 obtenu par "Western blot".

Cellules non-traitées (A), et cellules exposées à :

300 nM de TPA (B), 250 µM de clofibrate (C), 400 µM de DEHP (D), 400 µM de MEHP (E) et 200 µM de MCP (F).

P correspond à l'étalon de poids moléculaires.

IV. Conséquences de l'exposition de cellules SHE et V79 à quatre HPPs et au TPA sur la phosphorylation et la localisation de la connexine 43 (annexe I, publication 3).

Cruciani V., Mikalsen S.-O., Vasseur P. et Sanner T. Effects of peroxisome proliferators and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin 43 in two hamster fibroblast systems. *International Journal of Cancer*, accepté.

A. Introduction.

La connexine 43 (Cx43) est une connexine majeure, présente à la fois in vivo dans les tissus et in vitro dans les cellules en culture (Yamasaki et Naus, 1996). La majorité des connexines sont des phosphoprotéines ou contiennent dans leur structure des sites de phosphorylation potentiels. De nombreuses données expérimentales indiquent une corrélation entre la phosphorylation des connexines et l'altération des GJIC, c'est pourquoi la phosphorylation des connexines est considérée comme un des mécanismes majeurs de régulation des GJIC.

Nous avons constaté un effet rapide des HPPs sur les communications intercellulaires des cellules SHE et V79. Nous avons donc entrepris d'étudier les causes de cette inhibition en comparant les GJIC et les modifications post-traductionnelles induites sur les Cx43 dans les cellules SHE et V79. Pour cela, deux techniques ont été utilisées :

- la mise en évidence, par "Western-blot" des différentes formes phosphorylées de la Cx43 de manière à évaluer si le traitement à court terme des cellules par les HPPs induit une modification du profil obtenu,

- la visualisation, par marquage immunofluorescent, des connexines de manière à déterminer si le traitement des cellules par les HPPs modifie leur localisation cellulaire.

Ces techniques ont également été appliquées à l'étude du TPA sur les mêmes paramètres.

B. Résultats.

B.1. "Western blot" de la Cx43 dans les cellules SHE.

Les cellules ont été traitées pendant 5 min à 24 h par les 5 composés. Dans les cellules SHE (figure 24), la Cx43 se sépare en trois bandes majeures : une bande inférieure non-phosphorylée (NP) et deux bandes phosphorylées P1 et P2. P2 a tendance à se dédoubler.

Les effets du clofibrate (175, 200 et 250 μ M), du MCP (50, 100 et 200 μ M), du DEHP et du MEHP (tous deux à 25, 100 et 400 μ M) ont été évalués sur la phosphorylation de la Cx43. Aucune modification reproductible n'est observée au niveau des bandes de la Cx43 après 5 min à 24 h de contact avec les HPPs (figures 24C, 24D, 24E et 24F).

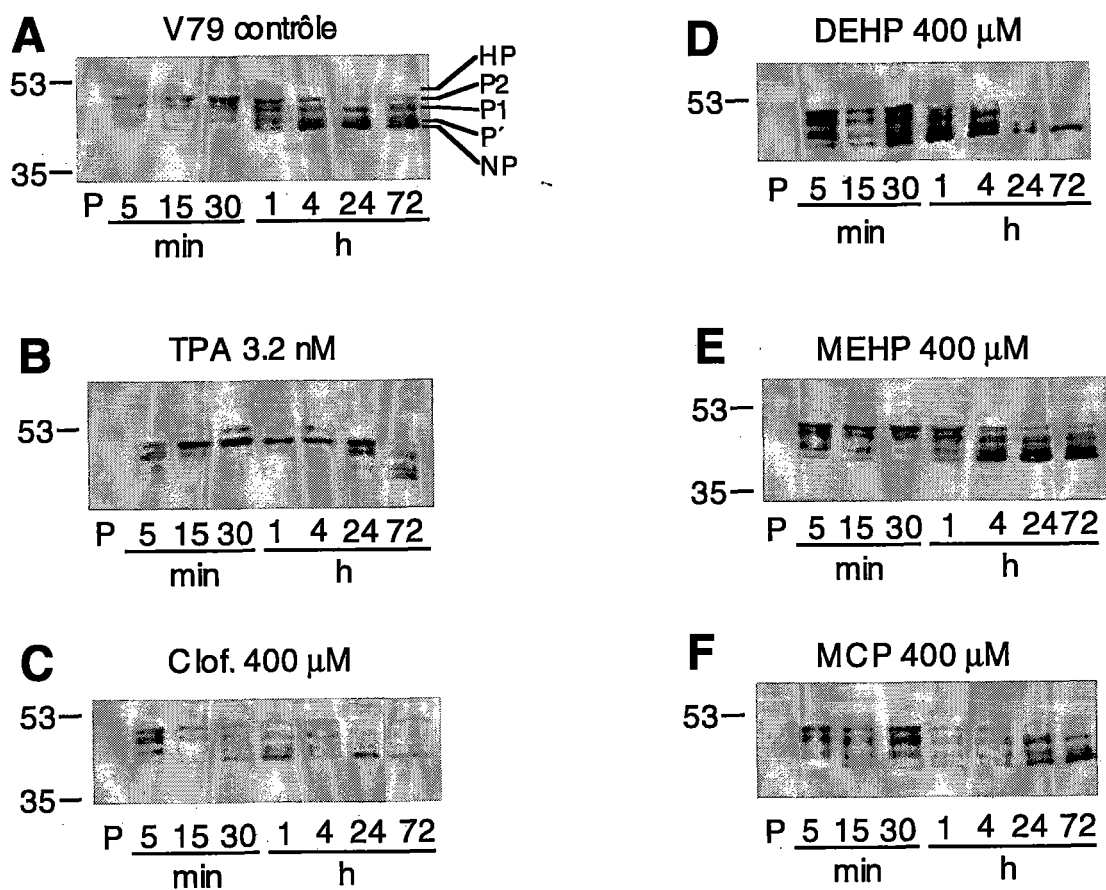


Figure 25. Influence de l'exposition (de 5 min à 72 h) des cellules V79 au TPA et aux HPPs sur le profil de phosphorylation de la Cx43 obtenu par "Western blot".

Cellules non-traitées (A), et cellules exposées à :

3,2 nM de TPA (B), 400 μ M de clofibrate (C), 400 μ M de DEHP (D), 400 μ M de MEHP (E) et 400 μ M de MCP (F).

P correspond à l'étalon de poids moléculaires.

Le TPA, testé à 37,5, 150 et 300 nM, ne cause que des altérations mineures et non reproductibles du profil de phosphorylation de la Cx43, quels que soient la dose et le temps d'exposition. Le changement le plus marqué à la concentration la plus élevée (300 nM) est l'apparition d'une bande diffuse juste au dessus de NP après 15 min à 4 h d'exposition : cette bande n'est pas apparente sur la figure 24B, mais était visible sur la membrane de transfert. Nous ne pouvons déterminer s'il s'agit d'une protéine phosphorylée.

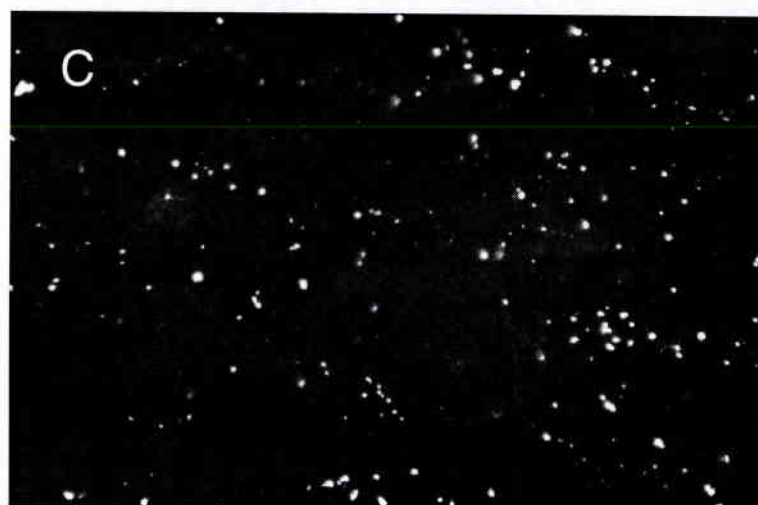
B.2. "Western blot" de la Cx43 dans les cellules V79.

Les temps d'exposition des cellules varient de 5 min à 72 h, correspondant au temps de contact des composés avec les cellules V79 au cours du test d'inhibition de la coopération métabolique. Les cellules V79 (figure 25) présentent généralement un profil de 4 bandes : une bande inférieure non-phosphorylée (NP) et trois bandes phosphorylées (P', P1 et P2). Une bande supplémentaire apparaît parfois au dessus de P2, elle sera appelée HP. Il est à noter que l'identité des différentes formes phosphorylées (nombre et position des phosphates) n'est pas connue et que les bandes observées dans les cellules V79 ne sont pas identiques à celles des cellules SHE malgré l'utilisation de la même nomenclature.

Le profil de phosphorylation de la Cx43 varie au cours du temps dans les contrôles, par suite vraisemblablement, du changement de milieu réalisé au début de l'exposition. En effet, l'intensité de la bande NP augmente ; celle de la bande P2 diminue entre 4 h et 72 h après le changement de milieu.

Le clofibrate (100, 200 et 400 μ M), le MCP (50, 200 et 400 μ M), le DEHP et le MEHP (25, 100 et 400 μ M) ne causent que des modifications mineures au profil de phosphorylation de la Cx43 pendant les périodes d'exposition inférieures à 4 h. Pour des expositions plus longues, le DEHP et le MCP aux plus fortes concentrations utilisées (400 μ M) entraînent une intensification de la bande NP (figures 25D et 25F). Avec le clofibrate et le MEHP, cet effet est moins prononcé même s'il est visible dans certaines expériences (figures 25C et 25E).

Le TPA (0,8, 1,6 et 3,2 nM) affecte beaucoup le profil de phosphorylation de la Cx43 dans les cellules V79. La plus faible concentration utilisée (0,8 nM) induit dès 1 h d'exposition l'augmentation d'intensité de la bande P2, accompagnée de l'apparition d'une bande HP ; simultanément, la forme NP diminue. Après 24 h d'exposition, le profil redevient identique à celui de départ. Aux plus fortes concentrations (1,6 et 3,2 nM TPA), ces modifications sont plus précoces, plus intenses et plus durables (figure 24B).



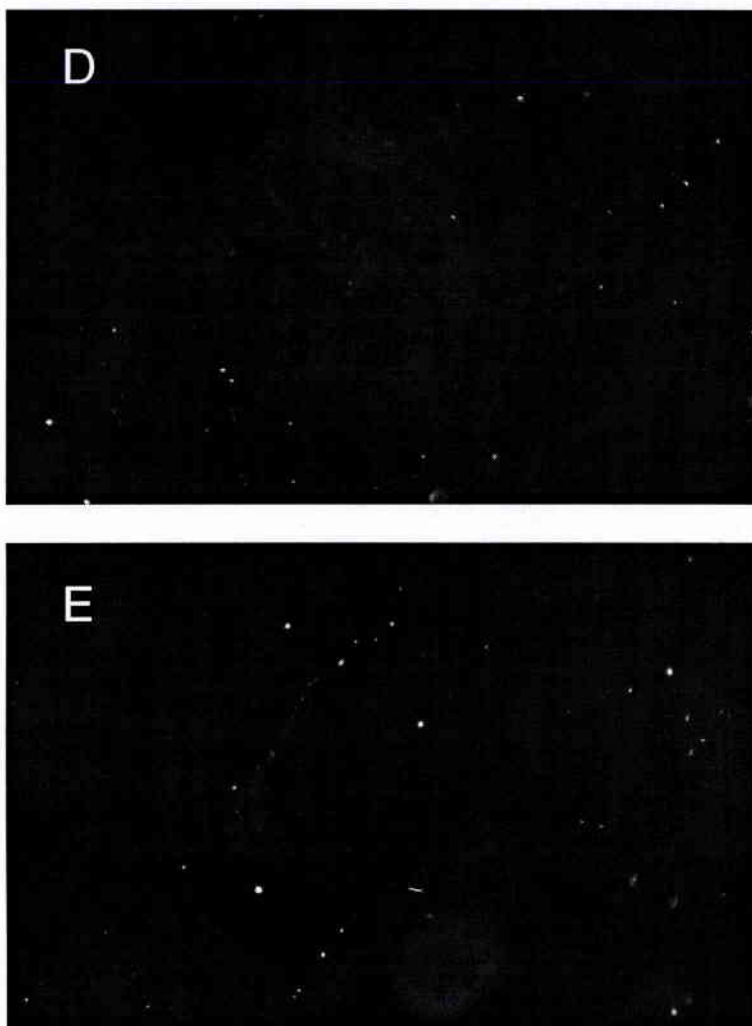


Figure 26. Localisation par immunofluorescence de la Cx43 dans les cellules SHE.

Cellules non-traitées (A), les pointes de flèches indiquent des exemples de plaques jonctionnelles visibles en bordure des cellules, les taches intracellulaires sont mises en évidence par des flèches. L'échelle en bas à droite correspond à 10 μm et est valable pour les figures 26 et 27.

Cellules exposées à :

150 nM de TPA pendant 4 h (B), 250 μM de MCP pendant 4 h (C), 400 μM de MEHP pendant 4 h (D), et 400 μM de MEHP pendant 24 h (E).

B.3. Immunofluorescence.

Les cellules SHE non traitées (figure 26A) présentent un grand nombre de taches intracellulaires très fluorescentes alors que peu de signaux typiques des jonctions “gap” sont visibles en bordure des cellules. Dans de nombreuses cellules, une fluorescence faible et diffuse est observable à proximité du noyau.

L'exposition des cellules SHE pendant 5 min, 1 h, 4 h ou 24 h au clofibrate (250 μ M), MCP (250 μ M, figure 26C) ou DEHP (400 μ M) n'a pas d'effet sur la répartition de la Cx43 dans ces cellules. Par contre, le MEHP (400 μ M) provoque après 4 h et 24 h d'exposition (figures 26D et 26E) une disparition de la fluorescence.

Après 5 min d'exposition des cellules SHE à 150 nM de TPA (figure 26B), la fluorescence due à la présence de Cx43 reste inchangée. Après 1 et 4 h, la fluorescence disparaît presque totalement ; elle réapparaît faiblement après 24 h sans toutefois revenir au niveau du contrôle.

Dans les cellules V79, les signaux fluorescents sont rares à la périphérie des cellules ; à l'inverse des cellules SHE, les cellules V79 ne présentent pas de taches fluorescentes intracellulaires (figure 27A). L'effet du TPA (150 nM) et du MEHP (400 μ M, figure 27B) est identique à celui observé avec les cellules SHE : disparition quasi totale de la fluorescence après 1 h et 4 h respectivement.

Les trois autres HPPs ne provoquent pas, comme dans les cellules SHE, de modification notable de l'immunofluorescence de la Cx43.

C. Discussion.

C.1. Profil de phosphorylation de la Cx43.

Le TPA inhibe les GJIC dans de nombreux types cellulaires. Cette inhibition peut être due à une phosphorylation directe de la Cx43 par la PKC (Oh *et al.*, 1991). Toutefois, il a été mis en évidence dans certains types cellulaires (y compris les SHE), que le TPA n'induisait que des modifications mineures du profil de phosphorylation de la Cx43, alors que les GJIC étaient fortement inhibées (Asamoto *et al.*, 1991 ; Husøy *et al.*, 1993 ; Rivedal *et al.*, 1994).

Dans les cellules de la lignée WB où la phosphorylation de la Cx43 a été mise en évidence, les GJIC sont totalement inhibées après 5 min d'exposition au TPA (Oh *et al.*, 1991), alors que dans les cellules SHE, 30 min à 1 h sont nécessaires (Roseng *et al.*, 1993). Ceci indiquerait l'intervention de mécanismes d'inhibition des GJIC distincts.

De plus, des altérations importantes peuvent être observées dans le profil de phosphorylation de la Cx43 sans action sur les GJIC ; la phosphorylation de la Cx43 n'est pas le seul mécanisme de régulation des GJIC dans les cellules exprimant cette connexine. Mikalsen et Kaalhus (1997) ont proposé l'intervention de protéines accessoires. En effet, la

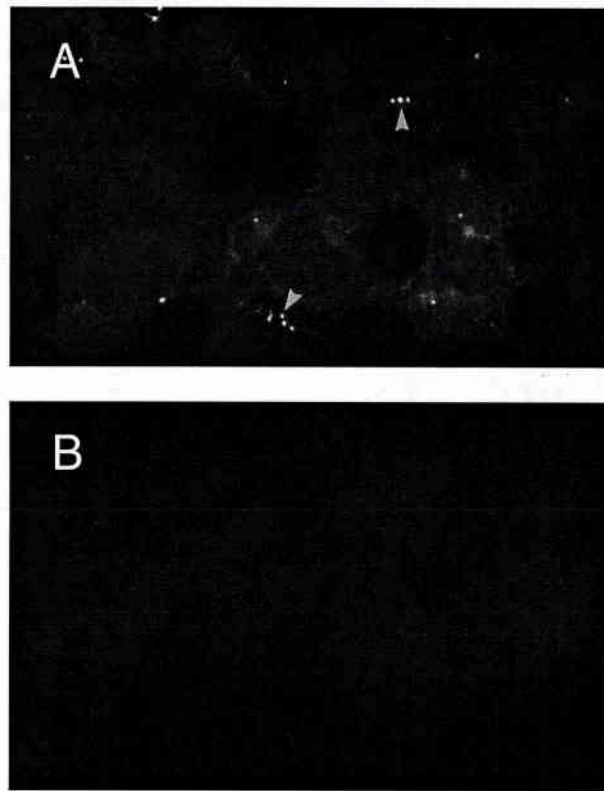


Figure 27. Localisation par immunofluorescence de la Cx43 dans les cellules V79.
Cellules non-traitées (A), les pointes de flèches indiquent des exemples de plaques jonctionnelles visibles en bordure des cellules.
Cellules exposées à 400 μ M de MEHP pendant 4 h (B).

Cx43 contiendrait des séquences susceptibles de se lier aux domaines SH2, SH3, WW ou aux protéines adaptatrices de la famille 14-3-3.

Après exposition des cellules SHE et V79 aux HPPs, le profil de phosphorylation de la Cx43 ne présente aucune modification marquée qui puisse être corrélée avec l'inhibition des GJIC induite par ces composés dans les deux types cellulaires. D'autres composés inhibent aussi les GJIC sans altération apparente de la phosphorylation de la Cx43 (Hii *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1996). La seule caractéristique commune de ces substances semble être leur lipophilie.

C.2. Localisation de la Cx43.

Dans les cellules SHE, les expériences d'immunofluorescence montrent des taches intracellulaires très fluorescentes. Ces taches peuvent correspondre, soit à des connexines ou des connexons en migration vers la membrane plasmique pour y être intégrés, soit à des jonctions "gap" sur le point d'être dégradées (jonctions annulaires).

Le nombre de jonctions "gap" présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules SHE et V79 est faible comparé à celui observé dans d'autres types cellulaires (Kenne *et al.*, 1994 ; Rivedal *et al.*, 1994). Le niveau de communication des cellules SHE (35 à 40 cellules couplées dans les contrôles) est néanmoins plus élevé que celui des cellules V79 (10 à 15 cellules couplées).

Des estimations théoriques ont démontré que les jonctions "gap" composées de connexons dispersés sont 10 fois plus efficaces dans le transfert de molécules que les jonctions plus compactes (Chen et Meng, 1995). Ces jonctions dispersées ne sont pas visibles par immunofluorescence (Green *et al.*, 1993). L'existence de jonctions "gap" dispersées dans les cellules SHE pourrait expliquer le faible marquage histochimique observé, malgré un niveau de communication élevé.

L'étude de la taille des plaques jonctionnelles n'a jamais été réalisée dans les cellules SHE. Dans les cellules V79, la taille moyenne des jonctions "gap" est de $0,1 \mu\text{m}^2$ et elles constituent seulement 0,2% de la surface de contact entre les cellules (Yancey *et al.*, 1982) ceci pouvant expliquer le faible niveau de communication de ces cellules.

Le traitement des cellules SHE et V79 par le TPA provoque la disparition du signal immunofluorescent de la Cx43 dès 1 h d'exposition ; ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs (Asamoto *et al.*, 1991 ; Matesic *et al.*, 1994 ; Rivedal *et al.*, 1994). Cet effet ne peut résulter d'une dégradation protéolytique de la Cx43, puisqu'aucune diminution de la connexine n'est observée sur les membranes de "Western blot". Il peut s'expliquer, par contre, par une altération conformationnelle de la Cx43 qui n'est plus reconnue par l'anticorps.

Les expositions de courtes durées des cellules aux HPPs n'affectent pas l'immunofluorescence de la Cx43 malgré l'inhibition des GJIC ; excepté pour le MEHP qui,

comme le TPA, induit une disparition de la fluorescence dans les cellules SHE et V79 après 4 h et 24 h. Cet effet du MEHP est d'autant plus étonnant que les GJIC sont redevenues totalement fonctionnelles après 24 h. Il ne semble pas impliquer le PPAR (Isseman et Green, 1990) puisque les autres HPPs n'ont pas d'effet sur le signal fluorescent.

Cette disparité entre les effets sur les communications intercellulaires et la fluorescence indiquerait que, dans ces essais, la Cx43 n'a qu'un rôle mineur dans la fonctionnalité des connexons. D'autres connexines que la Cx43 sont vraisemblablement impliquées dans cette fonction.

Certains auteurs ont d'autre part démontré l'absence des Cx32 et Cx26 dans les cellules SHE (Isfort *et al.*, 1992a ; Rivedal *et al.*, 1994). Il s'avère donc nécessaire de rechercher la présence d'autres connexines dans les deux types cellulaires que nous avons utilisés.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur des HPPs sur les communications intercellulaires des cellules SHE et V79. Les mécanismes d'action restent obscurs ; en effet, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'inhibition des GJIC, le profil de phosphorylation et la localisation cellulaire de la Cx43 dans des cellules SHE et V79 traitées par le TPA ou des agents proliférateurs des peroxysomes hépatiques. Les recherches ultérieures nous semblent devoir être orientées sur l'étude d'autres connexines.

DISCUSSION

GENERALE

Tableau 20. Récapitulatif des résultats obtenus avec substances testées sur les cellules SHE et V79.

substance	transformation morphologique des cellules SHE			communications intercellulaires			connexine 43			
							WB (phosphor.)		IF (localisat.)	
	pH 7,35	pH 7,0	pH 6,7	SHE TC	V79 TC CM		SHE V79	SHE V79		
clofibrate	3x	1x,2x,3x		↓	↓	↓	-	-	→	→
	TPA									
MCP		3x	1x	↓	→	↓	-	-	→	→
	BaP TPA	BaP TPA								
DEHP	1x	2x,3x		↓	↓	(↓)	-	-	→	→
	BaP									
MEHP		2x,3x	1x	↓	↓	↓	-	-	↓	↓
	NT									
TPA				↓↓	↓↓	↓↓	-	+	↓	↓

Transformation morphologique : seules les conditions expérimentales ayant conduit à une augmentation significative de la fréquence de transformation sont rapportées avec indication :

- du nombre d'applications de la substance par renouvellement du milieu (x),
- du cancérogène modèle avec lequel la substance interagit (BaP ou TPA).

Communications intercellulaires : dans le cas des expériences de transfert de colorant (TC), les flèches indiquent l'effet du produit sur le transfert de jaune de Lucifer ; dans le cas des essais d'inhibition de la coopération métabolique (CM), les flèches indiquent une inhibition significative ($P<0,05$ entre parenthèses, sinon $P<0,01$).

“Western blot” (WB) : les + ou - indiquent des modifications ou non dans le profil de phosphorylation de la Cx43.

Immunofluorescence (IF) : les flèches indiquent l'effet du produit sur le signal fluorescent de la Cx43 dans les cellules.

NT ; non testé.

Le récapitulatif des résultats obtenus au cours de cette étude est présenté dans le tableau 20. Ces résultats soulignent que :

- l'essai de transformation morphologique des cellules SHE permet la mise en évidence du potentiel transformant des proliférateurs de peroxysomes hépatiques, les réponses obtenues étant influencées par les conditions expérimentales utilisées,
- l'inhibition, rapide et transitoire des GJIC par les HPPs a lieu selon un profil similaire dans les cellules SHE et V79, cette inhibition n'étant pas corrélée avec la phosphorylation de la connexine 43 dans les deux systèmes,
- les profils d'action différents des HPPs sur la transformation morphologique et les communications intercellulaires *via* les jonctions "gap" des cellules SHE mettent en évidence une absence de corrélation entre les deux critères.

I. Transformation morphologique des cellules SHE.

Nos résultats confirment la validité du critère de transformation morphologique, et soulignent qu'une amélioration des protocoles utilisés peut être réalisée. Le but de cette étude était aussi de définir une stratégie permettant la mise en évidence des cancérogènes de manière plus efficace sans nécessairement aboutir à un protocole unique.

En ce qui concerne les HPPs, les conditions expérimentales les mieux adaptées impliquent des expositions successives des cellules au composé testé et l'utilisation d'un milieu de pH 7,0. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les meilleurs résultats obtenus après renouvellement du milieu.

- Le renouvellement de l'exposition permet le maintien au niveau initial des concentrations de la substance étudiée.

- L'apport de milieu neuf est associé à un nouvel apport de facteurs de croissance, présents dans le sérum et qui pourraient faciliter l'expression du phénotype transformé des cellules traitées.

- Le changement de milieu pourrait avoir pour conséquence de retirer mécaniquement des facteurs synthétisés par les cellules et empêchant l'expression du phénotype transformé. Ainsi, les molécules de fibronectine, extracellulaires, déterminent en partie la morphologie des cellules de par leur lien avec le cytosquelette et les molécules d'actine intracellulaires (Ali *et al.*, 1977 ; Vaheri et Mosher, 1978) ; leur élimination pourrait conduire à l'apparition de colonies transformées dans les cultures traitées.

Le milieu de pH 7,0 semble le plus à même de permettre l'expression du potentiel transformant des quatre HPPs. L'utilisation d'un milieu de pH 6,7 augmente la sensibilité de l'essai pour 2 des 4 composés (le MCP et le MEHP). Notre réserve principale vis-à-vis du milieu acide tient à ce que les cellules non-traitées cultivées dans ce milieu présentent une morphologie identique à celle de cellules ayant subi des effets de cytotoxicité. Nous n'avons pas observé, à pH acide, les colonies de morphologie correcte décrites par LeBoeuf *et al.* (1986, 1987), même en utilisant des sérum de la plus haute qualité.

Les conditions utilisées au cours des essais réalisés à pH 6,7 sont aussi proches que possible de celles préconisées par LeBoeuf *et al.*, les sources de variabilité possibles restent le sérum et les cellules.

- Des facteurs sériques peuvent être source de variabilité. Rivedal et Haddeland (1996) ont récemment mis en évidence, sans toutefois les identifier, plusieurs substances protéiques susceptibles de participer à l'expression de la transformation morphologique des cellules SHE. On peut également citer l'intervention possible de facteurs de croissance ou de glucocorticoïdes probablement présents en quantités variables dans les différents lots de sérum (Sanner et Rivedal, 1988).

- Les cellules que nous avons utilisées au cours de nos essais proviennent de mises en culture réalisées à pH 7,0. Nous n'avons pas étudié les conséquences de l'utilisation de cellules mises en culture dans du milieu acide dès leur dissociation des embryons : cela aurait été préférable, mais il n'est pas certain que cette modalité aurait modifié les résultats.

Les trois HPPs utilisés à pH 7,35 et 7,0 (c'est-à-dire le clofibrate, le MCP et le DEHP) sont tous capables d'interagir avec le BaP ou le TPA. Le MCP s'est montré le plus actif de ce point de vue puisqu'il potentialise les effets du BaP et du TPA aux deux pH.

Les interactions avec le TPA peuvent paraître surprenantes, venant de substances considérées comme non-génotoxiques. De tels effets ont été obtenus avec d'autres cancérrogènes épigénétiques (Bessi *et al.*, 1994, 1995) et peuvent s'exprimer sur d'autres critères que l'induction de la transformation morphologique. Ainsi, Dhalluin *et al.* (1996) ont mis en évidence des effets de synergie sur l'activité de l'ornithine décarboxylase lors de l'exposition séquentielle des cellules SHE au clofibrate et au TPA. Ces auteurs ont retrouvé ce type de synergie avec des cancérrogènes non-génotoxiques autres que le clofibrate (Dhalluin *et al.*, soumis). La surinduction de l'activité de l'ODC par le clofibrate et le TPA est à mettre en relation avec la potentialisation des effets transformants du clofibrate par le TPA que nous avons observée à pH 7,35.

Ces résultats confirment que des interactions pouvant conduire à des effets cancérrogènes n'impliquent pas uniquement l'association d'un initiateur génotoxique et d'un promoteur, mais qu'elles peuvent aussi résulter de l'action de deux substances non-génotoxiques.

La mise en évidence par le système SHE des interactions entre cancérrogènes épigénétiques souligne l'intérêt de l'essai de transformation morphologique dans le cadre de la détection des cancérrogènes en général.

Il serait par ailleurs intéressant d'utiliser un autre initiateur que le BaP dans le protocole d'initiation/promotion appliqué aux HPPs. Les travaux de Cattley *et al.*, (1994) suggèrent une activité promotrice initiateur-dépendante pour le clofibrate et le Wy-14,643. Ceci a également été rapporté pour le DEHP qui :

- augmente l'incidence d'adénomes hépatiques chez des souris préalablement exposées à la N-nitrosodiéthylamine (Weghorst *et al.*, 1993), mais,

- inhibe la formation de foyers atypiques et d'adénocarcinomes pancréatiques après traitement de hamster Syrien par la N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (Maruyama *et al.*, 1994),
- et n'a pas d'effet sur le cancer de la vessie induit chez le rat par la N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (Hagiwara *et al.*, 1990).

Le mécanisme par lequel les HPPs induisent la transformation morphologique des cellules SHE reste obscur, mais plusieurs cibles peuvent être identifiées.

- Ces composés sont susceptibles d'interférer sur certaines voies de transduction du signal mitotique. En effet, le DEHP, le clofibrate et le Wy-14,643 sont capables de diminuer les quantités de protéines membranaires, dont le récepteur des EGF (Gupta *et al.*, 1988 ; Bartles *et al.*, 1990).

- Ils peuvent agir par l'activation de l'ODC, enzyme impliquée dans la synthèse des polyamines et liée à la prolifération cellulaire (Dhalluin *et al.*, 1996).

- Une action *via* le PPAR est également possible puisque ce récepteur est exprimé chez le hamster (Aperlo *et al.*, 1995). Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée à ce jour dans le but de mettre en évidence le PPAR dans les cellules SHE.

Les résultats de cette étude confirment que la transformation morphologique des cellules SHE constitue un critère intéressant pour la mise en évidence *in vitro* de potentialités cancérogènes et la détection de cancérogènes épigénétiques. En effet, l'apparition du phénotype transformé est un critère intégrateur d'un ensemble de perturbations qui peuvent affecter les transports membranaires, la transmission du signal mitotique, les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation des protéines et/ou l'expression génique. Ce caractère intégrateur est d'autant plus intéressant que les facteurs génétiques et épigénétiques de cancérogénèse sont multiples. Toutefois, la transformation morphologique qui traduit des potentialités cancérogènes ne permet pas d'identifier un mécanisme d'action précis. Peut-être faut-il voir dans cette restriction une explication au développement assez lent des essais de transformation cellulaire en dépit de la démonstration de leur valeur prédictive par Berwald et Sachs (1963, 1965) et DiPaolo *et al.* (1969). Le développement de ces essais a vraisemblablement été ralenti par l'extension simultanée et considérable des essais de mutagénicité, apparemment plus précis en terme mécanistique.

Les progrès des connaissances sur les mécanismes de la cancérogénèse ont souligné récemment l'importance des effets épigénétiques dans le processus multi-étapes conduisant les cellules du stade normal au stade malin. Ces résultats justifient la recherche de modèles expérimentaux capables d'identifier ces effets ; à ce titre, les essais de transformation cellulaire nous semblent un excellent modèle.

Les études récentes sur l'apoptose et sur ses mécanismes renforcent l'hypothèse que le développement tumoral pourrait être une conséquence de l'inhibition de la mort cellulaire programmée. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la relation existant entre le mécanisme apoptotique et la transformation cellulaire dans le système SHE. Le but étant de

renforcer nos connaissances sur les mécanismes qui conduisent à la transformation morphologique des cellules. De même, l'étude de l'implication éventuelle des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans la transformation des cellules SHE serait d'un grand intérêt.

II. Communications intercellulaires *via* les jonctions “gap”.

L'inhibition rapide et transitoire des GJIC par les HPPs pourrait s'expliquer par une action directe de ces composés, de nature lipophile, sur les connexines. Cette action pourrait se traduire par des modifications conformationnelles des connexines, provoquées par la formation de complexes entre les connexines et les HPPs eux-mêmes. Les modifications conformationnelles pourraient aussi être liées à la formation de complexes entre les connexines et certaines protéines cellulaires telles que des protéines de la famille 14-3-3 ou des protéines comportant des domaines SH2, SH3 ou WW, comme l'ont proposé Mikalsen et Kaalhus en 1997.

Ces modifications conformationnelles pourraient être à l'origine du masquage des épitopes reconnus par les anticorps que nous avons utilisés et de la disparition du signal immunofluorescent de la Cx43 induite par le MEHP dans les cellules SHE et V79.

L'inhibition des GJIC par les proliférateurs des peroxyssomes pourrait s'expliquer par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ; en effet, certains HPPs, dont le clofibrate, provoquent une augmentation de la concentration en calcium cytosolique (Ochsner *et al.*, 1990 ; Shackleton *et al.*, 1995) et le calcium est impliqué dans la prolifération peroxyssomale induite par les HPPs (Watanabe et Suga, 1988 ; Watanabe *et al.*, 1991). D'autre part, l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique semble liée à une diminution des GJIC par l'intervention de la calmoduline (Sáez *et al.*, 1993).

Néanmoins, le profil de phosphorylation de la Cx43 n'a pas été modifié au cours de nos essais. Or, Jansen *et al.* (1996a) ont montré que l'action du calcium sur les GJIC des cellules des lignées épidermiques 3PC et CA3/7 est toujours accompagnée de modifications du profil de phosphorylation de la Cx43.

Si le calcium peut être impliqué dans l'augmentation de la fréquence de transformation morphologique des cellules SHE observée après exposition à certains HPPs et au TPA, il est probable qu'il ne soit pas lié à l'inhibition des GJIC par ces substances.

Les résultats obtenus n'ont pas montré de corrélation entre l'inhibition des communications intercellulaires induites par les HPPs et le TPA, et leurs effets sur la phosphorylation de la Cx43.

Tous les HPPs induisent une inhibition rapide et transitoire des GJIC sur les cellules SHE et V79 sans provoquer de modifications majeures du profil de phosphorylation de la connexine 43. Ceci implique vraisemblablement :

- (i) l'expression par les deux types cellulaires d'autres connexines que la Cx43, responsables des effets observés sur les GJIC,
- (ii) l'existence d'une forme phosphorylée de la Cx43 dont le profil de migration électrophorétique ne se différencie pas de celui obtenu à partir de cellules non-traitées.

Le TPA n'induit pas de modification majeure et reproductible du profil de phosphorylation de la Cx43 dans les cellules SHE ; à l'inverse, lorsque les cellules V79 sont exposées à l'ester de phorbol, la phosphorylation de la Cx43 est affectée.

L'absence de corrélation entre GJIC et phosphorylation de la Cx43 a déjà été observée sur d'autres types cellulaires après traitement par le TPA :

- dans une lignée de cellules épithéliales issues de foie de rat (Asamoto *et al.*, 1991),
- dans des cellules musculaires lisses d'origine humaine (Moreno *et al.*, 1993).

La phosphorylation de la connexine 43 n'intervient donc pas systématiquement dans la régulation des GJIC.

III. Liens entre la transformation morphologique et l'inhibition des GJIC dans les cellules SHE.

Les HPPs inhibent les communications intercellulaires et induisent la transformation morphologique des cellules SHE. Les quatre substances que nous avons utilisées, présentent néanmoins des profils d'action différents, en effet :

- le clofibrate induit la transformation morphologique et l'inhibition de communications intercellulaires des cellules SHE à des concentrations comparables, de l'ordre de 100 à 200 μM ,
- de même, le MCP agit à partir de 50 à 100 μM sur les deux critères,
- par contre, les concentrations de DEHP et de MEHP qui sont actives sur le processus de transformation des cellules SHE sont plus faibles (25 μM) que celles qui inhibent les GJIC (200 μM).

Il semble, sur la base de ces résultats obtenus pour des gammes de concentrations très différentes, que l'inhibition des GJIC et l'induction de la transformation morphologique par les HPPs dans les cellules SHE soient des phénomènes indépendants.

L'étude effectuée par Mikalsen et Sanner en 1993 vient appuyer cette conclusion : ces auteurs ont effectué des essais de microinjection de jaune de Lucifer dans des colonies de cellules SHE traitées par la dieldrine, le vanadate, le TPA et le DEHP. Il ressort de cette étude que la dieldrine inhibe totalement le transfert de colorant sans augmentation de la transformation morphologique, alors que le vanadate, bien que transformant, n'a aucun effet sur les GJIC. D'autre part, le TPA (160 nM) et le DEHP (77 μM) inhibent les GJIC d'environ 30% aussi bien dans les colonies normales que dans celles présentant un phénotype transformé. Mikalsen (1993) a aussi montré que les cellules transformées ne présentent pas de GJIC sélectives. En effet, les cellules incluses dans des colonies transformées communiquent autant avec les cellules nourricières, avec les cellules normales ou avec les cellules transformées avoisinantes.

L'inhibition des GJIC n'est donc pas nécessairement corrélée au phénotype transformé dans les cellules SHE.

Il est néanmoins évident que l'isolement des cellules de leur environnement les soustrait à l'influence régulatrice des cellules voisines et peut favoriser leur évolution vers le stade néoplasique. La capacité d'une substance à inhiber les communications intercellulaires ne peut qu'aggraver son pouvoir transformant : l'inhibition des communications intercellulaires *via* les jonctions "gap" n'est pas nécessaire à l'induction de la transformation morphologique, mais elle la favorise probablement.

L'étude des communications intercellulaires semble donc, tout autant que l'étude de la transformation morphologique, indispensable dans le cadre de la détection des potentialités cancérogènes des substances chimiques.

CONCLUSION

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la cancérogénèse par mécanismes épigénétiques et de la détection *in vitro* des cancérogènes non-génotoxiques. Nous avons étudié tout particulièrement deux critères :

- la transformation morphologique des cellules SHE,
- l'inhibition de la communication intercellulaire *via* les jonctions "gap",

dans le but d'évaluer leurs capacités à mettre en évidence les potentialités cancérogènes des agents chimiques.

L'étude a porté sur quatre substances appartenant à la catégorie des proliférateurs de peroxyssomes hépatiques (HPPs), cancérogènes chez le rongeur, mais non-génotoxiques :

- le clofibrate et son analogue structural plus actif *in vivo*, le méthyl clofénapate (MCP),
- le di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) et l'un de ses métabolites majeurs, le mono(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP).

Nous avons successivement étudié (i) l'influence des conditions expérimentales sur le pouvoir transformant des quatre HPPs vis-à-vis des cellules d'embryon de hamster Syrien (SHE), et (ii) l'effet de ces quatre composés et du TPA sur les communications intercellulaires dans les cellules SHE et V79, ainsi que sur la phosphorylation et la localisation de la connexine 43.

Nous avons montré que la **transformation morphologique des cellules SHE** constitue un bon critère pour la mise en évidence *in vitro* du potentiel transformant des HPPs. Certains facteurs expérimentaux susceptibles d'influencer la réponse obtenue en jouant sur la biodisponibilité ont été identifiés. Il est apparu que le pouvoir transformant des HPPs pouvait être détecté avec une meilleure sensibilité par le renouvellement du milieu en cours d'essai et par l'utilisation d'un milieu de pH 7,0.

Un pH plus acide (pH 6,7) peut aussi améliorer la sensibilité, mais la détection de l'activité transformante des HPPs n'est pas systématique à ce pH. Par ailleurs, la lecture des tests réalisés avec un milieu acide est plus difficile qu'à pH 7,0.

Les résultats de notre travail nous amènent à suggérer une stratégie pour la détection des substances cancérogènes : il s'agirait en premier lieu d'effectuer plusieurs applications de la substance testée sur les cellules SHE à pH 7,0 ; et, en cas de réponse négative, d'utiliser le protocole d'initiation/promotion de manière à augmenter la sensibilité du test.

Le protocole d'initiation/promotion doit être recommandé. Ce protocole est basé sur le traitement séquentiel des cellules par la substance testée et un cancérogène modèle utilisé à faible concentration. Cette méthode facilite la mise en évidence des potentialités cancérogènes par la détection des effets d'interaction entre composés ; elle permet aussi une approche mécanistique de l'action spécifique des substances étudiées. Ce protocole conduit à des taux de transformation souvent élevés et met en évidence des interactions entre cancérogènes génotoxiques et/ou non-génotoxiques.

L'étude des GJIC par transfert de colorant ou à l'aide de l'essai d'inhibition de la coopération métabolique constitue également un critère de cancérogénèse intéressant pour l'étude de la transformation néoplasique.

L'inhibition des GJIC par les HPPs, mise en évidence par transfert de jaune de Lucifer, est rapide et transitoire dans les cellules SHE et V79. L'inhibition de la coopération métabolique des cellules V79 nécessite des concentrations plus élevées que pour les cellules SHE.

Nous avons évalué si l'inhibition des communications intercellulaires par les HPPs résultait d'une action sur le profil de phosphorylation ou sur la localisation de la connexine 43 présente dans les deux systèmes cellulaires.

Ces travaux ont montré que les HPPs n'agissent pas sur le profil de phosphorylation de la Cx43 dans les cellules SHE et V79. Hormis le MEHP, ils n'affectent pas la localisation cellulaire de cette connexine. La disparition totale du signal immunofluorescent de la Cx43 après exposition des cellules au MEHP nous a conduit à l'hypothèse d'un changement conformationnel de la molécule de Cx43. Cette modification peut conduire au masquage des épitopes reconnus par les anticorps.

Des études réalisées parallèlement sur le TPA ont montré une forte inhibition des GJIC dans les deux types cellulaires. L'ester de phorbol provoque également la disparition du signal immunofluorescent de la Cx43 dans les cellules SHE et V79. Par contre, le TPA modifie le profil de phosphorylation de la Cx43 uniquement dans les cellules V79. Ces résultats nous ont amenés à la conclusion que d'autres connexines que la Cx43 pouvaient être impliquées dans le caractère fonctionnel des GJIC des cellules SHE.

Compte tenu du caractère transitoire de l'inhibition des GJIC par les HPPs et des concentrations élevées auxquelles elle se produit, il nous semble peu probable que l'inhibition des communications intercellulaires intervienne dans l'induction de la transformation morphologique des cellules SHE par ces substances.

Les essais de transformation cellulaire et d'inhibition des communications intercellulaires ont été proposés pour la détection des cancérogènes. Les résultats de cette étude contribuent à valider l'utilisation de ces méthodes alternatives dans le cadre du "screening" des substances cancérogènes.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont multiples et concernent à la fois les proliférateurs des peroxysomes hépatiques, la transformation cellulaire et les GJIC.

Pour expliquer les effets des HPPs observés au cours de cette étude, il serait intéressant de déterminer si les cellules SHE que nous avons utilisées expriment le PPAR.

D'autre part, l'étude de l'implication des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans la transformation cellulaire ; de même que l'étude des relations entre les mécanismes apoptotiques et la transformation cellulaire *in vitro*, pourraient permettre de

clarifier certains aspects du mécanisme conduisant à la transformation morphologique des cellules.

Nos connaissances sur la régulation des communications intercellulaires via les jonctions "gap" pourraient être approfondies par la recherche, dans les cellules SHE et V79 des connexines autres que la Cx43, ainsi que par l'identification des sites de phosphorylation présents et des perturbations provoquées par les cancérogènes.

Ces études, associées à des recherches pratiques visant à identifier et à contrôler les substances protéiques présentes dans les sérum utilisés, nous apporteraient des renseignements plus précis sur les mécanismes impliqués dans le processus de cancérogénèse.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Afshari C.A., Kodama S., Bivins H.M., Willard T.B., Fujiki H. et Barrett J.C., 1993.
Induction of neoplastic progression in Syrian hamster embryo cells treated with protein phosphatase inhibitors. *Cancer Res.* 53, 1777-1782.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D., 1994.
Le cycle de la division cellulaire. Dans : Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D (eds.). *Biologie moléculaire de la cellule*, 3^{ème} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, chapitre 17, pp. 863-911.

Albro P.W., 1986.
Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl)phthalate by rats and mice. *Environ. Health Perspect.* 65, 293-298.

Ali I.U., Mautner V., Lanza R. et Hynes R.O., 1977.
Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface protein. *Cell* 11, 115-126.

Ames B.N., McCann J. et Yamasaki E., 1975.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.

Aperlo C., Pognonec P., Saladin R., Auwerx J. et Boulukos K.E., 1995.
cDNA cloning and characterization of the transcriptional activities of the hamster peroxisome proliferator-activated receptor haPPAR. *Gene* 162, 297-302.

Asamoto M., Oyamada M., El Aoumari A., Gros D. et Yamasaki H., 1991.
Molecular mechanisms of TPA-mediated inhibition of gap-junctional intercellular communication: evidence for action on the assembly or function but not the expression of connexin 43 in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.* 4, 322-327.

Ashby J., Brady A., Elcombe C.R., Elliott B.M., Ishmael J., Odum J., Tugwood J.D., Kettle S. et Purchase I.F.H., 1994.
Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, S1-S117.

Ashby J. et Tennant R.W., 1991.
Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat. Res.* 257, 229-306.

Barrass N.C., Price R.J., Lake B.G. et Orton T.C., 1993.
Comparison of the acute and chronic mitogenic effects of the peroxisome proliferators methylclofenapate and clofibric acid in rat liver. *Carcinogenesis* 14, 1451-1456.

Barrett J.C., Hesterberg T.W., Oshimura M. et Tsutsui T., 1985.

Role of chemically induced mutagenic events in neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells. *Dans* : Barrett J.C. et Tennant R.W. (eds.). *Carcinogenesis*, Vol. 9. Raven Press, New York, 123-137.

Barrett J.C., 1993.

Neoplastic progression of Syrian hamster embryo cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 30-36.

Barrett J.C. et Lamb P.W., 1985.

Tests with the Syrian hamster embryo cell transformation assay. *Dans* : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 623-628.

Barrett J.C. et Ts'o P.O.P., 1978.

Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 3761-3765.

Bartles J.R., Khuon S., Lin X., Zhang L., Reddy J.K., Rao M.S., Isoye S.T., Nehme C.L. et Fayos B.E., 1990.

Peroxisome proliferator-induced alterations in the expression and modification of rat hepatocyte plasma membrane proteins. *Cancer Res.* 50, 669-676.

Bayly A.C., Roberts R.A. et Dive C., 1994.

Suppression of liver cell apoptosis *in vitro* by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J. Cell Biol.* 125, 197-203.

Bennett M.V.L., Barrio L.C., Bargiello T.A., Spray D.C., Hertzberg E. et Sáez J.C., 1991.

Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6, 305-320.

Bentley P., Calder I., Elcombe C., Grasso P., Stringer D. et Wiegand H.-J., 1993.

Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Fd. Chem. Toxic.* 31, 857-907.

Berenblum I., 1941.

Carcinogenesis as a biological problem. North Holland Co, Amsterdam.

Berenblum I., 1982.

Sequential aspects of chemical carcinogenesis: skin. *Dans* : Becker F.F. (ed.). *Cancer: a comprehensive treatise*. Plenum, New York, 451-484.

Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S., Oronzi Scott M., Bone L.J., Paul D.L., Chen K., Lensch M.W., Chance P.F. et Fischbeck K.H., 1993.

Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262, 2039-2041.

Berwald Y. et Sachs L., 1963.

In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200, 1182-1184.

Berwald Y. et Sachs L., 1965.

In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Nat. Cancer Inst.* 35, 641-661.

Bessi H., Rast C., Nguyen-Ba G. et Vasseur P., 1994.

Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit gap junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *Cancer JI.* 7, 248-253.

Bessi H., Rast C., Rether B., Nguyen-Ba G. et Vasseur P., 1995.

Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis* 16, 237-244.

Beyer E.C., Paul D.L. et Goodenough D.A., 1990.

Connexin family of gap junction proteins. *J. Membrane Biol.* 116, 187-194.

Bieri F., Bentley P., Waechter F. et Stäubli W., 1984.

Use of primary cultures of adult rat hepatocytes to investigate mechanisms of action of nafenopin, a hepatocarcinogenic peroxisome proliferator. *Carcinogenesis* 5, 1033-1039.

Bieri F., 1993.

Peroxisome proliferators and cellular signaling pathways. A review. *Biol. Cell.* 77, 43-46.

Bishop J.M., 1982.

Oncogenes. *Sci. Am.* 246, 69-78.

Borek C., 1991.

Free-radical processes in multistage carcinogenesis. *Free Rad. Res. Comms.* 12/13, 745-750.

Boveri T., 1914.

Zur frage des Entstehung maligner tumoren. Gustav Fischer, Jena.

Boyd J.A. et Barrett J.C., 1990.

Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmac. Ther.* 46, 469-486.

Brissette J.L., Kumar N.M., Gilula N.B. et Dotto G.P., 1991.

The tumor promoter 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the *ras* oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5364-5371.

Britz-Cunningham S.H., Shah M.M., Zuppan C.W. et Fletcher W.H., 1995.

Mutations of the *connexin43* gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* 332, 1323-1329.

Bruzzone R., White T.W. et Paul D.L., 1996.

Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1-27.

Budunova I.V., 1994.

Alteration of gap junctional intercellular communication during carcinogenesis. *Cancer J.* 7, 228-237.

Budunova I.V. et Williams G.M., 1994.

Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 71-116.

Bursch W., Lauer B., Timmermann-Trosiener I., Barthel G., Schuppler J. et Schulte-Hermann R., 1984.

Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5, 453-458.

Cattley R.C., Marsman D.S. et Popp J.A., 1991.

Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator WY-14,643 in rat liver. *Carcinogenesis* 12, 469-473.

Cattley R.C., Kato M., Popp J.A., Teets V.J. et Voss K.S., 1994.

Initiator-specific promotion of hepatocarcinogenesis by WY-14,643 and clofibrate. *Carcinogenesis* 15, 1763-1766.

Cattley R.C. et Glover S.E., 1993.

Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization. *Carcinogenesis* 14, 2495-2499.

Cerutti P.A., 1985.

Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.

Chen L. et Meng M.Q., 1995.

Compact and scattered gap junctions in diffusion mediated cell-cell communication. *J. theor. Biol.* 176, 39-45.

Cherkaoui Malki M., Lone Y.C., Corral-Debrinski M. et Latruffe N., 1990.

Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 855-861.

Chouroulinkov I. et Lasne C., 1978.

Two stage (initiation-promotion) carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Bull. Cancer* 65, 255-264.

Chu R., Lin Y., Reddy K.C., Pan J., Rao M.S., Reddy J.K. et Yeldandi A.V., 1996.

Transformation of epithelial cells stably transfected with H₂O₂-generating peroxisomal urate oxidase. *Cancer Res.* 56, 4846-4852.

Cizdziel P.E., Hosoi J., Montgomery J.C., Wiseman R.W. et Barrett J.C., 1991.

Loss of a tumor suppressor gene function is correlated with down regulation of chondrocyte-specific collagen expression in Syrian hamster embryo cells. *Mol. Carcinog.* 4, 14-24.

Conway J.G., Tomaszewski K.E., Olson M.J., Cattley R.C., Marsman D.S. et Popp J.A., 1989.

Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and Wy-14,643. *Carcinogenesis* 10, 513-519.

Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S. et Watts-Tobin R.J., 1961.

General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192, 1227-1232.

Crick F.H.C. 1966.

Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 13, 302-324.

Cruciani V., Bessi H., Alexandre S., Durand M.-J., Rast C., Nguyen-Ba G. et Vasseur P., 1996.

SHE cell transformation assay as a predictive system for carcinogenicity of PAH and non-genotoxic carcinogens. *Polycyclic Aromatic Compounds* 10, 307-314.

Cruciani V., Rast C., Durand M.-J., Nguyen-Ba G. et Vasseur P., 1997.

Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 18, 701-706.

Dhalluin S., Cruciani V., Rast C., Vasseur P., Tapiero H. et Nguyen-Ba G., 1996.

Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities. *Cell. Pharmacol.* 3, 23-28.

Dhalluin S., Elias Z., Cruciani V., Bessi H., Poirot O., Rast C., Gate L., Tapiero H., Vasseur P. et Nguyen-Ba G.

Staged exposure of Syrian hamster embryo cells to environmental carcinogens: overexpression of ornithine decarboxylase correlates with cell transformation frequency, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Soumis.

DiPaolo J.A., Donovan P. et Nelson R., 1969.

Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens. *J. Nat. Cancer Inst.* 42, 867-876.

DiPaolo J.A., 1980.

Quantitative *in vitro* transformation of Syrian golden hamster embryo cells with the use of frozen stored cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 64, 1485-1489.

Dirven H.A.A.M., van den Broek P.H.H., Peeters M.C.E., Peters J.G.P., Mennes W.C., Blaauboer B.J., Noordhoek J. et Jongeneelen F.J., 1993.

Effects of the peroxisome proliferator mono(2-ethylhexyl)phthalate in primary hepatocyte cultures derived from rat, Guinea pig, rabbit and monkey. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2425-2434.

Diwan B.A., Ward J.M., Rice J.M., Colburn N.H. et Spangler E.F., 1985.

Tumor-promoting effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in JB6 mouse epidermal cells and mouse skin. *Carcinogenesis* 6, 343-347.

Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G. et Wahli W., 1992.

Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879-887.

Eagon P.K., Chandar N., Epley M.J., Elm M.S., Brady E.P. et Rao K.N., 1994.

Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced changes in liver estrogen metabolism and hyperplasia. *Int. J. Cancer* 58, 736-743.

ECETOC Monograph, 1992.

Hepatic peroxisome proliferation. *European Center for Ecotoxicology and Toxicology*, Bruxelles. Monograph 17.

Elcombe C.R. et Mitchell A.M., 1986.

Peroxisome proliferation due to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): species differences and possible mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 70, 211-219.

Elias Z., 1993.

Transformation et cancérogénèse. Essais en cours de validation. Formation Continue, mars 1993, Metz-France.

Elliott B.M., Dodd N.J.F. et Elcombe C.R., 1986.

Increased hydroxyl radical production in liver peroxisomal fractions from rats treated with peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 7, 795-799.

Elliott B.M. et Elcombe C.R., 1987.

Lack of DNA damage or lipid peroxidation measured *in vivo* in the rat liver following treatment with peroxisomal proliferators. *Carcinogenesis* 8, 1213-1218.

Elmore E., Korytnski E.A. et Smith M.P., 1985.

Tests with the Chinese hamster V79 inhibition of metabolic cooperation assay. Dans : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 597-612.

El-Sabban M.E. et Pauli B.U., 1991.

Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. *J. Cell Biol.* 115, 1375-1382.

Endo S., Metzler M. et Hieber L., 1994.

Nonrandom karyotypic changes in a spontaneously immortalized and tumourigenic Syrian hamster embryo cell line. *Carcinogenesis* 15, 2387-2390.

Endo S. et Hieber L., 1995.

Chromosome alterations that correlate with progression to immortality in Syrian hamster embryo cells transformed by γ -irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 177-186.

Enomoto T., Martel N., Kanno Y. et Yamasaki H., 1984.

Inhibition of cell communication between Balb/c 3T3 cells by tumor promoters and protection by cAMP. *J. Cell Physiol.* 121, 323-333.

Enomoto T. et Yamasaki H., 1985.

Rapid inhibition of intercellular communication between BALB/c 3T3 cells by diacylglycerol, a possible endogenous functional analogue of phorbol esters. *Cancer Res.* 45, 3706-3710.

Esinduy C.B., Chang C.C., Trosko J.E. et Ruch R.J., 1995.

In vitro growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* 16, 915-921.

Finbow M.E. et Pitts J.D., 1993.

Is the gap junction channel - the connexone - made of connexin or ductin? *J. Cell Science*, 106, 463-472.

Fitzgerald D.J. et Yamasaki H., 1990.

Tumor promotion: models and assay systems. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 10, 89-102.

Foxworthy P.S. et Eacho P.I., 1994.

Cultured hepatocytes for studies of peroxisome proliferation: methods and applications. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 31, 21-30.

Gill J.H., Molloy C.A., Shoesmith K.J., Bayly A.C. et Roberts R.A., 1995.

The rodent non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin and EGF alter the mitosis/apoptosis balance promoting hepatoma cell clonal growth. *Cell Death and Differentiation*, 2, 211-217.

Gilmer T.M., Annab L.A. et Barrett J.C., 1988.

Characterization of activated proto-oncogenes in chemically transformed Syrian hamster embryo cells. *Mol. Carcinog.* 1, 180-188.

Göttlicher M., Widmark E., Li Q. et Gustafsson J.-Å., 1992.

Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4653-4657.

Göttlicher M., Demoz A., Svensson D., Tollet P., Berge R.K. et Gustafsson J.-Å., 1993.

Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochem. Pharmacol.* 46, 2177-2184.

Grasl-Kraupp B., Huber W., Timmermann-Trosiener I. et Schulte-Hermann R., 1993.

Peroxisomal enzyme induction uncoupled from enhanced DNA synthesis in putative preneoplastic liver foci of rats treated with a single dose of the peroxisome proliferator nafenopin. *Carcinogenesis* 14, 2435-2437.

Green C.R., Peters N.S., Gourdie R.G., Rothery S. et Severs N.J., 1993.

Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1339-1349.

Guan X., Wilson S., Schlender K.K. et Ruch R.J., 1996.

Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 β -glycyrrhetic acid. *Mol. Carcinog.* 16, 157-164.

Gupta C., Hattori A. et Shinozuka H., 1988.

Suppression of EGF binding in rat liver by the hypolipidemic peroxisome proliferators, 4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio-(N- β -hydroxyethyl)acetamide and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Carcinogenesis* 9, 167-169.

Guy G.R., Tapley P.M. et Murray A.W., 1981.

Tumor promoter inhibition of intercellular communication between cultured mammalian cells. *Carcinogenesis* 2, 223-227.

Hagiwara A., Tamano S., Ogiso T., Asakawa E. et Fukushima S., 1990.

Promoting effect of the peroxisome proliferator, clofibrate, but not di(2-ethylhexyl)phthalate, on urinary bladder carcinogenesis in F344 rats initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1232-1238.

Harris C.C., 1991.

Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51, 5023s-5044s.

Hatch G.G. et Anderson T.M., 1985.

Assays for enhanced DNA viral transformation of primary Syrian hamster embryo (SHE) cells. Dans : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 629-638.

Haubrich S., Schwarz H.-J., Bukauskas F., Lichtenberg-Fraté H., Traub O., Weingart R. et Willecke K., 1996.

Incompatibility of connexin 40 and 43 hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1995-2006.

Hess R., Stäubli W. et Riess W., 1965.

Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 205, 856-858.

Hii C.S., Ferrante A., Schmidt S., Rathjen D.A., Robinson B.S., Poulos A. et Murray A.W., 1995.

Inhibition of gap junctional communication by polyunsaturated fatty acids in WB cells: evidence that connexin 43 is not hyperphosphorylated. *Carcinogenesis* 16, 1505-1511.

Hinton R.H. et Price S.C., 1993.

Extrahepatic peroxisome proliferation and the extrahepatic effects of peroxisome proliferators. *Dans* : Gibson G. et Lake B. (eds.). *Peroxisomes: biology and importance in toxicology and medicine*. Taylor and Francis, Londres, 487-511.

Holder J.W., Elmore E. et Barrett J.C., 1993.

Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 53, 3475-3485.

Hossain M.Z., Wilkens L.R., Mehta P.P., Loewenstein W. et Bertram J.S. 1989.

Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 10, 1743-1748.

Hotz-Wagenblatt A. et Shalloway D., 1993.

Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncog.* 4, 541-558.

Huber W.W., Grasl-Kraupp B. et Schulte-Hermann R., 1996.

Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and implications on human risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 365-481.

Husøy T., Mikalsen S.-O. et Sanner T., 1993.

Phosphatase inhibitors, gap junctional intercellular communication and [¹²⁵I]-EGF binding in hamster fibroblasts. *Carcinogenesis* 14, 2257-2265.

Huttunen J.K., Heinonen O.P., Manninen V., Koskinen P., Hakulinen T., Teppo L., Mänttari M. et Frick M.H., 1994.

The Helsinki heart study: an 8.5-year safety and mortality follow-up. *J. Int. Med.* 235, 31-39.

Isfort R.J., Cody D.B., Asquith T.N. et LeBoeuf R.A., 1992a.

Phenotypic differences between Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.7 and 7.3. *In vitro Cell Dev. Biol.* 28A, 635-642.

Isfort R.J., Kerckaert G., Anderson N.L. et LeBoeuf R.A., 1992b.

Two-dimensional gel electrophoresis analysis of Syrian hamster embryo cells: morphological transformation is not cell type specific. *Electrophoresis* 13, 855-861.

Isfort R.J., Cody D.B., Asquith T.N., Ridder G.M., Stuard S.B. et LeBoeuf R.A., 1993.

Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. *Eur. J. Biochem.* 213, 349-357.

Isfort R.J., Cody D.B., Stuard S.B., Ridder G.M. et LeBoeuf R.A., 1996a.

Calcium functions as a transcriptional and mitogenic repressor in Syrian hamster embryo cells: roles of intracellular pH and calcium in controlling embryonic cell differentiation and proliferation. *Exp. Cell Res.* 226, 363-371.

Isfort R.J., Kerckaert G.A., Cody D.B., Carter J., Driscoll K.E. et LeBoeuf R.A., 1996b.

Isolation and biological characterization of morphological transformation-sensitive Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 17, 997-1005.

Isfort R.J., Kerckaert G.A. et LeBoeuf R.A., 1996c.

Comparison of the standard and reduced pH Syrian hamster embryo (SHE) cell in vitro transformation assays in predicting the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat. Res.* 356, 11-63.

Issemann I. et Green S., 1990.

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.

Issemann I., Prince R.A., Tugwood J.D. et Green S., 1993.

The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol.* 11, 37-47.

Jansen L.A.M. et Jongen W.M.F., 1996.

The use of initiated cells as a test system for the detection of inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* 17, 333-339.

Jansen L.A.M., de Vrije T. et Jongen W.M.F., 1996a.

Differences in the calcium-mediated regulation of the gap junctional intercellular communication between a cell line consisting of initiated cells and a carcinoma-derived cell line. *Carcinogenesis* 17, 2311-2319.

Jansen L.A.M., Mesnil M. et Jongen W.M.F., 1996b.

Inhibition of gap junctional intercellular communication and delocalization of the cell adhesion molecule E-cadherin by tumor promoters. *Carcinogenesis* 17, 1527-1531.

Jansen L., Mesnil M., Koeman J. et Jongen W., 1996c.

Tumor promoters induce inhibition of gap junctional intercellular communication in mouse epidermal cells by affecting the localization of connexin43 and E-cadherin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1, 185-192.

Jones C.A., Huberman E., Callahan M.F., Tu A., Halloween W., Pallota S., Sivak A., Lubet R.A., Avery M.D., Kouri R.E., Spalding J. et Tennant R.W., 1988.

An interlaboratory evaluation of the Syrian hamster embryo cell transformation assay using eighteen coded chemicals. *Toxicol. In Vitro* 2, 103-116.

Jongen W.M.F., Fitzgerald D.J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T.J., Gros D., Takeichi M. et Yamasaki H., 1991.

Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 114, 545-555.

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.

Kamibayashi Y., Oyamada Y., Mori M. et Oyamada M., 1995.

Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis *in vivo*. *Carcinogenesis* 16, 1287-1297.

Kawachi T., Yahagi T., Kada T., Tazima Y., Ishidate M., Sasaki M. et Sugiyama T., 1980.

Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan. *IARC Sci. Publ.* 27, 323-330.

Keller H., Dreyer C., Medin J., Mahfoudi A., Ozato K. et Wahli W., 1993.

Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2160-2164.

Kenne K., Fransson-Steen R., Honkasalo S. et Wärngård L., 1994.

Two inhibitors of gap junctional intercellular communication, TPA and endosulfan: different effects on phosphorylation of connexin 43 in the rat liver epithelial cell line, IAR 20. *Carcinogenesis* 15, 1161-1165.

Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A. et Isfort R.J., 1996.

pH effects on the lifespan and transformation frequency of Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Carcinogenesis* 17, 1819-1824.

Klaunig J.E., Ruch R.J., DeAngelo A.B. et Kaylor W.H., 1988.

Inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication by phthalate monoesters. *Cancer Lett.* 43, 65-71.

Kliwer S.A., Umesono K., Noonan D.J., Heyman R.A. et Evans R.M., 1992.

Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.

Koi M., Afshari C.A., Annab L.A. et Barrett J.C., 1989.

Role of a tumor-suppressor gene in the negative control of anchorage-independent growth of Syrian hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 8773-8777.

Koi M. et Barrett J.C., 1986.

Loss of tumor-suppressive function during chemically induced neoplastic progression of Syrian hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 5992-5996.

Kornbrust D.J., Barfknecht T.R. et Ingram P., 1984.

Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate on DNA repair and lipid peroxidation in rat hepatocytes and on metabolic cooperation in Chinese hamster V-79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 13, 99-116.

Kraupp-Grasl B., Huber W., Taper H. et Schulte-Hermann R., 1991.

Increased susceptibility of aged rats to hepatocarcinogenesis by the peroxisome proliferator nafenopin and the possible involvement of altered liver foci occurring spontaneously. *Cancer Res.* 51, 666-671.

Krutovskikh V.A., Oyamada M. et Yamasaki H., 1991.

Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication *in vivo*. *Carcinogenesis* 12, 1701-1706.

Krutovskikh V.A., Mesnil M., Mazzoleni G. et Yamasaki H., 1995.

Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents *in vivo*. *Lab. Invest.* 72, 571-577.

Kumar N.M. et Gilula N.B., 1996.

The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

Laird D.W., 1996.

The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 28, 311-318.

Laird D.W., Castillo M., and Kasprzak L., 1995.

Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J. Cell Biol.* 131, 1193-1203.

- Lake B.G., Gray T.J.B., Foster J.R., Stubberfield C.R. et Gangolli S.D., 1984.
Comparative studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat and hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 46-60.
- Lake B.G., Kozlen S.L., Evans J.G., Gray T.J.B., Young P.J. et Gangolli S.D., 1987.
Effect of prolonged administration of clofibric acid and di-(2-ethylhexyl)phthalate on hepatic enzyme activities and lipid peroxidation in the rat. *Toxicology* 44, 213-228.
- Lake B.G., Evans J.G., Gray T.J.B., Körösi S.A. et North C.J., 1989.
Comparative studies on nafenopin-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat, Syrian hamster, Guinea pig, and marmoset. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 148-160.
- Lake B.G., Evans J.G., Cunninghame M.E. et Price R.J. 1993.
Comparison of the hepatic effects of nafenopin and WY-14,643 on peroxisome proliferation and cell replication in the rat and Syrian hamster. *Environ. Health Perspect.* 101, 241-248.
- Lake B.G. et Lewis D.F.V., 1993.
Structure-activity relationships for chemically induced peroxisome proliferation in mammalian liver. *Dans : Gibson G. et Lake B. (eds.). Peroxisomes: biology and importance in toxicology and medicine.* Taylor and Francis, Londres, 313-343.
- Lawley P.D., 1989.
Mutagens as carcinogens: development of current concepts. *Mutat. Res.* 213, 3-25.
- Lawrence N. et McGregor D.B., 1985.
Assays for the induction of morphological transformation in C3H/10T½ cells in culture with and without S9-mediated metabolic activation. *Dans : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens, Vol. 5.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 651-658.
- Lawrence T.S., Beers W.H. et Gilula N.B., 1978.
Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 272, 501-506.
- LeBoeuf R.A., Kerckaert G.A., Poiley J.A. et Raineri R., 1989.
An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH. *Mutat. Res.* 222, 205-218.

LeBoeuf R.A., Kerckaert G.A., Aardema M.J., et Gibson D.P., 1990.

Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Res.* 50, 3722-3729.

LeBoeuf R.A., Lin P., Kerckaert G.A. et Gruenstein E., 1992.

Intracellular acidification is associated with enhanced morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res.* 52, 144-148.

LeBoeuf R.A., Kerckaert G.A., Aardema M.J., Gibson D.P., Brauning R. et Isfort R.J., 1996.

The pH 6.7 Syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat Res.* 356, 85-127.

LeBoeuf R.A. et Kerckaert G.A., 1986.

The induction of transformed-like morphology and enhanced growth in Syrian hamster embryo cells grown at acidic pH. *Carcinogenesis* 7, 1431-1440.

LeBoeuf R.A. et Kerckaert G.A., 1987.

Enhanced morphological transformation of early passage Syrian hamster embryo cells cultured in medium with a reduced bicarbonate concentration and pH. *Carcinogenesis* 8, 689-697.

Lefevre P.A., Tinwell H., Galloway S.M., Hill R., Mackay J.M., Elcombe C.R., Foster J., Randall V., Callander R.D. et Ashby J., 1994.

Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using Muta Mouse and Big Blue transgenic mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 764-775.

Leibold E., Greim H. et Schwarz L.R., 1994.

Inhibition of intercellular communication of rat hepatocytes by nafenopin: involvement of protein kinase C. *Carcinogenesis* 15, 1265-1269.

Lemberger T., Desvergne B. et Wahli W., 1996.

Peroxisome proliferator activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 335-363.

Lhugenot J.C., Mitchell A.M. et Elcombe C.R., 1988.

The metabolism of mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) and liver peroxisome proliferation in the hamster. *Toxicology and Industrial Health* 4, 431-441.

Lillehaug J.R., Aarsaether N., Berge R.K. et Male R., 1986.

Peroxisome proliferators show tumor-promoting but no direct transforming activity *in vitro*. *Int. J. Cancer* 37, 97-100.

Linnainmaa K., 1984.

Induction of sister chromatid exchanges by the peroxisome proliferators 2,4-D, MCPA, and clofibrate *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* 5, 703-707.

Lo C.W., 1996.

The role of gap junction membrane channels in development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 28, 379-385.

Loewenstein W.R., 1979.

Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* 560, 1-65.

Malcolm A.R. et Mills L.J., 1989.

Inhibition of gap-junctional intercellular communication between Chinese hamster lung fibroblasts by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and trisodium nitrilotriacetate monohydrate (NTA). *Cell Biol. Toxicol.* 5, 145-153.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. et Evans R.M., 1995.

The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Mangelsdorf D.J. et Evans R.M., 1995.

The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Mannaerts G.P. et Van Veldhoven P.P., 1993.

Metabolic role of mammalian peroxisomes. *Dans : Gibson G. et Lake B. (eds.). Peroxisomes: biology and importance in toxicology and medicine.* Taylor and Francis, Londres, 19-62.

Marsman D.S., Cattley R.C., Conway J.G. et Popp J.A., 1988.

Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylyldino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res.* 48, 6739-6744.

Marsman D.S., Goldsworthy T.L. et Popp J.A., 1988.

Contrasting hepatocytic peroxisome proliferation, lipofuscin accumulation and cell turnover for the hepatocarcinogens Wy-14,643 and clofibric acid. *Carcinogenesis* 13, 1011-1017.

Maruyama H., Amanuma T., Tsutsumi M., Tsujiuchi T., Horiguchi K., Denda A. et Konishi Y., 1994.

Inhibition by catechol and di(2-ethylhexyl)phthalate of pancreatic carcinogenesis after initiation with *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in Syrian hamsters. *Carcinogenesis* 15, 1193-1196.

Matesic D.F., Rupp H.L., Bonney W.J., Ruch R.J. et Trosko J.E., 1994.

Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.* 10, 226-236.

Matthews E.J., DelBalzo T. et Rundell J.O., 1985.

Assays for morphological transformation and mutation to ouabain resistance of Balb/c-3T3 cells in culture. *Dans* : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 639-650.

Matthews E.J., Spalding J.W. et Tennant R.W., 1993a.

Transformation of Balb/c-3T3 cells: V. Transformation responses of 168 chemicals compared with mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in rodent assays. *Environ. Health Perspect.* 101, 347-482.

Matthews E.J., Spalding J.W. et Tennant R.W., 1993b.

Transformation of Balb/c-3T3 cells: IV. Rank-ordered potency of 24 chemical responses detected in a sensitive new assay procedure. *Environ. Health Perspect.* 101, 319-345.

May W.S., Jr, Sahyoun N., Wolf M. et Cuatrecasas P., 1985.

Role of intracellular calcium mobilization in the regulation of protein kinase C-mediated membrane process. *Nature* 317, 549-551.

McCann, J., Choi E., Yamasaki E. et Ames B.N., 1975.

Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 5135-5139.

Meda P., 1996.

Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *Médecine/Sciences* 12, 909-920.

Mehta P.P., Bertram J.S. et Loewenstein W.R., 1986.

Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 44, 187-196.

Mehta P.P., Yamamoto M. et Rose B., 1992.

Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Molecular Biology of the Cell* 3, 839-850.

Mikalsen S.-O., 1990.

Effects of heavy metal ions on intercellular communication in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 11, 1621-1626.

Mikalsen S.-O., 1993.

Heterologous gap junctional intercellular communication in normal and morphologically transformed colonies of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 14, 2085-2090.

Mikalsen S.-O., Holen I. et Sanner T., 1990a.

Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and nickel sulphate. *Cell Biol. Toxicol.* 6, 1-13.

Mikalsen S.-O., Kaalhus O., Reith A. et Sanner T., 1990b.

Role of catalase and oxidative stress in hepatic peroxisome proliferator-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer* 46, 950-957.

Mikalsen S.-O. et Kaalhus O., 1997.

A characterization of permolybdate and its effect on cellular tyrosine phosphorylation, gap junctional intercellular communication and phosphorylation status of the gap junction protein, connexin43. *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.

Mikalsen S.-O. et Sanner T., 1993.

Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis* 14, 251-257.

Miller E.C. et Miller J.A., 1966.

Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* 18, 805-838.

Miller J.A. et Miller E.C., 1969.

The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. Exp. Tumor Res.* 11, 273-301.

Miller R.T., Glover S.E., Stewart W.S., Corton J.C., Popp J.A. et Cattley R.C., 1996.

Effect of the expression of *c-met*, *c-myc* and PPAR- α in liver and liver tumors from rats chronically exposed to the hepatocarcinogenic peroxisome proliferator WY-14,643. *Carcinogenesis* 17, 1337-1341.

Mochizuki Y., Furukawa K. et Sawada N., 1982.

Effects of various concentrations of ethyl- α -p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) on diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Carcinogenesis* 3, 1027-1029.

Moreno A.P., Campos de Carvalho A.C., Christ G., Melman A. et Spray D.C., 1993.

Gap junctions between human corpus cavernosum smooth muscle cells: gating properties and unitary conductance. *Am. J. Physiol.* 264, C80-C92.

Motojima K., 1993.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): structure, mechanisms of activation and diverse functions. *Cell Structure and Function* 18, 267-277.

Motojima K., Peters J.M. et Gonzalez F.J., 1997.

PPAR α mediates peroxisome proliferator-induced transcriptional repression of nonperoxisomal gene expression in mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 155-158.

Muerhoff A.S., Griffin K.J. et Johnson E.F., 1992.

The peroxisome proliferator activated receptor mediates the induction of *CYP4A6*, a cytochrome P450 fatty acid ω -hydroxylase, by clofibric acid. *J. Biol. Chem.* 267, 19051-19053.

Musil L.S. et Goodenough D.A., 1991.

Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* 115, 1357-1374.

Musil L.S. et Goodenough D.A., 1993.

Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74, 1065-1077.

Nemali M.R., Usuda N., Reddy M.K., Oyasu K., Hashimoto T., Osumi T., Rao M.S. et Reddy J.K., 1988.

Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal β -oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. *Cancer Res.* 48, 5316-5324.

Nicolson G.L., 1987.

Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res.* 47, 1473-1487.

Nicolson G.L., Dulski K.M., and Trosko J.E., 1988.

Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 473-476.

Nishimura S., Yokoyama Y., Nakano H., Satoh K., Kano H., Sato K. et Tsuchida S., 1995.
Decreased expression of glutathione S-transferases and increased fatty change in peroxisomal enzyme-negative foci induced by clofibrate in rat livers. *Carcinogenesis* 16, 1699-1704.

Ochsner M., Creba J., Walker J., Bentley P. et Muakkassah-Kelly S.F., 1990.
Nafenopin, a hypolipidemic and non-genotoxic hepatocarcinogen increases intracellular calcium and transiently decreases intracellular pH in hepatocytes without generation of inositol phosphates. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2247-2257.

Oh S.Y., Grupen C.G. et Murray A.W., 1991.
Phorbol ester induces phosphorylation and down-regulation of connexin 43 in WB cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1094, 243-245.

Oliver M.F., Heady J.A., Morris J.N. et Cooper J., 1984.
WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: final mortality follow-up. *The Lancet* 600-604.

Osumi T., Wen J.-K. et Hashimoto T., 1991.
Two *cis*-acting regulatory sequences in the peroxisome proliferator-responsive enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 866-871.

Perera M.I.R., Katyal S.L. et Shinozuka H., 1986.
Suppression of choline-deficient diet-induced hepatocyte membrane lipid peroxidation in rats by the peroxisome proliferators 4-chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio(*N*- β -hydroxyethyl)acetamide and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Cancer Res.* 46, 3304-3308.

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

Price P.J., Hassett C.M. et Mansfield J.I., 1978.
Transforming activities of trichloroethylene and proposed industrial alternatives. *In Vitro* 14, 290-293.

Rahman S., Carlile G. et Evans W.H., 1993.
Assembly of hepatic gap junctions. *J. Biol. Chem.* 268, 1260-1265.

Rao M.S. et Reddy J.K., 1989.
The relevance of peroxisome proliferation and cell proliferation in peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Drug Metab. Rev.* 21, 103-110.

Reddy J.K., 1974.

Hepatic microbody proliferation and catalase synthesis induced by methyl clofenapate, a hypolipidemic analog of CPIB. *Am. J. Pathol.* 75, 103-118.

Reddy J.K., Azarnoff D.L. et Hignite C.E., 1980.

Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 283, 397-398.

Reddy J.K., Lalwani N.D., Reddy M.K. et Qureshi S.A., 1982.

Excessive accumulation of autofluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic peroxisome proliferators. *Cancer Res.* 42, 259-266.

Reddy J.K. et Lalwani N.D., 1983.

Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 12, 1-58.

Reznikoff C.A., Brankow D.W., and Heidelberger C., 1973.

Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* 33, 3231-3238.

Richter C., Park J.-W. et Ames B.N., 1988.

Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6465-6467.

Rivedal E. et Haddeland U., 1996.

Role of serum in the morphological transformation of Syrian hamster embryo cells: characterization and partial purification of protein factors in foetal bovine serum. *Toxicol. In Vitro* 10, 217-227.

Rivedal E., Sanner T., Enomoto T. et Yamasaki H., 1985.

Inhibition of intercellular communication and enhancement of morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by TPA. Use of TPA-sensitive and TPA-resistant cell lines. *Carcinogenesis* 6, 899-902.

Rivedal E. et Sanner T., 1983.

Expression of transformed morphology and anchorage independent growth of hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 4, 817-820.

Rivedal E. et Sanner T., 1992.

Regulation of gap junctional communication in Syrian hamster embryo cells by retinoic acid and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 13, 199-203.

Rivedal E., Yamasaki H. et Sanner T., 1994.

Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 15, 689-694.

Rodriguez J.C., Gil-Gomez G., Hegardt F.G. et Haro D., 1994.

Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J. Biol. Chem.* 269, 18767-18772.

Roseng L.E., Rivedal E. et Sanner T., 1993.

12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inhibition of gap junctional communication is differentially regulated in a transformation-sensitive Syrian hamster embryo cell line compared to early passage SHE cells. *Carcinogenesis* 14, 1851-1855.

Rubenstein C., Jone C., Trosko J.E. et Chang C.C., 1984.

Inhibition of intercellular communication in cultures of Chinese hamster V79 cells by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 731-739.

Ruch R.J., 1994.

The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 24, 216-231.

Ruch R.J., Klaunig J.E., Kerckaert G.A. et LeBoeuf R.A., 1990.

Modification of gap junctional intercellular communication by changes in extracellular pH in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 11, 909-913.

Sáez J.C., Berthoud V.M., Moreno A.P. et Spray D.C., 1993.

Gap junctions: multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Dans : Shenolikar S. et Nairn A.C. (eds.). Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, Vol. 27.* Raven Press, New York, 163-198.

Sanchez J.H., Abernethy D.J. et Boreiko C.J., 1987.

Lack of di-(2-ethylhexyl) phthalate activity in C3H/10T½ cell transformation system. *Toxic. in Vitro* 1, 49-53.

Sanner T. et Rivedal E., 1985.

Tests with the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. *Dans : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens, Vol. 5.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 665-671.

Sanner T. et Rivedal E., 1988.

Mechanisms of transformation and promotion of Syrian hamster embryo cells. *Dans : Langenbach R. et al. (eds.). Tumor Promoters: Biological Approaches for Mechanistic Studies and Assay Systems.* Raven Press, New York, 187-200.

Sausen P.J., Lee D.C., Rose M.L. et Cattley R.C., 1995.

Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to mitochondrial alterations. *Carcinogenesis* 16, 1795-1801.

Schmezer P., Pool B.L., Klein R.G., Komitowski D. et Schmähl D., 1988.

Various short-term assays and two long-term studies with the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in the Syrian golden hamster. *Carcinogenesis* 9, 37-43.

Schmidt A., Endo N., Rutledge S.J., Vogel R., Shinar D. et Rodan G.A., 1992.

Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6, 1634-1641.

Schoonjans K., Watanabe M., Suzuki H., Mahfoudi A., Krey G., Wahli W., Grimaldi P., Staels B., Yamamoto T. et Auwerx J., 1995.

Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 19269-19276.

Schoonjans K., Staels B. et Auwerx J., 1996.

Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37 907-925.

Schuman R.F., Pienta R.J., Poiley J.A. et Lebherz W.B., 1979.

Effect of fetal bovine serum on 3-methylcholanthrene-induced transformation of hamster cells in vitro. *In Vitro* 15, 730-735.

Shackleton G.L., Gibson G.G., Sharma R.K., Howes D., Orrenius S. et Kass G.E.N., 1995.

Diverse mechanisms of calcium mobilization by peroxisome proliferators in rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 294-303.

Shaw A.J. et Verma A., 1995.

Development of *in vitro* assays for tumour promoters. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 2, 50-56.

Sher T., Yi H.-F., McBride O.W. et Gonzalez F.J., 1993.

cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-5604.

Sher T., Yi H.-F., McBride O.W. et Gonzalez F.J., 1993.

cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-5604.

Smith-Oliver T. et Butterworth B.E., 1987.

Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat. Res.* 188, 21-28.

Stanley L.A., Blackburn D.R., Devereaux S., Foley J., Lord P.G., Maronpot R.R., Orton T.C. et Anderson M.W., 1994.

Ras mutations in methylclofenapate-induced B6C3F1 and C57BL/10J mouse liver tumours. *Carcinogenesis* 15, 1125-1131.

Stewart W.W., 1978.

Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14, 741-759.

Stott W.T., 1988.

Chemically induced proliferation of peroxisomes: implications for risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 8, 125-159.

Styles J.A., 1993.

Detection and quantification of ploidy, nuclearity, and DNA synthesis in rat hepatocytes after administration of a peroxisome proliferator. *Environ. Health Perspect.* 101, 225-228.

Styles J.A., Kelly M., Pritchard N.R. et Elcombe C.R., 1988.

A species comparison of acute hyperplasia induced by the peroxisome proliferator methylclofenapate: involvement of the binucleated hepatocyte. *Carcinogenesis* 9, 1647-1655.

Suk W.A. et Humphreys J.E., 1985.

Assay for the carcinogenicity of chemical agents using enhancement of anchorage-independent survival of retrovirus-infected Fischer rat embryo cells. *Dans* : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 673-683.

Swierenga S.H.H. et Yamasaki H., 1992.

Performance of tests for cell transformation and gap-junction intercellular communication for detecting nongenotoxic carcinogenic activity. *Dans* : Vainio H., Magee P.N., McGregor D.B. et McMichael A.J. (eds.). *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. IARC. Sci. Publ., Lyon, 165-193.

Takagi A., Sai K., Umemura T., Hasegawa R. et Kurokawa Y., 1990a.

Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 213-215.

Takagi A., Sai K., Umemura T., Hasegawa R. et Kurokawa Y., 1990b.

Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; di(2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate. *Cancer Lett.* 53, 33-38.

Tamura H., Iida T., Watanabe T. et Suga T., 1990a.

Long-term effects of hypolipidemic peroxisome proliferator administration on hepatic hydrogen peroxide metabolism in rats. *Carcinogenesis* 11, 445-450.

Tamura H., Iida T., Watanabe T. et Suga T., 1990b.

Long-term effects of peroxisome proliferators on the balance between hydrogen peroxide-generating and scavenging capacities in the liver of Fischer-344 rats. *Toxicology* 63, 199-213.

Tamura H., Iida T., Watanabe T. et Suga T., 1991.

Lack of induction of hepatic DNA damage on long-term administration of peroxisome proliferators in male F-344 rats. *Toxicology* 69, 55-62.

Thomassen D.G., Gilmer T.M., Oshimura M., Annab L.A. et Barrett J.C., 1985.

Multistage neoplastic transformation of normal and preneoplastic Syrian hamster embryo cells by viral oncogenes. Dans : Barrett J.C. et Tennant R.W. (eds.). *Carcinogenesis*, Vol. 9. Raven Press, New York, 41-49.

Thorp J.M., 1970.

Hypocholesterolemic and other effects of methyl clofenapate, a novel derivative of clofibrate. Dans : Jones C. (ed.). *Atherosclerosis: proceedings of the second international symposium*, 541-544.

Tomaszewski K.E., Agarwal D.K. et Melnick R.L., 1986.

In vitro steady-state levels of hydrogen peroxide after exposure of male F344 rats and female B6C3F₁ mice to hepatic peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 7, 1871-1876.

Tomita I., Nakamura Y., Aoki N. et Inui N., 1982.

Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP. *Environ. Health Perspect.* 45, 119-125.

Toraason M., Bohrman J.S., Krieg E., Combes R.D., Willington S.E., Zajac W. et Langenbach R., 1992.

Evaluation of the V79 cell metabolic co-operation assay as a screen *in vitro* for developmental toxicants. *Toxicol. in Vitro* 6, 165-174.

Trosko J.E., Yotti L.P., Warren S.T., Tsushimoto G. et Chang C.-C., 1982.

Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. *Dans* : Hecker E., Fusenig N.E., Kunz W., Marks F. et Thielman H.W. (eds.). *Carcinogenesis*, Vol. 7. Raven Press, New York, 565-585.

Trosko J.E., Chang C.C., Madhukar B.V. et Klaunig J.E., 1990.

Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology* 58, 265-278.

Trosko J.E. et Goodman J.I., 1994.

Intercellular communication may facilitate apoptosis: implications for tumor promotion. *Mol. Carcinog.* 11, 8-12.

Tsutsui T., Maizumi H. et Barrett J.C., 1984.

Amitrole-induced cell transformation and gene mutations in Syrian hamster embryo cells in culture. *Mutat. Res.* 140, 205-207.

Tsutsui T., Watanabe E. et Barrett J.C., 1993.

Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 14, 611-618.

Tu A., Hallowell W., Pallotta S., Sivak A., Lubet R.A., Curren R.D., Avery M.D., Jones C., Sedita B.A., Huberman E., Tennant R., Spalding J. et Kouri R.E., 1986.

An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environmental Mutagenesis* 8, 77-98.

Tucker M.J. et Orton T.C., 1993.

Toxicological studies in primates with three fibrates. *Dans* : Gibson G. et Lake B. (eds.). *Peroxisomes: biology and importance in toxicology and medicine*. Taylor and Francis, Londres, 425-447.

Tucker M.J. et Orton T.C. (eds.) 1995.

Comparative toxicology of hypolipideamic fibrates. Londres, Taylor and Francis.

Tugwood J.D., Issemann I., Anderson R.G., Bundell K.R., McPheat W.L. et Green S., 1992.

The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11, 433-439.

Umeda M., Noda K. et Tanaka K., 1985.

Assays for inhibition of metabolic cooperation by a microassay method. *Dans* : Ashby J., de Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B.H., Matter B.E. et Shelby M.D. (eds.). *Progress in Mutation Research: evaluation of short-term tests for carcinogens*, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 619-622.

Vaheri A. et Mosher D.F., 1978.

High molecular weight, cell surface-associated glyco-protein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 1-25.

Vang O., Wallin H., Doehmer J. et Autrup H., 1993.

Cytochrome P450-mediated metabolism of tumour promoters modifies the inhibition of intercellular communication: a modified assay for tumour promotion. *Carcinogenesis* 14, 2365-2371.

Watanabe E. et Suga T., 1988.

Suppression of clofibrate-induced peroxisome proliferation in rat liver by nicardipine, a calcium antagonist. *FEBS Lett.* 232, 293-297.

Watanabe T., Itoga H., Okawa S., Tamura H. et Suga T., 1991.

Co-suppression by nicardipine, a calcium antagonist, of induction of microsomal lauric acid hydroxylation with peroxisome proliferation in clofibrate-treated rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1320-1322.

Watson J.D. et Crick F.H.C., 1953.

Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Weghorst C.M., Devor D.E., Henneman J.R. et Ward J.M., 1993.

Promotion of hepatocellular foci and adenomas by di(2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital in C3H/HeNCr mice following exposure to N-nitrosodiethylamine at 15 days of age. *Exp. Toxic. Pathol.* 45, 423-431.

Weinberg R.A., 1989.

Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 3713-3721.

Weinstein I.B., 1988.

The origin of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implication for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.* 48, 4135-4143.

Wiseman R.W., Montgomery J.C., Hosoi J., Hou E.W., Cochran C.J., Lamb P.W. et Barrett J.C., 1991.

Identification of genes associated with tumor suppression in Syrian hamster embryo cells. *Environ. Health Perspect.* 93, 105-109.

Wolf M., Levine H., May W.S., Jr, Cuatrecasas P. et Sahyoun N., 1985.

A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. *Nature* 317, 546-549

Yamasaki H., Enomoto T. et Martel N., 1984.

Intercellular communication, cell differentiation and tumour promotion. *IARC Sci. Publ.* 217-238.

Yamasaki H., Hollstein M., Mesnil M., Martel N. et 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 Res.* 47, 5658-5664.

Yamasaki H., 1990.

Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 1051-1058.

Yamasaki H., 1996.

Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens. *Mutat. Res.* 365, 91-105.

Yamasaki H., Ashby J., Bignami M., Jongen W., Linnainmaa K., Newbold R.F., Nguyen-Ba G., Parodi S., Rivedal E., Schiffmann D., Simons J.W.I.M. et Vasseur P., 1996.

Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.* 353, 47-63.

Yamasaki H. et Naus C.C.G., 1996.

Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 17, 1199-1213.

Yamamoto T., Ohashi Y., Miyakoshi N., Matsunuma N., Manabe S. et Makita T., 1996.

Strain difference in the susceptibility to clofibrate in male rats. *Pathophysiology* 3, 65-72.

Yancey S.B., Edens J.E., Trosko J.E., Chang C.-C. et Revel, J.-P., 1982.

Decreased incidence of gap junctions between Chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Exp. Cell Res.* 139, 329-340.

Yotti L.P., Chang C.C. et Trosko J.E., 1979.

Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206, 1089-1091.

Zhang B., Marcus S.L., Sajjadi F.G., Alvares K., Reddy J.K., Subramani S., Rachubinski R.A. et Capone J.P., 1992.

Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7541-7545.

ANNEXES

ANNEXE I

Publication 1 : "Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells."

Publication 2 : "Influence of the experimental procedure on the transforming effects of four peroxisome proliferators on Syrian hamster embryo (SHE) cells."

Publication 3 : "Effects of peroxisome proliferators and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin 43 in two hamster fibroblast systems."

Publication 4 : "In vitro assays for detection of non genotoxic carcinogens."

Publication 5 : "SHE cell transformation assay as a predictive system for carcinogenicity of PAH and non-genotoxic carcinogens."

Publication 6 : "Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities."

Publication 1 : “Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells.”

Cruciani *et al.*, Carcinogenesis 18, 701-706, 1997.

Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells

Véronique Cruciani, Claudine Rast, Marie-José Durand, Giao Nguyen-Ba¹ and Paule Vasseur²

Centre des Sciences de l'Environnement, BP 4025, F-57040 Metz Cedex and ¹Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS-URA 1218, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-92290 Châtenay-Malabry, France

²To whom correspondence should be addressed

The Syrian hamster embryo (SHE) cell system was used to evaluate the ability of two hepatocarcinogenic structurally related peroxisome proliferators (PPs) to induce morphological transformation (MT) of SHE colonies and to inhibit gap junctional intercellular communication (GJIC). Clofibrate and methyl clofenapate (MCP), which was shown to be a more active PP and a more potent carcinogen *in vivo* than clofibrate, were compared. MCP appeared slightly more active *in vitro* than clofibrate in affecting MT and GJIC of SHE cells. The morphological transformation of SHE colonies was induced by 50 µM MCP, against 100 µM clofibrate. Moreover, 50 µM MCP potentiated the transforming effects of both benzo[a]pyrene and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. The inhibition of GJIC, measured by transfer of lucifer yellow, was transient and occurred at concentrations inducing morphological transformation. MCP inhibited dye transfer at 50 µM and the inhibition lasted up to 24 h at 100 µM. Inhibition of communication lasted only 4 h with clofibrate and occurred at a higher concentration (175 µM). This study showed that both the SHE cell transformation and dye transfer assays were able to display the different activities of the two PPs, even though the difference in potency observed was smaller than *in vivo*. It also revealed interactions between non-genotoxic carcinogens and the ability of the SHE cell transformation assay to detect these combined effects.

Introduction

Peroxisome proliferators (PPs*) are chemicals which induce hepatomegaly and peroxisome proliferation in rodents (1,2). These chemicals include structurally diverse compounds such as phthalate ester plasticizers and hypolipidemic drugs (2). The oral administration of PPs in long-term experiments resulted in hepatocellular carcinomas in rats and mice (2-5). Hepatic PPs were considered as a class of non-genotoxic carcinogens (3), since a direct interaction with DNA could not be shown. In addition, no positive results could be registered when PPs were tested *in vitro* for their genotoxicity (4,6).

*Abbreviations: PPs, peroxisome proliferators; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SHE, Syrian hamster embryo; MCP, methyl clofenapate; MT, morphological transformation; GJIC, gap junctional intercellular communication; BaP, benzo[a]pyrene; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; LY, lucifer yellow; DMSO, dimethylsulfoxide; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; CE, cloning efficiency; PKC, protein kinase C.

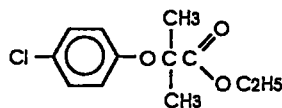
A wide range of PPs have been studied in order to establish the potential relationship between peroxisomal proliferation and hepatocarcinogenicity. An early hypothesis was that elevation of peroxisome-generated H₂O₂ could damage critical cellular molecules, including DNA (2,7). Other authors suggested that the hepatocarcinogenic action of PPs could be due to their mitogenic activity and their ability to promote spontaneously formed preneoplastic lesions (8). PPs were more recently shown to act through the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), whose role still remains to be elucidated (9). A haPPAR γ has recently been isolated in the hamster (10).

Besides their mechanism of toxicity, the problem for such non-mutagenic compounds is the search for *in vitro* models to investigate some of the properties involved in their carcinogenicity *in vivo*. In the present study, we evaluated the predictive capacity of an *in vitro* system using Syrian hamster embryo (SHE) cells to detect the carcinogenic potential of clofibrate and methyl clofenapate (MCP), two PPs hepatocarcinogenic in the rat (7,11). Two end points were investigated, morphological transformation (MT) of colonies and inhibition of intercellular communication.

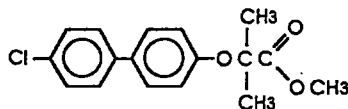
The SHE cell MT assay, which uses early passage normal diploid cells, is assumed to closely mimic some of the first steps of the carcinogenic process occurring *in vivo* (12-18). The SHE model has been shown to detect genotoxic as well as non-genotoxic carcinogens (12,16,19-21). The SHE cell transformation assay is one of the few primary cell transformation systems in use (22).

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is important for the maintenance of tissue homeostasis and differentiation, and both positive and negative growth regulatory signals have been shown to pass through gap junction channels (23). Many tumor promoters or non-genotoxic carcinogens inhibit GJIC (24). The relationship between MT and inhibition of GJIC was clearly demonstrated in the BALB/c3T3 system (25,26), however, the results obtained on SHE cells are more conflicting (27-29).

Clofibrate and MCP are two structurally related PPs which were initially developed for the treatment of hyperlipidemia. It has been shown *in vivo* that MCP is more effective than clofibrate in inducing hypolipidemia, peroxisome proliferation (30) and hepatocarcinogenesis (7). Indeed, Reddy *et al.* (7) showed that 1000 p.p.m. MCP daily administered to F344 rats induced 100% liver tumors after 75 weeks, while 5000 p.p.m. clofibrate were needed in rats to obtain the same response, 90% tumor incidence (31). Clofibrate has been shown to induce SHE cell transformation (32,33). In contrast, MCP has not been tested *in vitro*. We compared the transforming potencies of clofibrate and MCP to evaluate if the SHE cell transformation assay was able to detect *in vitro* the higher potency of MCP in inducing carcinogenesis *in vivo*. The effects of clofibrate and MCP on GJIC of SHE cells were also evaluated in order to study the relationship between MT and



Clofibrate: 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid ethyl ester



MCP: 2-(4-chloro[1,1'-biphenyl-(4-yl)oxy]-2-methyl)propanoic acid methyl ester

Fig. 1. Molecular structures of clofibrate and MCP.

intercellular communication for these substances. Clofibrate and MCP have previously been poorly investigated for GJIC; the only models used were V79 cell lines for MCP tested at very low concentrations (34) and initiated keratinocytes for clofibrate (35).

Materials and methods

Chemicals

Clofibrate (Figure 1), benzo[*a*]pyrene (BaP), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and lucifer yellow (LY) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). MCP (Figure 1) was a gift from J.Ashby (Zeneca Central Toxicology Laboratory, UK). The chemicals were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium just before use. DMSO was used at a final concentration of 0.2% (v/v), which has been shown not to affect the cell response.

Cell culture

Primary cell cultures of Syrian hamster embryos at 13 days gestation were prepared and cryopreserved in liquid nitrogen as described by Pienta *et al.* (16) and modified by Elias *et al.* (36). All viscera, including the liver, were removed before trypsinization of the tissues. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 15% fetal calf serum (Hyclone), 2.2 g/l NaHCO₃ at 37°C in a 10% CO₂, humidified atmosphere.

Ampoules containing cryopreserved cells were used as stock cultures for the transformation and the dye transfer assays.

SHE cell transformation assay

The transforming effect of clofibrate and MCP (both 50–150 µM) were studied in three series of assays according to the procedure described previously (19,37,38). Briefly, a feeder layer of 4–6 × 10⁴ X-irradiated (5000 rad) cells were seeded in 2 ml complete medium (pH 7) on 60 mm Petri dishes (Corning). The next day, 150 target cells in 2 ml medium were seeded on the feeder layer. The cells were treated 24 h later. Three procedures were used to evaluate the transforming effects of clofibrate and MCP on SHE cells as described by Bessi *et al.* (39): (i) treatment with the tested chemical applied alone for 7 days (the medium could be renewed on days 3 and 5); (ii) sequential treatment with the tested chemical on day 1 for 24 h, followed by a 6 day exposure to 0.16 µM TPA (medium renewed on days 2 and 5); (iii) sequential treatment with 0.4 µM BaP on day 1 for 24 h, followed by a 6 day exposure to the tested chemical (medium renewed on days 2 and 5). Ten dishes were used per treatment group. On day 8, plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS), cells were fixed with absolute ethanol and stained with 10% aqueous Giemsa. Colonies were scored under a stereomicroscope for cloning efficiency (CE) and MT. MT colonies were defined as colonies exhibiting an extensive criss-crossing and multi-layered growth pattern of the cells. Each dish was coded and scored blind.

Statistical analyses were by the χ^2 test.

Dye transfer assay

Cells were seeded in 30 mm Petri dishes (Corning) at a density of 0.75–1 × 10⁵ cells/dish. Two or three days later, the cells forming a confluent monolayer were exposed to the test chemical. After 5 min to 24 h exposure, the level of intercellular communication was measured as described previously

(27) by the microinjection of LY (10% in 0.33 M lithium chloride) into single cells using a Narishige (Tokyo) micromanipulator connected to an inverted phase contrast microscope (IMT-2; Olympus). The capillaries (prepared with a vertical puller) entered a cell close to the nucleus and the dye was injected. Five minutes after injection, the cells were fixed with 2% formaldehyde in PBS.

Spreading of LY was observed under fluorescence and the number of dye-coupled cells was counted; 33 to 105 injections were carried out per treatment group.

Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Results

SHE cell morphological transformation

Clofibrate and MCP were tested in three independent experiments at concentrations ranging from 50 to 150 µM. At higher concentrations a cytotoxic effect was observed.

Clofibrate applied alone at 100 and 150 µM increased the MT of SHE colonies. A significant increase in the transformation frequency, reaching 0.7%, could be observed at 150 µM clofibrate in the medium applied for 6 days without renewal. After two applications of clofibrate, a transforming frequency of 0.7% was obtained at 100 µM; at 150 µM the increase in MT colonies was not statistically significant (Table I). After three applications of clofibrate, the transformation frequency was 0.6% at 100 µM; it was not statistically significant at 150 µM, in spite of an increased number of transformed colonies at this concentration. The number of MT colonies induced by BaP or TPA was not enhanced by the co-treatment with clofibrate, whatever the concentration, under the experimental conditions used.

A single application of MCP increased the transformation frequency up to 0.8% at 100 µM. After a second and third application, the percentage of transformed colonies was 0.5 and 0.7% respectively at the same concentration (Table II). When the medium was renewed on days 3 and 5, a significant increase in MT colonies was registered at 50 µM MCP and followed a dose-effect relationship. MCP potentiated the transforming effects of both BaP and TPA. MT of SHE colonies was significantly induced when BaP-initiated cells were exposed to 50, 100 and 150 µM MCP; the transformation frequency increased to 3, 2.4 and 3.4% respectively. The transforming effects of the phorbol ester were also significantly potentiated when cells were sequentially exposed to 50, 100 and 150 µM MCP (24 h) and TPA (6 days).

In conclusion, MCP appeared to be a more active transforming agent than clofibrate and was able to interact with both genotoxic (BaP) and non-genotoxic (TPA) chemicals.

Intercellular communication

Clofibrate was tested from 150 up to 250 µM and applied for 5 min to 24 h periods (Figure 2). Concentrations of chemicals used in the intercellular communication assay were higher than in the transformation assay, because the incubation times were shorter and the chemicals were added to a confluent monolayer of cells instead of cells at clonal density.

Exposure of SHE cells to 150 µM clofibrate did not induce any significant decrease in communication. With 175 µM clofibrate during a 5 min period we observed a strong decrease in the number of communicating cells. However, after 15 min treatment, GJIC was almost fully normalized. At 200 µM, the inhibition lasted longer, but intercellular communication again reached the control level after 120 min. Using 250 µM clofibrate, recovery was only partial after 120 min (results not shown). Whatever the dose used, the communication level was normalized after 4 h treatment.

Table I. Effect of clofibrate on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells at pH 7

Treatment (μ M)	Medium renewal	Cloning efficiency (%)	Transformed colonies	
			Ratio ^a	%
(a) Clofibrate				
0	None	32	2/1432	0.1
50	None	32	4/1431	0.3
100	None	34	3/1517	0.2
150	None	31	10/1371	0.7 ^b
0	Day 5	38	1/1687	0.1
50	Day 5	36	2/1599	0.1
100	Day 5	34	10/1528	0.7 ^b
150	Day 5	35	4/1552	0.3
0	Days 3 and 5	41	3/1842	0.2
50	Days 3 and 5	37	2/1652	0.1
100	Days 3 and 5	40	10/1788	0.6 ^b
150	Days 3 and 5	40	7/1814	0.4
(b) BaP + clofibrate				
0.4 + 0	Days 2 and 5	29	11/1294	0.9
0.4 + 50	Days 2 and 5	24	7/1096	0.6
0.4 + 100	Days 2 and 5	22	5/989	0.5
0.4 + 150	Days 2 and 5	21	3/947	0.3
(c) Clofibrate + TPA				
0 + 0.16	Days 2 and 5	30	22/1347	1.6
50 + 0.16	Days 2 and 5	26	10/1181	0.8
100 + 0.16	Days 2 and 5	24	21/1082	1.9
150 + 0.16	Days 2 and 5	27	10/1212	1.1
BaP				
4	None	14	8/642	1.2 ^b
BaP + TPA				
0.4 + 0.16	Days 2 and 5	17	26/755	3.4 ^b

(a) Treatment with one, two or three applications of clofibrate alone; (b) sequential treatment with BaP (0.4 μ M) for 24 h followed by two applications of clofibrate on days 2 and 5; (c) sequential treatment with clofibrate for 24 h followed by two applications of TPA (0.16 μ M) on days 2 and 5.

^aNumber of transformed colonies/total number of colonies.

^bValues significantly different from their respective control ($P < 0.05$).

MCP was applied at 25–200 μ M for periods ranging from 15 min to 24 h (Figure 3). MCP showed an inhibiting effect on dye transfer during the first 30 min of exposure from 50 μ M MCP; inhibition of intercellular communication partly persisted after 60 min treatment. GJIC remained significantly lower than the control after 24 h treatment at 100 and 200 μ M. No inhibition of GJIC was observed at the lowest concentration tested (25 μ M; results not shown). MCP inhibited GJIC at lower concentrations and for longer periods than clofibrate and could thus be considered as more effective.

We also tested longer treatment times (48 and 72 h) using growing cells instead of a confluent monolayer with doses ranging from 50 to 200 μ M MCP and 175 to 250 μ M clofibrate without obtaining any significant inhibition of communication (results not shown).

Discussion

Clofibrate induced MT of SHE cells in this study when applied alone for 7 days at 100 μ M. This is consistent with results obtained by Mikalsen *et al.* (32) and Sanner *et al.* (33), who observed positive responses with clofibrate using a procedure equivalent to our two applications of clofibrate alone. The authors obtained a transformation frequency of 1% (0.25% in the control) with 50 μ M clofibrate (corresponding to the therapeutic plasma concentration). In our study, negative results were obtained at pH 7 when clofibrate followed BaP exposure. These results are not in agreement with those of Mochizuki *et al.* (40), who showed a promoter-like activity of clofibrate; the chemical markedly enhanced the incidence of hepatic

tumors induced in F344 rats by diethylnitrosamine (40 p.p.m. in the drinking water for 5 weeks) when the rats were fed a diet containing 0.1 or 0.25% of clofibrate for 19 weeks. In previous experiments carried out in DMEM at pH 7.35, a significant increase in the MT frequency could be obtained when clofibrate was applied to SHE cells at 25–200 μ M either alone or sequentially before TPA (41). The difference in the pH of the media used (7.35 or 7) may have influenced the bioavailability of clofibrate and consequently its quantitative effects.

MCP, which induced MT at 50 μ M, displayed a slightly higher transforming potency than clofibrate. In contrast to clofibrate, MCP was able to potentiate the transforming effects of both BaP and TPA in our system. The positive effects observed in the sequential treatment MCP-TPA could suggest an initiator-like activity of MCP. It is unlikely that MCP is an initiator, as concluded by Lefevre *et al.* (42), who could not demonstrate its genotoxicity using Muta mouse and Big Blue transgenic mice. Rather, an interaction between MCP and TPA leading to effects increasing MT can be evoked. Indeed, Bessi *et al.* (39) demonstrated that the SHE cell transformation assay could reveal interactions between non-genotoxic carcinogens such as chlordane and TPA. The authors explained the synergistic effects on MT by activation of protein kinase C (PKC) following sequential exposure to chlordane and TPA. Chlordane was shown to induce PKC in a calcium-dependent manner (43). The same mechanism could be hypothesized with MCP, since Shackleton *et al.* (44) have shown that structurally diverse PPs increased the cytosolic free calcium concentration through the redistribution of different internal calcium pools.

Table II. Effect of MCP on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells at pH 7

Treatment (μM)	Medium renewal	Cloning efficiency (%)	Transformed colonies	
			Ratio ^a	%
(a) MCP				
0	None	32	4/1447	0.3
50	None	28	7/1239	0.6
100	None	23	8/1013	0.8
150	None	24	4/1090	0.4
0	Day 5	38	2/1698	0.1
50	Day 5	26	4/1157	0.3
100	Day 5	26	6/1180	0.5
150	Day 5	28	7/1251	0.6
0	Days 3 and 5	41	3/1832	0.2
50	Days 3 and 5	27	7/1226	0.6
100	Days 3 and 5	30	9/1332	0.7 ^b
150	Days 3 and 5	25	9/1141	0.8 ^b
(b) BaP + MCP				
0.4 + 0	Days 2 and 5	29	13/1297	1.0
0.4 + 50	Days 2 and 5	20	26/877	3.0 ^b
0.4 + 100	Days 2 and 5	21	23/964	2.4 ^b
0.4 + 150	Days 2 and 5	21	32/932	3.4 ^b
(c) MCP + TPA				
0 + 0.16	Days 2 and 5	30	23/1336	1.7
50 + 0.16	Days 2 and 5	23	33/1038	3.2 ^b
100 + 0.16	Days 2 and 5	18	41/804	5.1 ^b
150 + 0.16	Days 2 and 5	19	39/855	4.6 ^b
BaP				
4	None	14	8/629	1.3 ^b
BaP + TPA				
0.4 + 0.16	Days 2 and 5	17	26/751	3.5 ^b

(a) Treatment with one, two or three applications of MCP alone; (b) sequential treatment with BaP (0.4 μM) for 24 h followed by two applications of MCP on days 2 and 5; (c) sequential treatment with MCP for 24 h followed by two applications of TPA (0.16 μM) on days 2 and 5.

^aNumber of transformed colonies/total number of colonies.

^bValues significantly different from their respective control ($P < 0.05$).

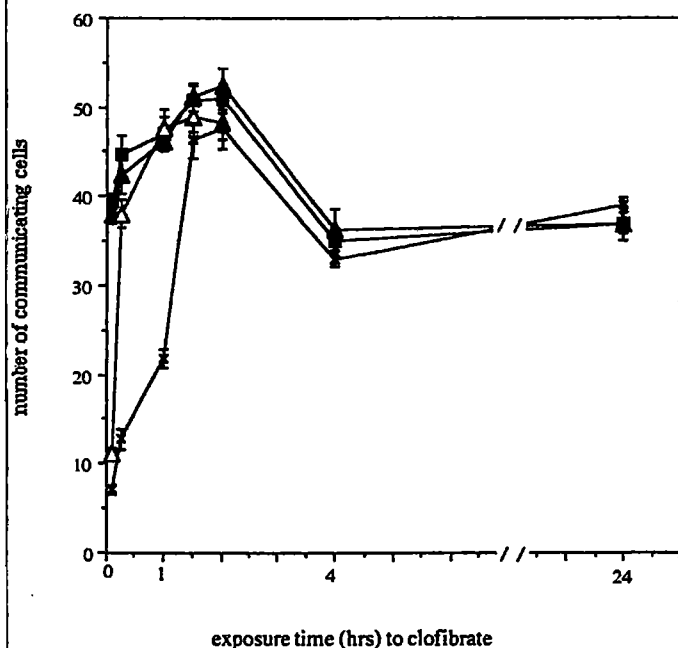


Fig. 2. Effect of (▲) 150, (△) 175 and (×) 200 μM clofibrate on intercellular communication in primary SHE cells; ■, DMSO-treated control. The data are shown as mean $\pm$ SEM, $n = 37$ –95. Statistical significances compared with unexposed cells ($P < 0.01$): 5 min at 175 μM ; 5 min, 15 min and 1 h at 200 μM .

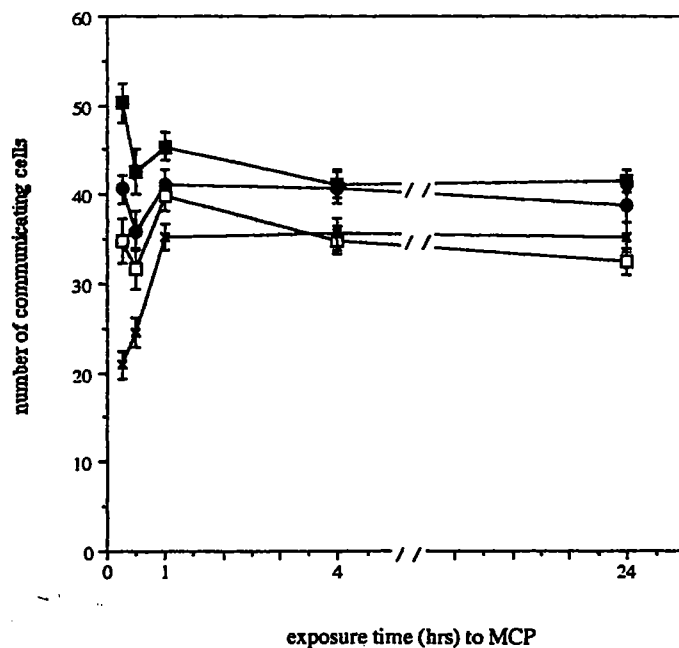


Fig. 3. Effect of (●) 50, (□) 100 and (×) 200 μM MCP on intercellular communication in primary SHE cells; ■, DMSO-treated control. The data are shown as mean $\pm$ SEM, $n = 33$ –105. Statistical significances compared to unexposed cells ($P < 0.01$): 15 min at 50 μM ; all exposure times at 100 and 200 μM .

It is difficult to explain the synergistic effects of MCP and BaP by a mitogenic activity of MCP, though its mitogenicity has been demonstrated *in vivo* in rat liver (45–47). Indeed, no increase in the CE of SHE cells could be observed in our experiments in the presence of MCP.

The higher transforming potency of MCP compared with clofibrate was paralleled by a longer inhibiting activity on GJIC. Moreover, the threshold concentration decreasing intercellular communication was 50 μ M MCP as against 175 μ M clofibrate. These concentrations corresponded to those inducing MT of SHE colonies (50 and 150 μ M respectively). As calcium is known to induce the closure of gap junctions, the hypothesis of an increase in calcium concentration could explain both the inhibiting effect of MCP on GJIC and its synergistic effect with TPA on MT. The 'calcium hypothesis' for the MCP–TPA interaction and the PP-induced decrease in GJIC deserves to be further investigated.

It might have seemed better to study GJIC on the colonies formed at the end of the cell transformation assay in order to establish more closely the relationship between MT and GJIC. In addition to the difficulty of the measurement itself, such a study appeared useless to us when considering the rapid recovery of GJIC within 48 h after a clofibrate or MCP application. Though the inhibition is short, it may nevertheless have some consequences on cell homeostasis and on cell transformation, especially in dividing cells within SHE colonies.

Besides the 'calcium hypothesis', other mechanisms could be proposed to explain the inhibition of GJIC in SHE cells by the two PPs: (i) an effect on the structure and function of connexins; (ii) a disturbance of the fluidity of the membranes by the lipophilic compound; (iii) an increase in the phosphorylation of connexins. The last two hypotheses seem unlikely to us. First, because internalization of the two PPs into the membrane is not sufficient by itself to inhibit GJIC, since other lipophilic compounds did not systematically inhibit GJIC. Second, because the pattern of inhibition of GJIC induced by TPA, which is known to strongly decrease GJIC by phosphorylating connexins, is very different from the pattern obtained with clofibrate and MCP. TPA displayed its inhibitory effect on SHE cells after a latency of 30 min, the time required for phosphorylation of connexin 43 (48).

The effects of clofibrate on intercellular communication have only been studied by Jansen and Jongen (35). These authors used primary mouse keratinocytes initiated by dimethylbenzanthrene (3PC) and treated with clofibrate at doses ranging from 210 μ M to 1 mM. Inhibition of GJIC, already fully achieved after 7.5 min, could be observed from 210 μ M. The authors explained this inhibition by the production of reactive oxygen species in the peroxisomes oxidizing membrane lipids, thereby influencing membrane fluidity and subsequent gap junction plaque stability. In our opinion, this hypothesis cannot explain the effects of clofibrate in SHE cells because this would imply that peroxisome proliferation, which increases β -oxidation and leads to overproduction of H_2O_2 , occurs immediately after the application of clofibrate and in <5 min. Peroxisomal proliferation would require more time. Moreover, clofibrate could not be shown to induce peroxisomal proliferation when applied to SHE cells for 1–6 days at 206 μ M (49). Peroxisomal proliferation was observed in SHE cells exposed to 300 μ M clofibrate only after addition of rat liver microsomal fractions (50).

We evaluated the effects of clofibrate and MCP on metabolic

cooperation in the V79 cell line according to the classical procedure described by Yotti *et al.* (51). Inhibition of communication was obtained at very high clofibrate concentrations (400 μ M; results not shown) and again at lower concentrations of MCP (50 μ M). Trosko *et al.* (34) obtained negative results when testing MCP on V79 cells at a very low dose (1.6 μ M).

The effect of MCP and clofibrate on V79 cells after 72 h exposure may be explained by an action on the synthesis of connexins, whereas in SHE cells the immediate and transient effect observed is more likely due to reversible conformational changes of the gap junctions. A transient binding of the two compounds on or in the proximity of the connexons is possible.

MCP is a closely related hypolipidemic analog of clofibrate and on an equivalent weight basis, this compound appeared to be more effective than clofibrate in inducing hypolipidemia, peroxisome proliferation (30) and hepatocarcinogenesis (7,31).

In the present study, we have shown that MCP was also more efficient than clofibrate in inducing MT and inhibiting of GJIC in SHE cells, even though the difference in potency is not as high as *in vivo*.

Further information gained from this study concerned the amplified response in the co-treatments associating MCP with BaP or to TPA, with consequences on cell homeostasis and cell transformation. These interactions involving non-genotoxic carcinogens suggest that these kinds of carcinogens, which escape *in vitro* screening for genotoxicity, can no longer be neglected. This study also confirms that the SHE cells system is a useful model for *in vitro* detection of carcinogenicity.

Acknowledgements

This work was financed by the EEC (grant CT91–0146) and the French Ministry of the Environment. T.Carmona is acknowledged for helpful discussions in preparing this paper.

References

- Hess,R., Staubli,W. and Riess,W. (1965) Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature*, **208**, 856–858.
- Reddy,J.K. and Lalwani,N.D. (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **12**, 1–58.
- Reddy,J.K., Azarnoff,D.L. and Hignite,C.E. (1980) Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature*, **283**, 397–398.
- Rao,M.S. and Reddy,J.K. (1987) Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **8**, 631–636.
- Stott,W.T. (1988) Chemically induced proliferation of peroxisomes: implications for risk assessment. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.*, **8**, 125–159.
- Reddy,J.K. (1990) Carcinogenicity of peroxisome proliferators: evaluation and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 92–94.
- Reddy,J.K., Lalwani,N.D., Reddy,M.K. and Qureshi,S.A. (1982) Excessive accumulation of autofluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic peroxisome proliferators. *Cancer Res.*, **42**, 259–266.
- Cattley,R.C., Marsman,D.S. and Popp,J.A. (1991) Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator Wy-14,643 in rat liver. *Carcinogenesis*, **12**, 469–473.
- Isseman,I. and Green,S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645–650.
- Aperlo,C., Pognonec,P., Saladin,R., Auwerx,J. and Boulukos,K.E. (1995) cDNA cloning and characterization of the transcriptional activities of the hamster peroxisome proliferator-activated receptor haPPAR γ . *Gene*, **162**, 297–302.
- Svoboda,D.J. and Azarnoff,D.L. (1979) Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug. *Cancer Res.*, **39**, 3419–3428.

12. Berwald, Y. and Sachs, L. (1963) *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, 200, 1182–1184.
13. Di Paolo, J.A., Donovan, P.J. and Nelson, R.L. (1969) Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens. *J. Natl Cancer Inst.*, 42, 867–876.
14. 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.
15. Lasne, C., Gentil, A. and Chouroulinkov, I. (1974) Two stage malignant transformation of Syrian hamster cells. *Nature*, 247, 490–491.
16. Pienta, R.J., Pooley, J.A. and Leberer, 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.
17. Barrett, J.C. (1980) A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res.*, 40, 91–94.
18. 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, 53S–70S.
19. Tu, A. et al. (1986) An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagen.*, 8, 77–98.
20. LeBoeuf, R.A. and Kerckaert, G.A. (1986) The induction of transformed-like morphology and enhanced growth in Syrian hamster embryo cells grown at acidic pH. *Carcinogenesis*, 7, 1431–1440.
21. LeBoeuf, R.A., Kerckaert, G.A., Aardema, M.J. and Gibson, D.P. (1990) Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Res.*, 50, 3722–3729.
22. Isfort, R.J., Kerckaert, G.A., Cody, D.B., Carter, J., Driscoll, K.E. and LeBoeuf, R.A. (1996) Isolation and biological characterization of morphological transformation-sensitive Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 17, 997–1005.
23. Klaunig, J.E. and Ruch, R.J. (1990) Biology of disease: role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 62, 135–146.
24. Trosko, J.E., Jones, C. and Chang, C.C. (1983) The role of tumor promoters on phenotypic alterations affecting intercellular communication and tumorigenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 407, 316–327.
25. Yamasaki, H. and Fitzgerald, D.J. (1988) The role of selective junctional communication in cell transformation. In Langenbach, R., Elmore, E. and Barrett, J.C. (eds) *Tumor Promoters: Biological Approaches for Mechanistic Studies and Assay Systems*. Raven Press, New York, NY, pp. 131–147.
26. Yamasaki, H. (1990) Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 1051–1058.
27. Rivedal, E., Sanner, T., Enomoto, T. and Yamasaki, H. (1985) Inhibition of intercellular communication and enhancement of morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by TPA. Use of TPA-sensitive and TPA-resistant cell lines. *Carcinogenesis*, 6, 899–902.
28. Ruch, R.J., Klaunig, J.E., Kerckaert, G.A. and LeBoeuf, R.A. (1990) Modification of gap junctional intercellular communication by changes in extracellular pH in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 11, 909–913.
29. Mikalsen, S.-O. and Sanner, T. (1993) Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis*, 14, 251–257.
30. Reddy, J.K. (1974) Hepatic microbody proliferation and catalase synthesis induced by methyl clofenapate, a hypolipidemic analog of CPIB. *Am. J. Pathol.*, 75, 103–118.
31. Reddy, J.K. and Qureshi, S.A. (1979) Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl- α -p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats. *Br. J. Cancer*, 40, 476–482.
32. Mikalsen, S.-O., Holen, I. and Sanner, T. (1990) Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with peroxisome proliferators, TPA and nickel sulphate. *Cell Biol. Toxicol.*, 6, 1–13.
33. Sanner, T., Mikalsen, S.-O. and Rivedal, E. (1991) Hepatic peroxisome proliferators induce morphologic transformation of Syrian hamster embryo cells, but not peroxisomal β oxidation. In Butterworth, B.E., Slaga, T.J., Farland, W. and McClain, M. (eds), *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 369: *Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment*. Wiley-Liss, New York, pp. 77–89.
34. Trosko, J.E., Yotti, L.P., Warren, S.T., Tsushimoto, G. and Chang, C.C. (1982) Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. In Hecker, E., Fusenig, N.E., Kuntz, W., Marks, F. and Thielman, H.W. (eds) *Carcinogenesis—A Comprehensive Survey*, Vol. 7: *Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promoters*. Raven Press, New York, NY, pp. 565–585.
35. Jansen, L.A.M. and Jongen, W.M.F. (1996) The use of initiated cells as a test system for the detection of inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, 17, 333–339.
36. Elias, Z. et al. (1989) Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 10, 2043–2052.
37. Lasne, C., Lu, Y.P., Orfila, L., Ventura, L. and Chouroulinkov, I. (1990) Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 11, 541–547.
38. Bessi, H., Rast, C., Nguyen-Ba, G. and Vasseur, P. (1994) Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit gap junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *Cancer J.*, 7, 248–253.
39. Bessi, H., Rast, C., Rether, B., Nguyen-Ba, G. and Vasseur, P. (1995) Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis*, 16, 237–244.
40. Mochizuki, Y., Furukawa, K. and Sawada, N. (1982) Effects of various concentrations of ethyl- α -p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) on diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 3, 1027–1029.
41. Dhalluin, S., Cruciani, V., Rast, C., Vasseur, P., Tapiero, H. and Nguyen-Ba, G. (1996) Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities. *Cell. Pharmacol.*, 3, 23–28.
42. Lefevre, P.A. et al. (1994) Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using Muta Mouse and Big Blue transgenic mice. *Hum. Exp. Toxicol.*, 13, 764–775.
43. Moser, G.J. and Smart, R.C. (1989) Hepatic tumor-promoting chlorinated hydrocarbons stimulate protein kinase C activity. *Carcinogenesis*, 10, 851–856.
44. Shackleton, G.L., Gibson, G.G., Sharma, R.K., Howes, D., Orrenius, S. and Kass, G.E.N. (1995) Diverse mechanisms of calcium mobilization by peroxisome proliferators in rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 130, 294–303.
45. Barrass, N.C., Price, R.J., Lake, B.G. and Orton, T.C. (1993) Comparison of the acute and chronic mitogenic effects of the peroxisome proliferators methylclofenapate and clofibric acid in rat liver. *Carcinogenesis*, 14, 1451–1456.
46. Styles, J.A., Kelly, M., Pritchard, N.R. and Elcombe, C.R. (1988) A species comparison of acute hyperplasia induced by the peroxisome proliferator methylclofenapate: involvement of the binucleated hepatocyte. *Carcinogenesis*, 9, 1647–1655.
47. Styles, J.A. (1993) Detection and quantification of ploidy, nuclearity, and DNA synthesis in rat hepatocytes after administration of a peroxisome proliferator. *Environ. Hlth Perspect.*, 101, 225–228.
48. Roseng, L.E., Rivedal, E. and Sanner, T. (1993) 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inhibition of gap junctional communication is differentially regulated in a transformation-sensitive Syrian hamster embryo cell line compared to early passage SHE cells. *Carcinogenesis*, 14, 1851–1855.
49. Mikalsen, S.-O., Kaalhus, O., Reith, A. and Sanner, T. (1990) Role of catalase and oxidative stress in hepatic peroxisome proliferator-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer*, 46, 950–957.
50. Tsutsui, T., Watanabe, E. and Barrett, J.C. (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 14, 611–618.
51. 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.

Received on July 10, 1996; revised on August 28, 1996; accepted on November 25, 1996

Publication 2 : “Influence of the experimental procedure on the transforming effects of four peroxisome proliferators on Syrian hamster embryo (SHE) cells.”

Cruciani *et al.*, Carcinogenesis, soumis.

Influence of experimental procedures on the transforming effects of four peroxisome proliferators on Syrian hamster embryo (SHE) cells.

Cruciani V.^{1,3}, Rast C.¹, Alexandre S.¹, Nguyen-Ba G.² and Vasseur P.¹

¹ Centre des Sciences de l'Environnement- BP 94025, F-57040 Metz Cedex.

² Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS-URA 1218, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-92290 Châtenay-Malabry.

³ To whom correspondence should be addressed.

Abstract

We compared the ability of four hepatic peroxisome proliferators (HPPs) to induce morphological transformation (MT) in Syrian hamster embryo (SHE) cells under different pHs (7.35, 7.0 and 6.7) and experimental conditions. We studied two structurally related hypolipidaemic agents, clofibrate and methyl clofenapate (MCP), one industrial plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and one of its primary active metabolite *in vivo*, mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP). Different testing procedures were used. The HPPs were applied alone once, twice or three times to SHE cells. Sequential treatments with other carcinogens such as benzo(a)pyrene (BaP) or 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) were also used to study possible interactions. This initiation-promotion procedure was applied using a test medium at pH 7.35 or 7.0. At pH 6.7, the cells were exposed once to the tested compounds applied alone.

There seemed to be no systematic evolution of the response obtained when the pH decreased. Indeed, while the transforming potency of clofibrate decreased when the pH value decreased, structurally-related methyl clofenapate (MCP) was more potent at acidic pH. In contrast to DEHP, MEHP was more active at pH 6.7 than at pH 7.0. The MT induction, resulting from the interaction between HPPs and BaP or TPA, appeared pH-dependent and often higher at pH 7.35 than at pH 7.0.

This study confirmed that: (i) pH actually influences SHE cell response to HPPs, (ii) repeated applications of the tested substance within the 7 days of the assay are more efficient in detecting a transforming potency, (iii) the initiation-promotion procedure constitutes a powerful tool to detect interactions involving non-genotoxic carcinogens.

Abbreviations: BaP, benzo(a)pyrene; DEHP, di(2-ethylhexyl)phthalate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; FCS, fetal calf serum; GJIC, gap junctional intercellular communication; HPPs, hepatic peroxisome proliferators; LMDMEM, LeBoeuf modified DMEM; MT, morphological transformation; MCP, methyl clofenapate; MEHP, mono(2-ethylhexyl)phthalate; SHE, Syrian hamster embryo; TPA, 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate.

Introduction

Syrian hamster embryo (SHE) cells are early passage cells often used for the study of *in vitro* chemical carcinogenesis. A close correlation was obtained between the ability of compounds from different chemical classes to induce tumors in experimental animals and the morphological transformation in SHE cells (1-3). These cells are representative of "normal" cells since they are diploid, genetically stable, not tumorigenic and have metabolic capabilities for the activation of some classes of chemical carcinogens (2-4). Some authors have shown that cells from morphologically-transformed colonies progress towards immortality, and ultimately malignancy, with a significantly higher frequency than normal colonies (4-8). Exposure to carcinogenic compounds leads to morphologically transformed growth characteristics that have recently been linked to alterations in growth factor homeostasis (9) and to enzymatic disturbances (10). The SHE cell morphological transformation assay is particularly relevant to evaluate the transforming potential of so called "non-genotoxic" carcinogens that escape the *in vitro* screening procedures for genotoxicity (11,12).

Different processes have been proposed for the SHE cell transformation assay. The differences concern the pH and the modalities of renewal of the test medium during the experiment and treatment. The chemical can be tested either alone or combined with other carcinogens. Coexposures or sequential exposures of SHE cells to the tested substances with initiators or promoters have been recommended to detect possible interactions and to increase the sensitivity of screening (11-13). The SHE cell transformation assay has recently been proposed as an OECD guideline for the testing of chemicals. As different protocols can be used, it thus seemed worthwhile to investigate more thoroughly the influence of experimental procedures on the response of SHE cells to morphological transformation (MT) induced especially by non-genotoxic carcinogens.

This study was carried out with four chemicals classified as non-genotoxic carcinogens. We chose two structurally related hypolipidaemic agents, clofibrate and methyl clofenapate (MCP), one industrial plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and one of its primary active metabolite *in vivo*, mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP). These chemicals belong to the group of hepatic peroxisome proliferators (HPPs).

Prolonged administration of some HPPs has been shown to produce liver tumors in rats and mice (14-17). Despite their hepatocarcinogenic activity, HPPs are inactive in a wide range of short-term assays for genotoxicity *in vivo* and *in vitro* (18-20) and are thus considered as

non-genotoxic carcinogens. The transforming potencies of some HPPs had already been studied on SHE cells (21-29), giving variable responses depending on the experimental conditions.

In this study, we attempted to define the procedures which could improve the sensitivity of SHE cells to the transforming effects of non-genotoxic carcinogens such as HPPs. Different protocols were used in order to determine whether these chemicals are active alone or in combination with other carcinogenic substances. An initiation-promotion scheme was applied, as recommended by Chouroulinkov *et al.* (13,30,31), to evaluate their combined effects with a model initiator such as benzo(a)pyrene (BaP) and with the phorbol ester, 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) as a model tumor promoter.

Morphological transformation assays were performed under different pH conditions, at pHs 7.35, 7.0 and 6.7. The standard procedure (medium at pH 7.35) was originally described by DiPaolo (32), Chouroulinkov *et al.* (13,30,31) and Pienta *et al.* (2). pH 7.0 was later used by several authors (3,23,33,34), and pH 6.7 was recommended more recently by Leboeuf *et al.* (35,36). The initiation-promotion procedure was carried out at pHs 7.35 and 7.0. The modalities of cell exposure, either in static or semi-static conditions, depending on the renewal or not of the test medium during the experiment, were also investigated at pHs 7.35 and 7.0. The test medium either remained unchanged or was renewed once or twice during the 7 days of exposure, these modalities corresponding to one, two or three applications of the tested chemical at the concentration required.

Materials and methods

Chemicals

Clofibrate (CAS 637-07-0), benzo(a)pyrene (BaP, CAS 50-32-8), 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA, CAS 16561-29-8), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, CAS 117-82-7) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), methyl clofenapate (MCP, CAS 21340-68-1, provided by J. Ashby, Zeneca Central Toxicology Lab., UK), and mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP, CAS 4376-20-9, Interchim, Montluçon, France) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium just before use. DMSO was used at a final concentration of 0.2%.

Cell culture

SHE cells were isolated from Syrian golden hamsters at 13-days of gestation using the procedure previously described (2) and in accordance with the modifications suggested by Elias *et al.* (6,7). Target as well as X-irradiated feeder cells were kept frozen in liquid nitrogen. Target cells were thawed and cultured in media of different pHs (7.35, 7.0 or 6.7) at least three days before the transformation assay was performed in the corresponding medium.

Experimental growth media

Three growth media were used to evaluate the ability of HPPs to morphologically transform SHE cells. The pH of the medium were set at 7.35, 7.0 and 6.7. DMEM is the commonly-used Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, France). As shown in table I, 3.7 or 2.2 g NaHCO_3/l were added to DMEM to reach pHs 7.35 and 7.0 respectively. The most acidic pH (6.7) was obtained by the addition of 0.75 g NaHCO_3/l to LMDMEM medium. LMDMEM is a DMEM medium modified by LeBoeuf *et al.* (34,35) with a reduced concentration of phenol red (5 mg/l instead of 15 mg/l, HyClone, USA). All media were supplemented with 15% fetal calf serum (FCS, HyClone, USA).

SHE cell transformation assays

At pHs 7.35 and 7.0 the transforming potency of the HPPs was studied according to the procedure previously-described (11,12,21). To summarize, 100 to 300 target cells were seeded on day 0 in 60 mm Petri dishes (Corning) onto a feeder layer of 60000 X-irradiated SHE cells (5000 Rad). The cells were treated 24 hrs later with HPPs applied either alone (i) or in an initiation-promotion scheme (ii,iii), using the following three procedures: (i) the tested HPP was applied alone (a) once on day 1 without changing the medium until day 8, (b) two times by adding fresh medium containing the same dose of HPP on days 1 and 3, (c) three times by renewing the test medium on days 1, 3 and 5; (ii) the cells were exposed to 0.4 μM BaP for 24 hrs, the medium was then removed and replaced by the HPP-containing test medium which was renewed on day 5; (iii) the tested HPP was applied to the cells for 24 hrs and replaced by 0.16 μM TPA, also renewed on day 5.

On day 8, the medium was removed, the cells were washed with phosphate-buffered-saline, fixed in ethanol and stained in 10% aqueous Giemsa.

At pH 6.7, we followed the procedure described by LeBoeuf *et al.* (36). Briefly, 75 to 150 target cells were seeded onto 40000 feeder cells per dish. After 24 hrs, the tested HPP was

applied and the cells were grown for an additional 7 days without changing the medium before they were washed, fixed and stained.

All the dishes were coded and blindly scored. Morphologically transformed colonies were defined as colonies exhibiting a multi-layered, criss-cross pattern of growth throughout the colony. The cloning efficiency was calculated as the number of colonies per dish/number of target cells seeded x 100. The morphological transformation frequency was calculated as the number of transformed colonies/total number of colonies scored x 100.

The data presented are pooled results obtained from at least three independent experiments unless mentioned in tables and figures. As noted by LeBoeuf *et al.* (35), cellular and clonal morphology of untreated SHE cells were different, depending on the pH of the medium used. As shown in Figure 1, cells cultured at pH 6.7 were more spindle-shaped than at higher pHs (figures 1a, 1b and 1c).

Statistical analysis

The frequency of MT from pooled data sets was compared in treated and untreated cultures with a two-sided χ^2 test at the levels of 5, 2, 1 or 0.1% of significance. Treated cultures were compared to concurrent experimental controls.

Results

Transforming effects of clofibrate

The tested concentrations of clofibrate when applied alone ranged between 25 and 200 μM at pH 7.35 and between 50 and 150 μM at pHs 7.0 and 6.7 (table II). At pH 7.35, clofibrate significantly increased the morphological transformation frequency after three applications from 50 to 200 μM : the percentage of transformed colonies reached 2.5% at 50 μM . At pH 7.0, a significant effect was registered when the chemical was applied once (at 150 μM), twice (at 100 μM) or three times (at 100 μM). Yet, the MT frequency was much lower than at pH 7.35.

No induction in the morphological transformation frequency was registered in clofibrate-treated cells at pH 6.7 compared to DMSO controls.

In sequential treatments, no significant increase in the morphological transformation was noted when clofibrate was applied in BaP-treated cells, whatever the pH used (figure 2). In contrast, MT frequency increased when TPA was applied to cells previously treated by clofibrate for 24 hrs at pH 7.35. A pretreatment with 100 and 200 μM clofibrate, increased the transformation frequency to 4.3 and 5.0% respectively, as opposed to 1.8% in the TPA-treated controls (figure 3a). No interacting effects with TPA were observed when treatments were carried out at pH 7.0 (figure 3b).

Transforming effects of MCP

At pH 7.35 neither an increase in MT nor in cytotoxicity, as would be reflected by a decrease in cloning efficiency, was observed following exposure to MCP tested alone in the range 25-200 μM (table III).

At pH 7.0, the transforming frequency of SHE colonies significantly increased after three applications of MCP (from 100 μM).

At pH 6.7, MCP could not be tested at concentrations above 25 μM , due to a very high cytotoxicity. A noticeable increase in the transformation frequency (to 4.3%) was registered when the cells were exposed to 5 μM MCP compared with 2.2% in the DMSO-treated controls. Yet, no dose-effect relationship was obtained.

Synergistic effects between MCP and BaP were registered in sequential treatments at pHs 7.35 and 7.0 (figure 2). The effects were higher at pH 7.0 and occurred at all concentrations tested: at 50 μM , MT frequency reached 3.0% against 1.0% in BaP controls.

Interacting effects were also noted with TPA. While MCP had no effect alone on MT in SHE cells at pH 7.35, the percentage of transformed colonies in sequential treatments reached 3.0% with 100 μ M MCP versus 1.3% in TPA-treated controls (figure 3a). The synergistic effects with the phorbol ester were more pronounced at pH 7.0 and already detectable at 50 μ M MCP with 3.2% MT frequency against 1.7% in TPA controls (figure 3b).

Transforming effects of DEHP

At pH 7.35, the transforming potency of DEHP was measured at concentrations ranging from 25 to 100 μ M. A low but significant increase (0.9%) in the MT frequency was observed when the cells were treated once with 75 μ M DEHP (table IV).

At pH 7.0, DEHP induced a significant increase of the MT frequency when it was applied alone two (25 μ M and above) or three times (25 and 50 μ M). At the acidic pH (6.7), we observed a strong cytotoxic effect at the highest dose used (75 μ M), decreasing the cloning efficiency from 37 to 23%. No enhancement of the MT frequency was observed in cells treated by 25, 50 and 75 μ M DEHP at acidic pH (table IV). Lower concentrations (in the range 1.6 to 25 μ M) were also investigated giving negative responses (results not shown).

Sequential exposures at pH 7.35 to BaP and DEHP (100 μ M) increased the transformation frequency of SHE cells up to 1.3% (figures 2a) compared with 0.4% in the control.

No combined effect was registered with TPA (figure 3).

Transforming effects of MEHP

The transforming potency of MEHP was measured at pHs 7.0 and 6.7 at concentrations ranging from 50 to 150 μ M and from 25 to 100 μ M respectively (table V, figures 2b and 3b). At pH 7.0, no effect was registered after one application of MEHP. Yet, MEHP induced the morphological transformation of SHE cells when it was applied alone twice (up to 1.8% at 50 μ M as opposed to 0.3% in the control) or three times (up to 2.7 and 3.6% at 100 and 150 μ M respectively compared with 0.4% in the control).

At pH 6.7, MEHP significantly induced the MT frequency up to 3.8% in the 25 and 50 μ M MEHP-treated dishes compared with 1.8% in the DMSO-treated controls.

No interacting effects with BaP or TPA were registered at pH 7.0 (figures 2b and 3b).

Discussion

A summary of SHE cell transformation by HPPs under different experimental conditions is presented in Table VI. Results showed that positive responses were registered with every HPP at pH 7.0, though this pH did not correspond to optimum sensitivity in every case. Results of assays obtained after two applications of clofibrate, DEHP and MEHP at pH 7.0 were in agreement with those of Mikalsen *et al.* (23-25) who observed a significant enhancement of the MT frequency from 50 μ M clofibrate, 12 μ M DEHP and 25 μ M MEHP. We were able to confirm the induction of cell transformation at 12 μ M DEHP in additional experiments (results not shown). DEHP, the most thoroughly studied HPP, has also been found to induce transformation in the SHE cell system by other authors using either one (27,29) or two (23-25,28) applications of the compound.

From the overall results, it can be concluded that there was no univocal relationship between pH and sensitivity of SHE cells to morphological transformation. No systematic enhancement of the transformation of SHE cells treated by the HPPs alone occurred when the pH of the medium was reduced from 7.35 and 7.0 to 6.7. Indeed, clofibrate induced MT at pHs 7.35 and 7.0, but not at pH 6.7. Moreover, clofibrate was more potent at pH 7.35 and induced MT with a higher frequency than at pH 7.0. In contrast, MCP showed an increasingly transforming potency when the pH decreased. This discrepancy between clofibrate and MCP was surprising since these two substances are two structural analogs which should be expected to give similar results.

Likewise, DEHP and its metabolite MEHP behaved differently at pH 6.7. In contrast to DEHP, MEHP was much more active at an acidic pH than at pH 7.0 where no positive response could be recorded after one application.

The differences registered with pH may be explained in part by the bioavailability of the chemicals tested. Bioavailability of ionizable organic chemicals, such as the HPPs tested, is known to be influenced by pH. The pH value corresponding to the highest biological activity may thus differ according to the chemical structure and pKa. Yet, both chemical and cellular factors will influence chemical uptake and toxicity, and need to be considered simultaneously.

The use of semi-static conditions, consisting in renewing the test medium several times, appeared to increase the sensitivity of SHE cells to morphological transformation. This factor influenced cell response as much as pH itself. When testing a chemical alone at the optimal pH, the increase in MT frequency compared to controls was generally higher when

the medium was renewed during the 7 days of exposure. The increase was always highly significant after two renewals of the test medium (i.e. three applications). Metabolization of the test chemical by SHE cells may explain that renewing the medium several times will maintain the concentrations of the transforming agent above an effect threshold during the cell cycle and will thus improve sensitivity.

Some positive responses were recorded after a single application of 75 μ M DEHP at pH 7.35 and 150 μ M clofibrate at pH 7.0, but were not highly significant. Yet, considering that the MT frequency of the corresponding controls (0% and 0.1% in DEHP and clofibrate experiments respectively) was lower than the average of the MT frequency generally obtained in controls, these results could be considered as borderline and require caution when interpreting them. Indeed, these results would not have been significant, based on the average percentage of transformed colonies of DMSO controls which were 0.17% and 0.29% at pHs 7.35 and 7.0 respectively.

The increase in transformation frequency was much highly significant after sequential treatments with BaP or TPA than when testing the chemical alone, as shown particularly with clofibrate and MCP. Pretreatment of cells with clofibrate or MCP during a 24 hrs period clearly increased TPA effects. MCP applied on BaP-initiated cells also potentiated the transforming effects of this initiator. Synergism was clear at pH 7.35 while MCP alone was devoid of activity at this pH. The potentiating effect of DEHP on BaP-treated cells was less pronounced.

The interactions between HPPs and the two model carcinogens were generally observed at pH 7.35. The influence of pH may result from the pH-dependent response of each combined compound. Bioavailability of BaP appeared higher at pH 7.35. Exposure to 0.4 μ M BaP alone for 24 hrs led to 1.1% of transformed colonies at pH 7.35, compared with 0.8% at pH 7.0. The higher percentage of transformed colonies at pH 7.0 with sequential treatments MCP/TPA can also be explained by the greater activity of MCP at this pH, as noted above.

It is worth noting that clofibrate did not enhance the transforming effects of BaP. Such a result was also shown with chlordane, a chlorinated non-genotoxic carcinogen pesticide (12). This underlines that a non-genotoxic carcinogen does not necessarily potentiate the effects of initiators or of every initiator. The lack of BaP/clofibrate interaction may be discussed taking into account the results of Cattley *et al.* (37), who showed that *in vivo* promoting activities of some HPPs (clofibrate and Wy-14,643) are initiator dependent. Indeed, fewer carcinomas were induced in F344 rat liver when the initiator used was 2-aminofluorene than when it was diethylnitrosamine.

Clofibrate and MCP tested in sequential treatments with TPA (0.16 μM) enhanced the transforming effects of the phorbol ester. This suggests that interactions between non-genotoxic carcinogens may have dramatic consequences on cell transformation and must be taken into account as much as combined effects with initiators. As previously discussed (12,21) the interactions between non-genotoxic carcinogens, including HPPs, resulting in the enhancement of cell transformation may be explained by an increase of the cytosolic-free calcium concentration leading to an activation of protein kinase C. A synergism between TPA and free calcium ions has already been demonstrated (38,39) and HPPs were shown to induce Ca^{++} release (40).

The above results, which demonstrated the power in carcinogen screening of a sequential exposure including an initiator or a tumor promoter, would tend to recommend an initiation-promotion procedure in the SHE-cell transformation assay, as previously advised by other authors (13,30,31). Yet, this procedure may not appear as easy as testing a chemical alone. Moreover, the choice of the initiator or of the tumor promoter can also be discussed.

Therefore, from a practical point of view, it is recommended to conduct morphological transformation assays of SHE cells with repeated applications of the tested chemical. The present results on HPPs argued for the use of pH 7.0. They also showed that an acidic pH, such as 6.7, did not ensure detection of transforming potency with a simple experimental procedure using one application of the test chemical. In the experimental conditions we used (batches of serum and cells), the transforming effects of both clofibrate and DEHP were no longer expressed when the pH of the medium decreased to 6.7. This is not in accordance with the results of LeBoeuf *et al.* (26) who found positive responses with both clofibrate and DEHP at pH 6.7. Indeed, the positive response was obtained with 80 $\mu\text{g/ml}$ (330 μM) clofibrate which is much higher than the concentration tested here. In contrast, the transforming effects of DEHP were evaluated from 0.625 $\mu\text{g/ml}$ (1.6 μM) to 10 $\mu\text{g/ml}$ (25 μM) and positive results were obtained with all concentrations except the highest one. We tested DEHP in the range of 1.6 to 25 μM and did not find significant responses at pH 6.7.

LeBoeuf *et al.* (5,35,36,41,42) recommended the use of acidic pH, arguing that there was a systematic increase in both the sensitivity and the reproducibility of the assay when the pH of the medium was lowered. The improvement of the SHE transformation assay's sensitivity at a low pH may be mechanistically related to the decrease in gap junctional intercellular communication (GJIC) as shown by Ruch *et al.* (43).

It must be noted that, in our case, colonies grown at an acidic pH (figure 1c) often had the same morphology as colonies treated by a transforming agent at pH 7.0 or 7.35 (figures 1d). The decrease of GJIC could explain the morphology of SHE cells cultured at a low pH. This “injured” morphology may lead to a higher MT frequency in the DMSO-treated controls at pH 6.7 (2.2%) compared with pH 7.0 (0.3%) when the same criteria are used for the scoring of transformed colonies.

One experimental factor which has not been considered here is the serum. Though serum of the best quality is required for the cloning of early passage SHE cells, discrepancies between batches of fetal calf serum exist, depending on their origin and composition. The expression of transformed colonies is dependent on the source of FCS (34,44-46) and the protein factors contained in the serum (47) which probably vary qualitatively and quantitatively. As long as we cannot identify and control the active factors included in different batches of FCS, an inter-laboratory variability will still exist.

The aim of this work was to evaluate the alterations in the transforming responses obtained with HPPs on SHE cells using different experimental procedures. We can conclude that repeated applications of the tested compound allow us to identify a transforming potential more accurately. It is clear that pH actually influences the response. Though pH 7.0 appeared appropriate to ensure detection of every chemical tested here, it would certainly be unwise to generalize from this study to chemical classes other than HPPs. We do not refute the fact that one application of the tested compound at pH 6.7 could offer advantages. Thus a strategy consisting of a two-step procedure is advisable. During the first step the compound could be tested alone, either at pH 6.7, or at 7.0 with repeated applications. If negative results were obtained, a second step could be carried out using an initiation-promotion procedure in order to increase performance. The initiation-promotion protocol would also give some insights into the mechanisms of interactions which may occur in the context of multiple exposure in life.

Acknowledgements

This work was financed by the EEC (grant CT91-0146) and the French Ministry of the Environment. The authors would like to acknowledge these sponsors for their support. They want also to thank Tracy Carmona for her precious help in correcting this paper.

References

1. Berwald,Y. and Sachs,L. (1963) *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, 200, 1182-1184.
2. 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.
3. Barrett,J.C., Crawford,D.D., Mixter,L.O., Schectman,L.M., Ts'o,P.O.P. and Pollack,R. (1979) Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.*, 39, 1504-1510.
4. 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.
5. LeBoeuf,R.A., Kerckaert,G.A., Aardema,M.J. and Gibson,D.P. (1990) Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Res.*, 50, 3722-3729.
6. 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.
7. Elias,Z., Poirot,O., Schneider,O., Marande,A.M., Daniere,M.C., Terzetti,F., Pezerat,H., Fournier,M. and Zalma,R. (1995) Cytotoxic and transforming effects of some iron-containing minerals in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Detect. Prevent.*, 19, 405-414.

8. DiPaolo,J.A., Nelson,R.L. and Donovan,P.J. (1971) Morphological, oncogenic, and karyological characteristics of Syrian hamster embryo cells transformed *in vitro* by carcinogenic polyaromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, **31**, 1118-1127.
9. Isfort,R.J., Cody,D.B., Kerckaert,G.A. and LeBoeuf,R.A. (1994) Growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis in Syrian hamster embryo cells during *in vitro* transformation. *Carcinogenesis*, **15**, 1203-1209.
10. Dhalluin,S., Cruciani,V., Rast,C., Vasseur,P., Tapiero,H. and Nguyen-Ba,G. (1996) Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities. *Cellular Pharmacol.*, **3**, 23-28.
11. Bessi,H., Rast,C., Nguyen-Ba,G. and Vasseur,P. (1994) Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit gap junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *Cancer J.*, **7**, 248-253.
12. Bessi,H., Rast,C., Rether,B., Nguyen-Ba,G. and Vasseur,P. (1995) Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis*, **16**, 237-244.
13. Lasne,C., Lu,Y.P., Orfila,L., Ventura,L. and Chouroulinkov,I. (1990) Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **11**, 541-547.
14. Reddy,J.K. and Lalwani,N.D. (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **12**, 1-58.
15. Rao,M.S. and Reddy,J.K. (1987) Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **8**, 631-636.

16. Stott, W.T. (1988) Chemically induced proliferation of peroxisomes: implications for risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **8**, 125-159.
17. Reddy, J.K., Azarnoff, D.L. and Hignite, C.E. (1980) Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature*, **283**, 397-398.
18. Warren, J.R., Simmon, V.F. and Reddy, J.K. (1980) Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the lymphocyte [³H]thymidine and Salmonella mutagenesis assays. *Cancer Res.*, **40**, 36-41.
19. Reddy, J.K. and Rao, M.S. (1992) Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. In Vianio, H., Magee, P.N., McGregor, D.B. and McMichael S. (eds), *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. IARC. Sci. Publ., Lyon, pp. 225-235.
20. Ashby, J., Brady, A., Elcombe, C.R., Elliott, B.M., Ishmael, J., Odum, J., Tugwood, J.D., Kettle, S. and Purchase, I.F.H. (1994) Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.*, **13**, S1-S117.
21. Cruciani, V., Rast, C., Durand, M.J., Nguyen-Ba, G. and Vasseur, P. (1997) Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **18**, in press.
22. Tsutsui, T., Watanabe, E. and Barrett, J.C. (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **14**, 611-618.
23. Mikalsen, S.-O., Holen, I. and Sanner, T. (1990) Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and nickel sulphate. *Cell Biol. Toxicol.*, **6**, 1-13.
24. Mikalsen, S.-O., Kaalhus, O., Reith, A. and Sanner, T. (1990) Role of catalase and oxidative stress in hepatic peroxisome proliferator-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer*, **46**, 950-957.

25. Mikalsen, S.-O. and Sanner, T. (1993) Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis*, **14**, 251-257.
26. LeBoeuf, R.A., Kerckaert, G.A., Aardema, M.J., Gibson, D.P., Brauninger, R. and Isfort, R.J. (1996) The pH 6.7 Syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat. Res.*, **356**, 85-127.
27. Jones, C.A., Huberman, E., Gallaham, M.F., Tu, A., Hallowell, A., Pallota, S., Sivak, A., Lubet, R.A., Avery, M.D., Kouri, R.E., Spalding, J. and Tennant, R.W. (1988) An interlaboratory evaluation of the Syrian hamster embryo cell transformation assay using eighteen coded chemicals. *Toxic. in Vitro*, **2**, 103-116.
28. Holen, I., Mikalsen, S.-O. and Sanner, T. (1990) Effects of dinitrotoluene on morphological cell transformation and intercellular communication in Syrian hamster embryo cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, **29**, 89-98.
29. 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.H., Matter, B.E. and Shelby, M.D. (eds.) *Progress in Mutation Research-Evaluation of Short Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, pp. 623-628.
30. Lasne, C., Gentil, A. and Chouroulinkov, I. (1974) Two stage malignant transformation of Syrian hamster embryo cells. *Nature*, **247**, 490-491.
31. Chouroulinkov, I. and Lasne, C. (1978) Two stage (initiation-promotion) carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Bull. Cancer*, **65**, 255-264.
32. DiPaolo, J.A., (1980) Quantitative *in vitro* transformation of Syrian golden hamster embryo cells with the use of frozen stored cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 1485-1489.
33. Sanner, T. and Rivedal, E. (1985) Tests with the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. In Ashby, J., de Serres, F.J., Draper, M., Ishidate, M., Margolin, B.H.,

Matter,B.E. and Shelby,M.D. (eds.) *Progress in Mutation Research-Evaluation of Short Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, pp. 665-671.

34. Rivedal,E. and Sanner,T. (1983) Expression of transformed morphology and anchorage independent growth of hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 4, 817-820.

35. LeBoeuf,R.A. and Kerckaert,G.A. (1986) The induction of transformed-like morphology and enhanced growth in Syrian hamster embryo cells grown at acidic pH. *Carcinogenesis*, 7, 1431-1440.

36. 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, 689-697.

37. Cattley,R.C., Kato,M., Popp,J.A., Teets,V.J. and Voss,K.S. (1994) Initiator-specific promotion of hepatocarcinogenesis by Wy-14,643 and clofibrate. *Carcinogenesis*, 15, 1763-1766.

38. May,W.S.,Jr, Sahyoun,N., Wolf,M. and Cuatrecasas,P. (1985) Role of intracellular calcium mobilization in the regulation of protein kinase C-mediated membrane process. *Nature*, 317, 549-551.

39. Wolf,M., Levine,H., May,W.S.,Jr, 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.

40. Shackleton,G.L., Gibson,G.G., Sharma,R.K., Howes,D., Orrenius,S. and Kass,G.E.N. (1995) Diverse mechanisms of calcium mobilization by peroxisome proliferators in rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 130, 294-303.

41. LeBoeuf,R.A., Kerckaert,G.A., Poiley,J.A. and Raineri,R. (1989) An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH. *Mutat. Res.*, 222, 205-218.

42. LeBoeuf,R.A., Lin,P., Kerckaert,G.A. and Gruenstein,E. (1992) Intracellular acidification is associated with enhanced morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res.*, **52**, 144-148.
43. Ruch,R.J., Klaunig,J.E., Kerckaert,G.A. and LeBoeuf,R.A. (1990) Modification of gap junctional intercellular communication by changes in extracellular pH in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **11**, 909-913.
44. Tu,A., Hallowell,W., Pallota,S., Sivak,A., Lubet,R.A., Curren,R.D., Avery,M.D., Jones,C., Sedita,B.A., Huberman,E., Tennant,R.W., Spalding,J. and Kouri,R.E. (1986) An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagen.*, **8**, 77-98.
45. Schuman,R.F., Pienta,R.J., Poiley,J.A. and Lebherz,W.B. (1979) Effect of fetal bovine serum on 3-methylcholanthrene-induced transformation of hamster cells *in vitro*. *In Vitro*, **15**, 730-735.
46. Barrett,J.C., Kakunaga,T., Kuroki,T., Neubert,D., Trosko,J.E., Vasiliev,J.M., Williams,G.M. and Yamasaki,H. (1986) In vitro assays that may be predictive of tumour-promoting agents. In Montesano,R., Bartsch,H., Vainio,H., Wilbourn,J. and Yamasaki,H. (eds.) *Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal*, IARC Sci. Publ., Lyon, pp. 287-292.
47. Rivedal,E. and Haddeland,U. (1996) Role of serum in the morphological transformation of Syrian hamster embryo cells: characterization and partial purification of protein factors in foetal bovine serum. *Toxicol. in Vitro*, **10**, 217-227.

Table I. pH, sodium carbonate and phenol red concentrations of the test medium used.

pH ^a	NaHCO ₃ (g/liter)	phenol red (mg/liter)	basal medium
7.35	3.7	15	DMEM
7.0	2.2	15	DMEM
6.7	0.75	5	LMDMEM

^a pH values of the experimental medium were determined after equilibration of the medium containing 15% serum and incubation in a 10% CO₂ atmosphere.

Table II. Effects of clofibrate on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells under different pH conditions.

concentrations of		renewal of the medium	pH 7.35			pH 7.0			pH 6.7		
clofibrate			cloning efficiency	transformed colonies		cloning efficiency	transformed colonies		cloning efficiency	transformed colonies	
μM	μg/ml			(%)	ratio ^a		%	(%)		ratio ^a	%
0	0	none	11	1/854	0.1	32	2/1432	0.1	22	28/950	2.9
25	6		17	2/934	0.2						
50	12		14	2/1017	0.2	32	4/1431	0.3	23	20/967	2.1
100	24		13	5/998	0.5	34	3/1517	0.2	23	16/977	1.6
150	36					31	10/1371	0.7*	23	17/955	1.8
200	48		11	5/804	0.6						
0		day 5	11	5/524	1	38	1/1687	0.1			
25			12	5/372	1.3						
50			12	3/582	0.5	36	2/1599	0.1			
100			11	6/559	1	34	10/1528	0.7**			
150						35	4/1552	0.3			
200			6	1/320	0.3						
0		day 3 and day5	16	12/1184	1	41	3/1842	0.2			
25			20	19/1104	1.7						
50			17	32/1289	2.5**	37	2/1652	0.1			
100			17	26/1234	2.1*	40	10/1788	0.6*			
150						40	7/1814	0.4			
200			13	30/967	3.1***						

^a ratio, number of transformed colonies/total number of colonies.

* values significantly different from their corresponding controls (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

Table III. Effects of MCP on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells under different pH conditions.

concentrations of		renewal of the medium	pH 7.35			pH 7.0			pH 6.7		
MCP			cloning efficiency	transformed		cloning efficiency	transformed		cloning efficiency	transformed	
μM	μg/ml			ratio ^a	%		ratio ^a	%		ratio ^a	%
0	0	none	13	2/945	0.2	32	4/1447	0.3	32	28/1365	2.2
5	1.5								31	36/838	4.3**
10	3								27	32/1155	2.8
15	4.5								32	13/888	1.5
20	6								31	17/850	2
25	7.5		16	4/876	0.5				26	6/916	0.7
50	15		15	3/1110	0.3	28	7/1239	0.6			
100	30		13	3/996	0.3	23	8/1013	0.8			
150	45					24	4/1090	0.4			
200	60		15	7/1087	0.6						
0		day 5	15	4/727 ^b	1	38	2/1698	0.1			
25			19	2/579 ^b	0.3						
50			15	7/737 ^b	0.9	26	4/1157	0.3			
100			13	4/667 ^b	0.6	26	6/1180	0.5			
150						28	7/1251	0.6			
200			15	5/741 ^b	0.7						
0		day 3 and day5	19	10/1404	0.7	41	3/1832	0.2			
25			25	7/1387	0.5						
50			18	18/1325	1.4	27	7/1226	0.6			
100			19	15/1412	1.1	30	9/1332	0.7*			
150						25	9/1141	0.8*			
200			16	16/1209	1.3						

^a ratio, number of transformed colonies/total number of colonies.

^b results obtained from two experiments.

* values significantly different from their corresponding control (* P <0.05; ** P <0.01).

Table IV. Effects of DEHP on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells under different pH conditions.

concentrations of DEHP		renewal of the medium	pH 7.35			pH 7.0			pH 6.7		
μM	μg/ml		cloning efficiency (%)	transformed colonies		cloning efficiency (%)	transformed colonies		cloning efficiency (%)	transformed colonies	
				ratio ^a	%		ratio ^a	%		ratio ^a	%
0	0	none	15	0/744	0	27	6/1327	0.5	37	28/1586	1.8
25	10		12	1/309 ^b	0.3	26	1/1211	0.1	47	20/1256	1.6
50	19		12	0/580	0	25	3/1207	0.2	34	28/1388	2
75	29		13	6/653	0.9*	25	3/807	0.4	23	5/631	0.8
100	39		10	1/532	0.2						
0		day 5	13	1/334 ^b	0.3	30	2/1463	0.1			
25						29	20/1428	1.4***			
50			16	5/389 ^b	1.3	28	10/1385	0.7*			
75			13	0/318 ^b	0	26	8/892	0.9*			
100			14	1/357 ^b	0.3						
0		day 3, day 5	21	4/1069	0.4	31	4/1500	0.3			
25			22	5/561 ^b	0.9	26	30/1268	2.4***			
50			20	3/1019	0.3	24	19/1189	1.6***			
75			21	3/1043	0.3	30	2/1005	0.2			
100			18	6/901	0.7						

^a ratio, number of transformed colonies/total number of colonies

^a ratio, number of transformed colonies/total number of colonies.

^b results obtained from two experiments.

* values significantly different from their corresponding control (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Table V. Effects of MEHP on cloning efficiency and morphological transformation of SHE cells under different pH conditions.

concentrations of MEHP		renewal of the medium	pH 7.0			pH 6.7		
			cloning efficiency	transformed colonies		cloning efficiency	transformed colonies	
μM	μg/ml		(%)	ratio ^a	%	(%)	ratio ^a	%
0	0	none	26	2/921	0.2	37	28/1586	1.8
25	7					32	51/1351	3.8**
50	14		24	2/896	0.2	33	52/1381	3.8**
100	28		25	0/971	0	32	36/1329	2.7
150	42		18	1/913	0.1			
0		day 5	29	3/1072	0.3			
50			25	16/909	1.8***			
100			22	10/798	1.3*			
150			18	16/946	1.7**			
0		day 3 and day 5	35	5/1259	0.4			
50			30	5/1108	0.5			
100			23	22/856	2.7***			
150			16	30/829	3.6***			

^a ratio, number of transformed colonies/total number of colonies.

* values significantly different from their corresponding control (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

Table VI. Summary of HPP concentrations inducing significant increases in morphological transformation in SHE cells under different experimental conditions.

compound	procedure	pH		
		7.35	7.0	6.7
clofibrate	1 ^a	-	150	-
	2 ^a	-	100	-
	3 ^a	50-100-200	100	-
	BaP+ ^b	-	-	-
	+TPA ^c	100-200	-	-
MCP	1 ^a	-	-	5
	2 ^a	-	-	-
	3 ^a	-	100-150	-
	BaP+ ^b	100	50-100-150	-
	+TPA ^c	100-200	50-100-150	-
DEHP	1 ^a	75	-	-
	2 ^a	-	25-50-75	-
	3 ^a	-	25-50	-
	BaP+ ^b	100	-	-
	+TPA ^c	-	-	-
MEHP	1 ^a	NT	-	25-50
	2 ^a	NT	50-100-150	-
	3 ^a	NT	100-150	-
	BaP+ ^b	NT	-	-
	+TPA ^c	NT	-	-

^a chemical applied 1, 2 or 3 times to the cells as described in "Materials and methods".

^b exposure of the cells to 0.4 μ M BaP for 24 hrs followed by 2 applications of the corresponding HPP.

^c exposure of the cells to the indicated HPP for 24 hrs followed by 2 applications of 0.16 μ M TPA.

- no induction of the transforming frequency whatever the dose of HPP used.

NT; not tested.

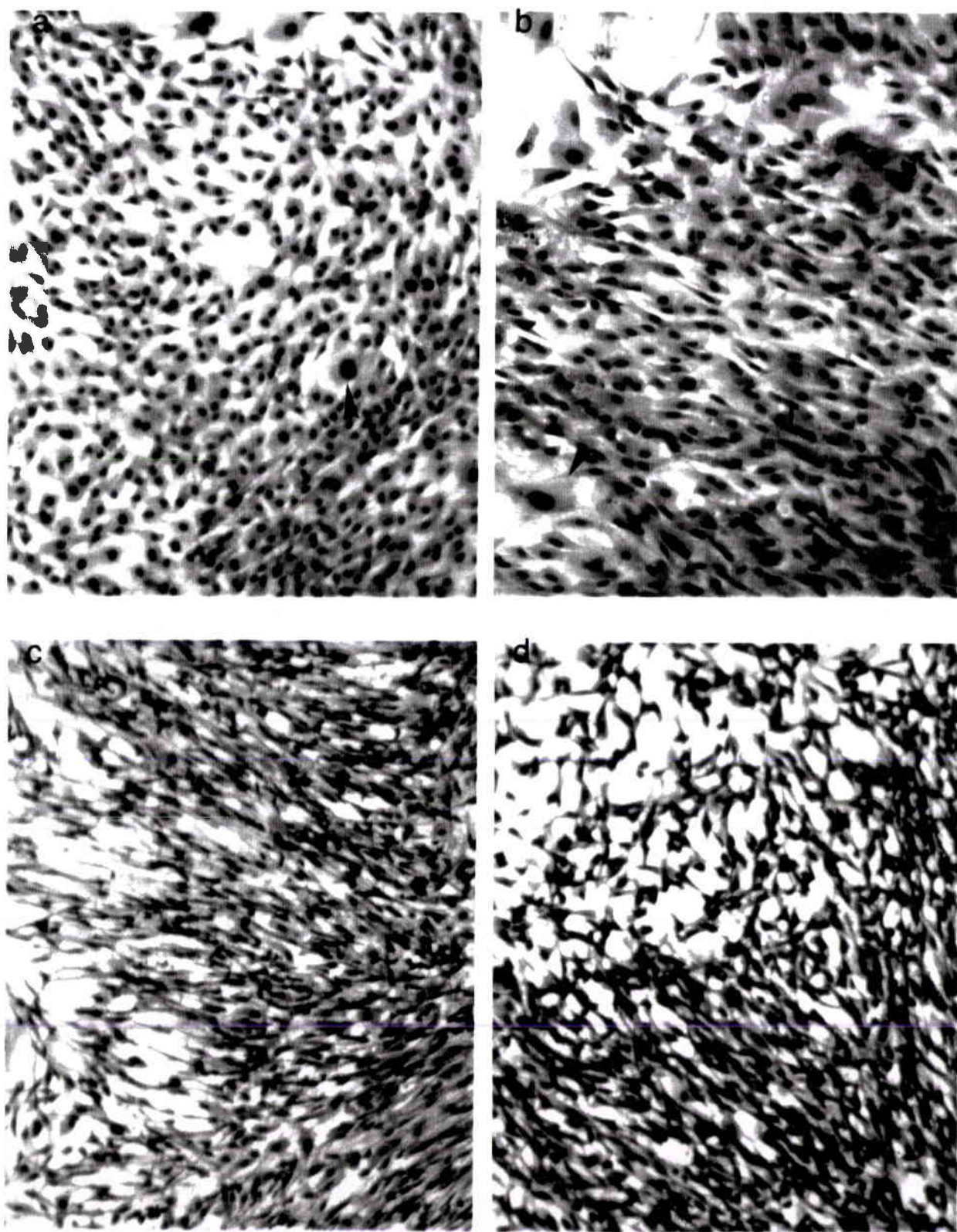


Fig. 1. Photomicrographs (x 80) of normal SHE cell colonies at pH 7.35 (a), pH 7.0 (b) or pH 6.7 (c) and SHE cell colony transformed by 4 μ M BaP at pH 7.0 (d). Arrowheads indicate feeder cells.

**Sequential treatment of SHE cells with 0.4 μ M BaP (24 h)
and HPPs (two applications).**

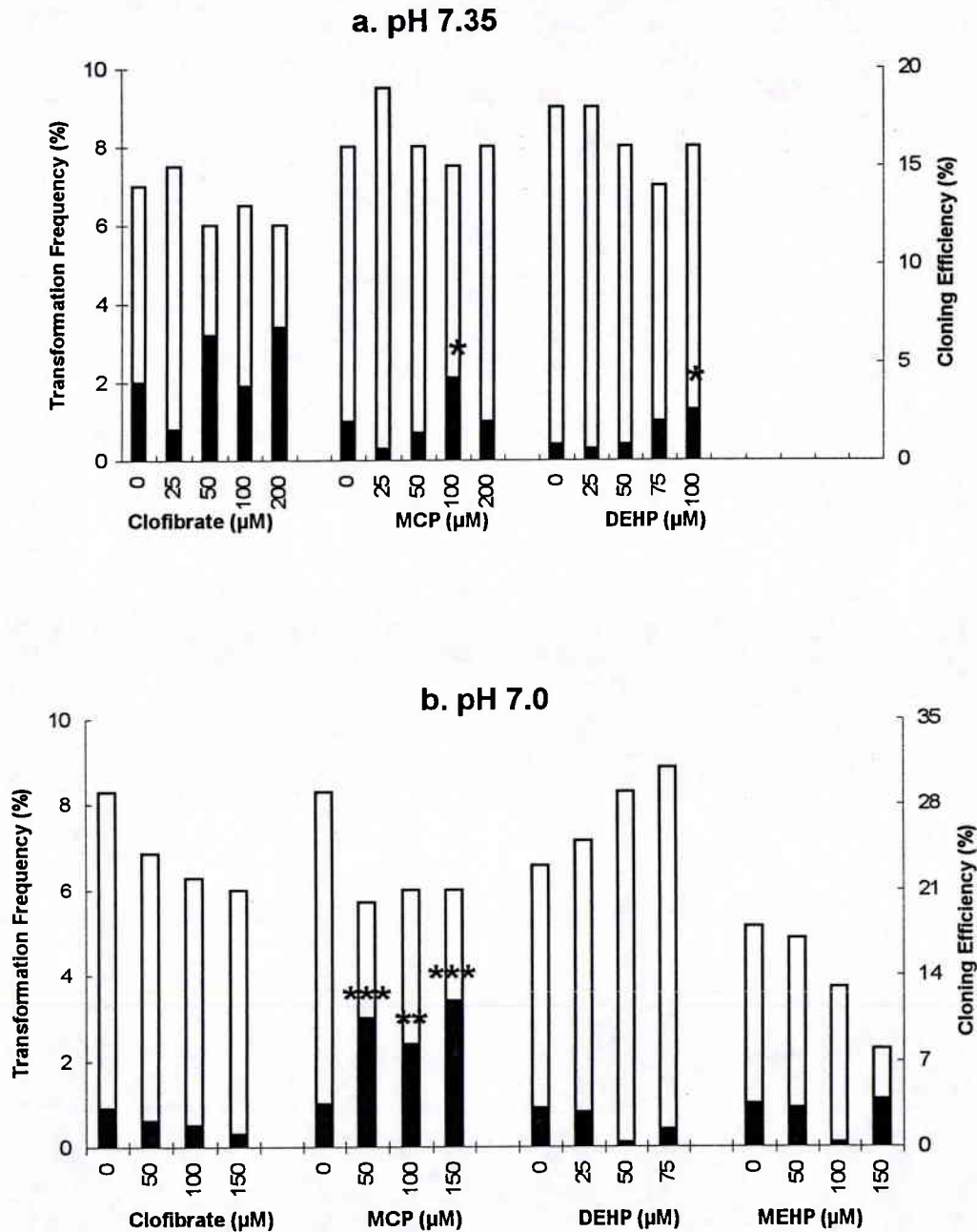


Fig. 2. Transformation frequency (■) and cloning efficiency (□) induced by a sequential treatment of SHE cells with BaP (0.4 μ M) for 24 hrs followed by two applications of the tested HPP at pH 7.35 (a) or pH 7.0 (b). The results were obtained from at least three independent experiments except for 25 μ M DEHP at pH 7.35 (two experiments).

* Transformation frequency significantly different from the respective control

(* P < 0.05; ** P < 0.02; *** P < 0.001).

The total number of colonies scored ranged from 694 to 1234 at pH 7.35 and from 438 to 1460 at pH 7.0.

Sequential treatment of SHE cells with HPPs (24 h) and 0.16 μ M TPA (two applications).

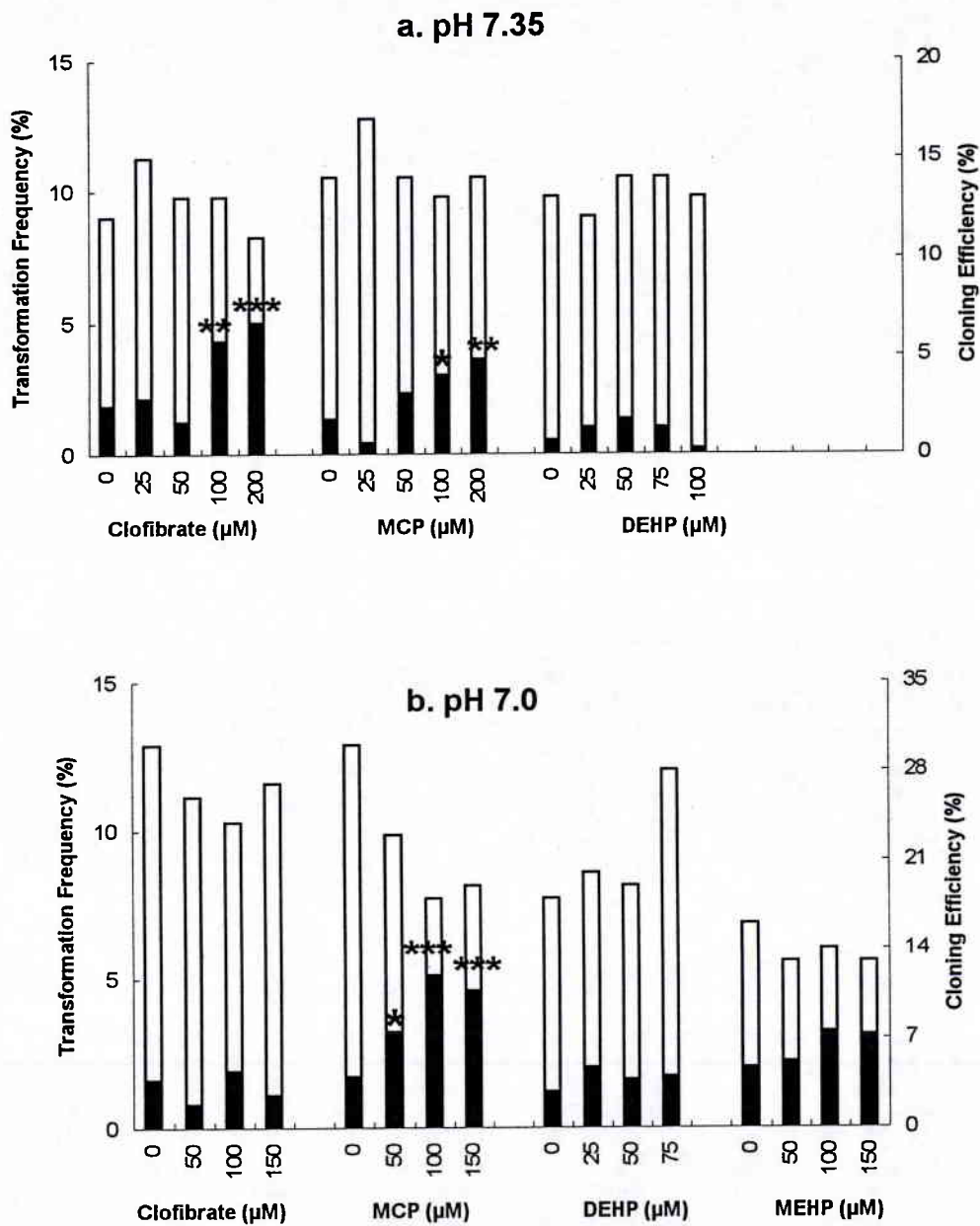


Fig. 3. Transformation frequency (■) and cloning efficiency (□) induced by a sequential treatment of SHE cells with the tested HPP for 24 hrs followed by two applications of TPA (0.16 μ M) at pH 7.35 (a) or pH 7.0 (b). The results were obtained from at least three independent experiments except for 25 μ M DEHP at pH 7.35 (two experiments).

* Transformation frequency significantly different from the respective control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Total number of colonies scored ranged from 301 to 1052 at pH 7.35 and from 683 to 1347 at pH 7.0.

Publication 3 : “Effects of peroxisome proliferators and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin 43 in two hamster fibroblast systems.”

Cruciani *et al.*, International Journal of Cancer, accepté.

**EFFECTS OF PEROXISOME PROLIFERATORS AND 12-*O*-TETRADECANOYL
PHORBOL-13-ACETATE ON INTERCELLULAR COMMUNICATION AND
CONNEXIN43 IN TWO HAMSTER FIBROBLAST SYSTEMS**

Véronique CRUCIANI¹, Svein-Ole MIKALSEN^{2,*}, Paule VASSEUR¹ and Tore SANNER².

¹Centre des Sciences de l'Environnement, F-57040 Metz Cedex, France

²Department for Environmental and Occupational Cancer, Institute for Cancer Research, The
Norwegian Radium Hospital, N-0310 Oslo, Norway.

SUMMARY

Effects of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) and the hepatic peroxisome proliferators (HPPs) clofibrate, methyl clofenapate (MCP), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) were studied in two gap junctional intercellular communication (GJIC) systems, metabolic cooperation in V79 cells and microinjection/dye transfer in Syrian hamster embryo (SHE) cells and V79 cells. TPA inhibited GJIC in both systems, but was considerably more potent in V79 cells. SHE cells showed a rapid and transient inhibition of GJIC after exposure to HPPs, with the maximal inhibition occurring at 5-15 minutes. The transient inhibition could be caused by metabolization of the compounds. Clofibrate and MEHP gave strong inhibition of metabolic cooperation in V79 cells at high concentrations, while MCP and DEHP had less effect. However, DEHP, MEHP and clofibrate strongly inhibited dye transfer in V79 cells after 30 min exposure. Clofibrate showed a dose- and time-dependent effect on dye transfer also in V79 cells. The phosphorylation status of the gap junction protein, connexin43 (Cx43), changed minimally in SHE cells after exposure to TPA or HPPs. Cx43 from V79 cells was strongly affected by TPA, but not by HPPs. Immunofluorescence of Cx43 disappeared in both cell types when exposed to TPA and MEHP, but not to the other HPPs. Thus, there is no direct correlation between the inhibition of GJIC and changes in the phosphorylation status of Cx43 or the appearance of Cx43 in immunofluorescence experiments. The discrepancies may partly be explained by binding of accessory proteins to Cx43. We point out sequences that may be involved in such binding.

INTRODUCTION

Gap junctions can be found in most solid tissues of the body. It is assumed that gap junctional intercellular communication (GJIC) is involved in several fundamental processes like development, differentiation and growth control (for a recent review, see Yamasaki and Naus, 1996). Many tumor promoters have been shown to inhibit GJIC, and inhibition of GJIC has been discussed as a functional assay for tumor promoters. Several assays have been developed for studying GJIC. They involve metabolic cooperation, including the classic V79 hamster lung fibroblast system, electrophysiological measurements, different dye transfer methods like microinjection, scrape loading, fluorescence recovery after photobleaching and flow cytometry. The V79 metabolic cooperation system has been extensively used to study many types of chemicals. In Syrian hamster embryo (SHE) cells, the microinjection/dye transfer method has been applied (Rivedal *et al.*, 1994; Husøy *et al.*, 1993). This system has the added advantage that SHE cells are also used for studies of morphological transformation in colonies (Mikalsen and Sanner, 1993), another end-point for *in vitro* carcinogenesis studies.

The proteins that constitute the gap junction channels are called connexins. Presently, 13 connexin genes have been cloned from mammals. Connexin43 (Cx43) is one of the major connexins. It is present in many tissues and cells of the body (Yamasaki and Naus, 1996). The majority of established cell lines express Cx43 (Yamasaki and Naus, 1996), even if the cells originally did not express Cx43. Phosphorylation of Cx43 appears to be necessary for the establishment of GJIC in such cells (Musil and Goodenough, 1991; Musil *et al.*, 1990). Most connexins are phosphoproteins, or contain potential phosphorylation sites. Several kinases or kinase-activating regimens can modulate GJIC. The classical tumor promoter and protein kinase C (PKC) activator, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), downregulates GJIC in many cell types. The downregulation is possibly caused by a direct phosphorylation of Cx43 by PKC (Oh *et al.*, 1991). Conversely, the cAMP/protein kinase A system upregulates GJIC in many cell types (Flagg-Newton *et al.*, 1981). The cAMP-mediated upregulation could be caused by direct phosphorylation of Cx43 by protein kinase A, but it is more likely caused by an increased expression of the Cx43 gene (Mehta *et al.*, 1992). Several growth factors appear to affect GJIC (for refs., see Yamasaki and Naus, 1996), presumably through phosphorylation of connexins or altered gene expression. Also pesticides like DDT, endosulfan and dieldrin have been shown to decrease GJIC and to decrease the phosphorylation of Cx43 (Rivedal *et al.*, 1994; Kenne *et al.*, 1994). In particular, the presence in Western blots of a slow migrating

Cx43 band (called P2) has been correlated to GJIC (Musil and Goodenough, 1991; Musil *et al.*, 1990). Thus, regulation of connexin phosphorylation may be intimately connected to an altered GJIC.

We have here compared both functional GJIC and posttranslational modifications of Cx43 in two systems, the V79 metabolic cooperation assay and the SHE cell microinjection/dye transfer assay. TPA and the hepatic peroxisome proliferators (HPPs) clofibrate, methyl clofenapate (MCP), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), and mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) were used in this study. HPPs are a heterogeneous group of chemicals consisting of many hypolipidemic drugs, industrial plasticizers, herbicides and several other compounds. They are rodent liver carcinogens, but they are usually not detected in assays for genotoxicity (reviewed in Ashby *et al.*, 1994). Several HPPs induce morphological transformation of SHE cells (Mikalsen and Sanner, 1993; Cruciani *et al.*, 1997), and at least some of them appear to decrease GJIC both *in vitro* (Dybing *et al.*, 1995; Mikalsen and Sanner, 1993) and *in vivo* (Krutovskikh *et al.*, 1995).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

TPA, clofibrate, DEHP, 6-thioguanine (6-TG) and the dilithium salt of Lucifer yellow (LY) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). MEHP was from Interchim (Montluçon, France). MCP was provided by Dr. J. Ashby (Zeneca Central Toxicology Laboratory, Macclesfield, UK). Clofibrate, MCP, DEHP, MEHP and TPA were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). 6-TG was dissolved in 200 μ l 0.2 M NaOH before dilution in the culture medium. LY (10% w/v) was dissolved in 0.33 M lithium chloride.

Cell cultures

Syrian hamster embryo cells were prepared from embryos at 13 days of gestation and cryopreserved as previously described (Cruciani *et al.*, 1997). SHE cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 7.0) supplemented with 15 % heat inactivated fetal calf serum (FCS, Hyclone) in a humidified 10 % CO₂ atmosphere. Wild type 6-TG sensitive (6-TGs, HGPRT+) and mutant 6-TG resistant (6-TGr, HGPRT-) V79 cells were provided by Dr. Z. Elias (INRS, Nancy, France). V79 cells were grown in DMEM supplemented with 10 % FCS in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Antibiotics (50 μ g/ml streptomycin, 50 IU/ml

penicillin) were used in both cell cultures, except during the chemical exposures before micro-injection of cells.

V79 metabolic cooperation assay

The V79 Chinese hamster cell line was used according to the procedure described by Trosko and coworkers (Jones *et al.*, 1985) to evaluate the effects of HPPs and TPA on metabolic cooperation. For cytotoxicity testing, 100 6-TGr cells were seeded per 60 mm dish. The subsequent treatment of the cells was identical to that described below for metabolic cooperation. The toxicity of the different exposure regimens was expressed as the per cent survival of seeded 6-TGr cells. In the metabolic cooperation experiments, 7×10^5 6-TGs cells were seeded together with 100 6-TGr cells per 60 mm dish. The co-cultures were exposed 3 hr later to the test chemical added together with 6-TG (5 $\mu\text{g/ml}$). Ten dishes were used per treatment group. Negative control plates were vehicle treated (0.15 % DMSO). The positive controls were exposed to TPA (1.6 nM). Three days later, the medium was removed and replaced by fresh medium containing only 6-TG at the same concentration. The cells were grown 5 additional days before the surviving colonies were fixed, stained with Giemsa and the number of 6-TGr colonies was scored. The recovery for each treatment was defined by the number of colonies in the co-culture dishes relative to the number of colonies in identically treated cytotoxicity dishes times 100 %. The more metabolic cooperation is inhibited, the higher is the recovery of the resistant cells.

Microinjection/dye transfer assay

GJIC was measured as spreading of microinjected LY to neighboring cells in a monolayer of cells as described previously (Mikalsen and Sanner, 1993). Briefly, 1 to 1.25×10^5 SHE or V79 cells were seeded onto 35 mm dishes 48 hr before injection. At the start of exposure, the medium was removed and fresh medium containing the test chemical was added. At periods varying from immediately after exposure up to 24 h, GJIC was assayed by microinjection/dye transfer. LY (10% w/v in 0.33 M LiCl) was injected in single cells using a Narishige micromanipulator connected to an inverted phase microscope (IMT-2, Olympus). The test compound was present during dye transfer. The number of dye-coupled cells was counted 5 min after injection using epifluorescence on the same microscope as above.

In some experiments, three different exposure procedures were compared. In one series, the cells were continuously exposed to the compound for 4 hr before injection of Lucifer Yellow and evaluation of GJIC (procedure A). In the next series, the cells were continuously exposed to the compound for 4 h. Thereafter, the medium was removed and fresh medium with the same concentration of compound was added to the dish, and the cells were assayed after 5 min (procedure B). In the last series, the cells were continuously exposed to the compound for 4 h. Thereafter, the spent medium was transferred to a new dish, and these cells were assayed after 5 min of exposure (procedure C).

Western blotting

Cells grown in 35 mm dishes were exposed to the chemicals as indicated in the text and legends. At the end of the exposure period, the cells were washed with PBS and 200 μ l electrophoresis sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 15 % (w/v) glycerol, 1 % (w/v) sodium dodecylsulphate, 5 % (v/v) β -mercaptoethanol, 0.01 % (w/v) bromophenol blue) was added and the cells scraped off the dishes. The samples were sonicated to shear DNA and heated before sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% gels) as described (Husøy *et al.*, 1993). For protein measurement an aliquot of the sample was precipitated by acetone, and the proteins were dissolved in 1 M NaOH. The amount of protein was measured with the Bio-Rad (Hercules, CA) protein assay kit, and 8 μ g of protein was used for electrophoresis. The separated proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and Cx43 was detected as previously described (Husøy *et al.*, 1993). The anti-Cx43 antiserum was made against the 19 C-terminal amino acids of rat Cx43. The antiserum recognizes Cx43 both in Western blots (Kenne *et al.*, 1994; Husøy *et al.*, 1993) and in immunofluorescence experiments (Kenne *et al.*, 1994; Rivedal *et al.*, 1994) utilizing several cell types.

Immunofluorescence

Cells were grown in 35 mm dishes, and exposed to chemicals as described in the text and legends. The cells were fixed in cold (-20° C) methanol, and blocked for 1 hr with bovine serum albumin in PBS (10 mg/ml). The cells were incubated for 1 hr with anti-Cx43 diluted 1:500, 1 hr with biotin-conjugated donkey anti-rabbit antiserum (Amersham; Buckinghamshire, England) and 1 hr with streptavidin-FITC (Amersham), all diluted in blocking solution. The

cells were thoroughly washed between each step. The samples were mounted in Mowiol mounting medium. All micrographs were exposed and copied under identical conditions.

Statistics

Both the metabolic cooperation and the microinjection/dye transfer results were analyzed for statistical significances by computerized one-way Anova with Dunnett's or Tukey-Kramer's post-test for comparison of test groups with control or comparison between all groups, respectively (InStat, GraphPad Software). The statistical significances for the microinjection/dye transfer data were always calculated versus a time-matched control using the real numbers of communicating cells (mean $\pm$ SEM for n injections). To facilitate the comparison, the dye transfer data are presented as per cent of control (i.e., the control was defined as 100 %), but the statistical significances were always calculated on the basis of the nontransformed data. The statistical significances for the metabolic cooperation data were calculated on the basis of the number of colonies in n dishes.

RESULTS

Microinjection/dye transfer in SHE cells

The time- and dose-dependent effects of the compounds were investigated by microinjection/dye transfer in SHE cells. The microinjection procedure took 3 min for each dish, and the dye was allowed to transfer to other cells for 5 min. We therefore defined the shortest exposure period as a 5 min exposure. TPA decreased GJIC in SHE cells in a dose-dependent manner during the first hour (Fig. 1a). GJIC was partly normalized after 24 hr of exposure, but was still significantly below control level for 3 nM and higher concentrations.

Recently it was shown that clofibrate and MCP induced a rapid decrease in GJIC in SHE cells, clearly evident at 5-15 min of exposure (Cruciani *et al.*, 1997). The effects subsequently diminished with time (Cruciani *et al.*, 1997). We have here investigated the time-responses on GJIC of MCP, DEHP and MEHP in more detail. MCP showed the strongest inhibition at 5 min of exposure, and GJIC was nearly normalized after 1 hr (Fig. 1b). DEHP inhibited GJIC for all concentrations tested (25-400 μ M) after 5 min of exposure (Fig. 1c). The inhibition rapidly disappeared for 100 μ M or lower concentrations of DEHP. At 1 hr and longer exposures, a statistically significant inhibition was only obtained at 200 and 400 μ M (Fig. 1c). MEHP inhibited GJIC with a potency comparable to DEHP after 5 min of exposure

(Fig. 1*d*), but MEHP showed a more rapid return to the control level. At 1 and 4 hr of exposure, only 400 μ M MEHP caused a prominent decrease in GJIC, and no effect could be detected at 24 hr of exposure (Fig. 1*d*).

The two most likely explanations for the reversibility of GJIC in SHE cells are an acquired resistance to the compounds, or an inactivation of the compounds. Re-exposure regimens were used for a simple evaluation of these possibilities. If the cells acquired resistance to the compounds, addition of fresh compound should not affect GJIC in pre-exposed cells. If the active compound was removed from the medium, the spent medium should not affect GJIC when transferred to previously unexposed cells.

The GJIC level was nearly normalized after 4 hr exposure to clofibrate, MCP, DEHP and MEHP (Table I, procedure A). When the cells were re-exposed to fresh medium with the same compound, GJIC decreased to the same level as found for a standard 5 min exposure (Table I, procedure B, compare with Fig. 1*b-d*). An identical result was obtained when the cells were re-exposed by adding the compound directly to the dish without changing the medium (not shown). Thus, the cells did not become refractory to the compounds, and no metabolite or cellular factor was produced that diminished the GJIC-inhibitory effect of the HPPs. When spent medium (4 hr exposure to MEHP, DEHP or MCP) was transferred to a previously unexposed dish, the GJIC in the new cells was not appreciably affected (Table I, procedure C), indicating that the concentration of the active compound in the spent medium was below the limit of detection. Unexpectedly, spent medium with clofibrate caused a highly significant decrease in GJIC (Table I, procedure C), although the decrease was somewhat less than for freshly added clofibrate (Table I, procedure B). When the spent medium (from a 4 hr exposure) was added to dishes that previously were exposed to clofibrate (250 μ M) for 4 h, GJIC did not change relative to a 4 hr exposure (a GJIC level of 90 ± 2 % compared to unexposed controls, $n=66$).

The removal of the biological activity of the compounds from the medium could be due to inactivation caused by the medium (e.g., by enzymes in the serum) or by uptake (and probably subsequent metabolization) in the cells. The compounds could also migrate into the plastic of the dishes. However, compounds incubated for 4 hr in the medium in plastic containers at room temperature were as active as freshly dissolved compounds (not shown). Thus, the cells are probably the main inactivators of the compounds.

Metabolic cooperation and dye transfer in V79 cells

TPA caused a strong inhibition of metabolic cooperation (Fig. 2a) without any major cytotoxic effects. The maximal inhibition of metabolic cooperation was achieved at 0.8 nM TPA as evidenced by the plateau up to 3.2 nM. Thus, TPA was approximately 100-fold more potent in V79 cells relative to SHE cells (within the confinements of the two systems). The observed potencies are in accordance with previous results in SHE and V79 cells (Husøy *et al.*, 1993). A concentration of 1.6 nM TPA was used as a positive control in experiments where effects of clofibrate, MCP, DEHP and MEHP on metabolic cooperation were investigated. For MCP the strongest inhibition of metabolic cooperation occurred concurrently with cytotoxicity (a relative survival of approx. 50 %, Fig. 2b). DEHP only slightly inhibited metabolic cooperation at 400 μ M (Fig. 2c). Clofibrate (Fig. 2b) and MEHP (Fig. 2c) caused dose-dependent inhibition of metabolic cooperation. Recovery up to 175 % was achieved by 400 μ M clofibrate, concurrently with an apparently cytotoxic response (a relative survival of less than 50 %, Fig. 2b). At first sight, this recovery was much higher than should be expected. However, the cytotoxicity dishes contained only 100 6-TGr cells, while the metabolic cooperation dishes contained 7×10^5 6-TGs cells in addition to 100 6-TGr cells. If V79 cells metabolized and inactivated the compounds similarly to SHE cells, clofibrate could be expected to be more toxic in the cytotoxicity dishes because of their lower capacity for inactivation of clofibrate.

In addition, the generally weak responses to HPPs (except for high concentrations of MEHP and clofibrate) in the V79 metabolic cooperation system, are apparently in contrast to the strong, but transient, responses in SHE cells. The differences in responses between the two systems could partly be explained if there is a minimum period of time that GJIC must be suppressed to affect the outcome of the V79 cell system.

It was therefore investigated if V79 cells showed a similar time-dependent response as did SHE cells during short-term exposures. The microinjection/dye transfer technique was applied on wild type V79 cells. At 5 min of exposure to clofibrate, there was a concentration-dependent decrease in GJIC (dye transfer levels were 76, 57 and 18 % of control at 100, 200 and 400 μ M, respectively). As in SHE cells, there was a time- and dose-dependent normalization of GJIC, and it was back at control level after 24 hr of exposure (Fig. 3). Also the effects of 30 min exposures to DEHP, MEHP and MCP (all at 400 μ M) and TPA (1.6 nM) were studied. MCP caused some rounding-up and detachment of cells, but it had only a weak effect on GJIC (Fig. 3). In contrast, DEHP, MEHP and TPA caused significant inhibition of GJIC

(Fig. 3). DEHP at 200 μ M or lower concentrations did not affect GJIC after 30 min of exposure (not shown). These results are consistent with both that V79 cells can metabolize and inactivate some HPPs, and that GJIC must be suppressed for a certain period of time to affect the outcome of the metabolic cooperation experiments.

Western blotting of Cx43 in SHE cells

Cx43 usually separates into several bands after SDS-PAGE (Husøy *et al.*, 1993). The lower band is the non-phosphorylated (NP) form, and the major upper bands are phosphorylated. In SHE cells, there are two major phosphorylated species of Cx43 migrating above the NP form in addition to some minor forms (Husøy *et al.*, 1993) (Fig. 4a). Following the previously suggested nomenclature (Musil and Goodenough, 1991), the major phosphorylated bands will be called P1 and P2. There was a tendency for P2 to separate into a double band in many of the experiments (Fig. 4a-e).

TPA caused minimal change in the band pattern of Cx43, independent of concentration, exposure time, and the inhibition of GJIC, even at the highest concentration used (300 nM). The most prominent change was a slightly increased intensity of a diffuse band immediately above the Cx43 NP-species during 15 min to 4 hr of exposures (Fig. 4b).

In spite of strongly inhibited GJIC during short exposure periods to clofibrate (not shown), MCP, DEHP and MEHP, there were no reproducible changes in Cx43 band pattern in exposure periods between 5 min and 24 hr (Fig. 4c-e). There were also no reproducible changes in the amount of Cx43 protein.

Western blotting of Cx43 in V79 cells

V79 6-TGs and 6-TGr cells had similar Cx43 band patterns in Western blots (not shown). In the following we show the results only for 6-TGs cells, but 6-TGr cells gave essentially identical results. In general, V79 cells showed a pattern of four major Cx43 species (Fig. 5a), the lower one corresponding to the NP form of Cx43. For simplicity we will arbitrarily call the phosphorylated forms of Cx43 in V79 cells for V79-P', V79-P1 and V79-P2. A band above V79-P2 can sometimes be seen. This band will be called V79-HP (highly phosphorylated). The exact identities (number of phosphates, positions in the sequence) of the different phosphorylated forms of Cx43 are not known in any tissue or cell type. We therefore underline that the present nomenclature do not imply that any of the phosphorylated SHE cell Cx43

forms are identical to any of the phosphorylated V79 cell Cx43 forms. The V79 Cx43 band pattern varied with time within the experiment (Fig. 5a), probably due to the change of medium at the start of the exposure periods. In all experiments the V79-NP form increased in intensity at 4 to 72 hr after change of medium (change of medium/exposure was done 24 hr after seeding), apparently at the expense of the V79-P2 form (Fig. 5a). Thus, minor effects of the compounds on the band pattern may remain concealed.

TPA strongly affected the Cx43 phosphorylation status in V79 cells. At the lower concentration of TPA (0.8 nM), V79-P2 increased in intensity after 1 h, and the V79-HP became more intense (not shown). The V79-HP form was even more evident at 4 hr of exposure to 0.8 nM TPA. The pattern was partially normalized after 24 hr of exposure (not shown). The changes were more pronounced and started earlier for the intermediate (1.6 nM) and high (3.2 nM) concentration of TPA (Fig. 5b).

Clofibrate, MCP, DEHP and MEHP caused only small changes in Cx43 band pattern in the period up to 4 h. At longer exposure periods, the higher concentrations of DEHP (Fig. 5c) and MCP (Fig. 5e) increased the tendency of the control to have higher levels of the NP-form. For clofibrate (not shown) and MEHP (Fig. 5d), this tendency was generally less pronounced, although it could be seen in some experiments. None of the compounds caused any reproducible changes in the amount of Cx43 protein relative to the control.

Immunofluorescence

SHE cells contained a large number of Cx43-positive spots, but few of them were located at typical cell-cell borders (Fig. 6a). Many spots could be seen in single cells without or with minimal contact with neighboring cells, and as determined by focusing many of them were clearly intracellular (not shown). In the large senescing cells, overlapping cells easily can be detected. The majority of Cx43-positive spots in the senescing cells were observed outside the overlapping areas (not shown). These observations indicated that the many, and perhaps the majority, of the Cx43-positive spots were intracellular and not due to gap junctions between overlapping cells. In many cells also a diffuse and weak perinuclear fluorescence could be seen. The pattern of Cx43 immunofluorescence in SHE cells is similar to that shown in the SHE cell line BPNi (Rivedal *et al.*, 1994). The deviating pattern of Cx43 immunofluorescence in these cells was not due to the anti-Cx43 antiserum, as the same antiserum gave more typical gap junction pattern in other cell types (Kenne *et al.*, 1994). After 5 min of exposure to 150 nM

TPA, there were no changes in Cx43 fluorescence in SHE cells (not shown), but at 1 and 4 hr (Fig. 6b) the Cx43 immunofluorescence had largely disappeared. After 24 hr exposure to TPA there was a weak return of Cx43 immunofluorescence (not shown). MEHP (400 μ M), DEHP (400 μ M), clofibrate (250 μ M) and MCP (250 μ M) had no detectable effects on Cx43 immunofluorescence at 5 min (not shown). The three latter compounds minimally affected the Cx43 immunofluorescence also after 4 and 24 hr of exposure as exemplified by MCP (Fig. 6c). Unexpectedly, MEHP caused a TPA-like effect on Cx43 immunofluorescence at 4 hr (Fig. 6d), which was still evident at 24 hr (Fig. 6e).

Also V79 cells showed a small number of the typical gap junction structures at the cell borders (Fig. 7a). In contrast to SHE cells, there were few intracellular spots of Cx43 in V79 cells (Fig. 7a). Similar to the effects in SHE cells, TPA (not shown) and MEHP (Fig. 7b) caused a disappearance of Cx43 in V79 cells. DEHP (400 μ M), MCP (250 μ M) and clofibrate (250 μ M) minimally affected the Cx43 immunofluorescence in V79 cells (not shown).

DISCUSSION

Phosphorylation of connexins is believed to be one of the major regulatory mechanisms of GJIC. Gating properties of gap junction channels might be altered by phosphorylation (Moreno *et al.*, 1992). The PKC activator, TPA, causes strong changes in the band pattern of Cx43 in several cell types concurrently with decreased GJIC (Oh *et al.*, 1991; Kenne *et al.*, 1994). The short-term decrease in GJIC caused by TPA has therefore been related to a direct phosphorylation of Cx43. However, this is a too simplistic hypothesis. In some cells, including SHE cells, TPA causes only minor changes in the Cx43 band pattern under conditions that drastically reduce GJIC (present results and Rivedal *et al.*, 1994; Husøy *et al.*, 1993; Asamoto *et al.*, 1991). Furthermore, the TPA-induced inhibition of GJIC in SHE cells needs 30-60 min to reach the maximum (present results), while GJIC in WB-F344 rat liver epithelial cells is fully suppressed after 5 min of exposure to TPA (Oh *et al.*, 1991).

The differences in the responses of V79 and SHE cells to TPA are intriguing. SHE cells are approximately 100-fold less sensitive than V79 to TPA, and prominent changes in Cx43 phosphorylation are only found in V79 cells. V79 cells and SHE cells show different patterns of Cx43 phosphorylation in untreated cells. This probably indicates that Cx43 is differentially phosphorylated. One possibility is that Cx43 in SHE cells normally is phosphorylated on some of the serine residues that become phosphorylated in V79 cells in response to TPA. It is also

possible that certain changes in the phosphorylation pattern of Cx43 will not change the migration pattern in SDS-PAGE. In addition, different constitutions of protein kinase C isoenzymes could contribute to differential phosphorylation. The PKC isoenzyme constitution is presently under investigation (T. Husøy, S.-O. Mikalsen and T. Sanner, in prep.).

On the other hand, major alterations in the Cx43 band pattern can in certain cases be induced without any decrease in GJIC (Mikalsen and Kaalhus, 1997). Thus, phosphorylation of Cx43 is not the only critical mechanism for determination of GJIC in Cx43-containing cells. It was recently suggested that accessory proteins could account for a part of the dissociation between Cx43 phosphorylation and GJIC (Mikalsen and Kaalhus, 1997). Cx43 residues 253-286 contain sequences that conform to SH3, SH2 and possibly to WW domain binding sequences (Mikalsen and Kaalhus, 1997). We note here that the Cx43 sequence 370-375 (RASSRP) conforms well to the 14-3-3 protein family binding sequence, $RX_{2-3}SXP$ (Aitken, 1996). P may not be essential, S may or may not be phosphorylated, and X_1 may or may not be S (Aitken, 1996). Thus, under less stringent assumptions, the Cx43 C-terminal tail sequence (362)RPSSRASSRASSRP(375) could contain up to three potential 14-3-3 binding positions. We note that several connexins (Cx37, Cx40, Cx43.4 (fish), Cx44, Cx45.6 (chicken), Cx46, Cx50, Cx56 (chicken)) have similar sequences in their C-terminal tail, although R has been substituted with K in some of them. PKC often interacts with 14-3-3 proteins. Both PKC and 14-3-3 proteins are families with multiple isoforms, and it is possible that certain combinations of these proteins inhibit PKC (Robinson *et al.*, 1994), and other combinations stimulate PKC (Morgan and Burgoyne, 1992). Thus, several scenarios can be envisioned depending on the isoforms of the proteins ranging from GJIC-inhibitory and Cx43 phosphorylating complexes, to totally inactive complexes. Indeed, it could be the complex itself, and not the phosphorylation, that causes the blockage of the channel. In the extreme case, Cx43 may act as a fortuitous substrate, and the important substrates are other cell membrane proteins, e.g., cadherin/catenin.

Some HPPs have previously been studied in GJIC systems. In most studies, the HPPs appear to inhibit GJIC (partly overviewed in Dybing *et al.*, 1995). There are a few studies that involve time-responses of HPPs on GJIC (Krutovskikh *et al.*, 1995; Jansen and Jongen, 1996; Mikalsen and Sanner, 1993), but the rapid and transient effect on GJIC has only been recently revealed (Cruciani *et al.*, 1997). The present results show that the cells do not become refractory to the compounds, but the cells apparently metabolize and (with the exception of clofibrate) inactivate the compounds. The situation for clofibrate is more complex. In contrast to

the three other compounds, the spent medium (initially added clofibrate) caused a decrease in previously unexposed cells, but not when the spent medium was transferred to clofibrate pre-treated cells. We therefore suggest that the spent medium contained a metabolite of clofibrate, possibly clofibric acid. This metabolite may initially affect GJIC in SHE cells, but the cells acquire resistance to the metabolite.

As suggested by the results in Fig. 3, GJIC may need to be suppressed for a certain period of time to affect the outcome of the metabolic cooperation experiments. In a modified V79 cell metabolic cooperation system without depression of GJIC, 6-TG needs to be present for 8-16 hr to achieve its full cytotoxic response (Vřtek, 1996). Using TPA (0.162 μ M), Dorman and Boreiko (1983) found that 1 hr application was sufficient to achieve the same recovery as after 72 hr continuous exposure to TPA. Since the V79 cell Cx43 band pattern is not normalized within 4 hr after removal of TPA (Husøy *et al.*, 1993), we may assume that GJIC in V79 cells is suppressed for a number of hours after TPA-exposure. In SHE cells, GJIC recovers from the inhibition after removal of TPA during a period of 3-10 hr (Husøy *et al.*, 1993). However, it cannot be dismissed that the length of this period is dependent on the compound studied. E.g., aldrin must be present most of the 72 hr expression period to achieve a maximal response in the V79 metabolic cooperation assay (Jone *et al.*, 1985). We note that similar methodological problems extend to GJIC as measured by flow cytometry (Tomasetto *et al.*, 1993).

HPPs are assumed to cause oxidative stress due to the peroxisome proliferation (for refs., see Ashby *et al.*, 1994), but oxidative stress is probably not involved in the short-term decrease of GJIC induced by HPPs (Cruciani *et al.*, 1997). In the present work, some alternative possibilities were investigated. The rapid onset of decreased GJIC could indicate that changes in channel gating by phosphorylation or gap junction structure and Cx43 localization are involved, but not decreased gene expression or protein synthesis. We approached the former possibility by Western blotting of Cx43, and the latter by immunofluorescence experiments. However, neither SHE nor V79 cells show any changes in the Cx43 band pattern that could be correlated to decreased GJIC after HPP-exposure. We note that also other compounds may inhibit GJIC apparently without affecting the phosphorylation status of Cx43 (Hii *et al.*, 1995). A high lipophilicity seems as a common feature of such compounds. The HPPs' lipophilicity and their propensity to increase the intracellular concentration of Ca^{2+} were previ-

ously discussed as alternative mechanisms of HPP-induced decrease in GJIC (Cruciani *et al.*, 1997).

Immunofluorescence experiments indicate that there are few visible gap junctions at the cell-cell borders in both SHE and V79 cells. The low number of typical gap junction structures is in contrast to several other cell types, also when they were probed with the present antiserum (Kenne *et al.*, 1994; Rivedal *et al.*, 1994). In addition, there are numerous intracellular spots with a bright Cx43 fluorescence in SHE cells. The function of these spots is not known. The two most apparent alternatives are transport vesicles of Cx43 on their way to the cell membrane, or internalized gap junctions destined for breakdown. The low number of cell-cell border gap junctions appears consistent with the relatively low level of GJIC in V79 cells when studied by microinjection/dye transfer. Furthermore, under other culture conditions, the average individual gap junction area is $0.1 \mu\text{m}^2$ in V79 cells, and the total gap junction area constitutes only 0.2 % of the cell-cell contact areas (Yancey *et al.*, 1982). In contrast, SHE cells have a relatively high level of GJIC in spite of the few visible gap junctions localized to the cell membrane. The gap junction plaque size has not been studied in SHE cells by freeze fracture and electron microscopy. However, small gap junctional plaques ($<0.1 \mu\text{m}$) which can be numerous, are not visible by immunofluorescence microscopy (Green *et al.*, 1993). Theoretical calculations show that small and dispersed gap junctions are up to one order of magnitude more efficient than large gap junctions in performing communication between adjacent cells (Chen and Meng, 1995). The low level of immunohistochemically visible gap junctions at the cell borders may therefore be consistent with the high level of GJIC in SHE cells. In addition, the presence of other connexins participating in GJIC in SHE and V79 cells may partly explain the discrepancy between effects of the compounds on GJIC, Cx43 phosphorylation status and cellular localization. However, Cx32 or Cx26 is not present in SHE cells (Rivedal *et al.*, 1994; Isfort *et al.*, 1992). Cultured cell lines have a strong tendency to express Cx43, even if the cells did not originally express Cx43, and few cell lines express detectable amounts of other connexins (Yamasaki and Naus, 1996). We therefore believe that V79 cells may only express Cx43.

As observed previously (Rivedal *et al.*, 1994; Asamoto *et al.*, 1991), TPA causes a disappearance of Cx43 immunofluorescence. For SHE cells, the disappearance is evident both for the Cx43 in the few typical gap junction plaques and for most of the Cx43 located in intracellular spots. Several explanations can be offered for the TPA-induced decrease in Cx43 immunofluorescence, including dispersal of the proteins in the membrane (Asamoto *et al.*, 1991), in-

creased proteolytic breakdown of the proteins (Oh *et al.*, 1991), or altered conformation of the protein (Asamoto *et al.*, 1991). The first suggestion is not likely to explain the decrease of the intracellular spots if these are located in small vesicles. The second explanation can be rejected since there is no decrease in the amount of Cx43 protein in Western blots at 4 hr exposures. The third explanation can well be combined with our suggestion of a complex formation between Cx43 and different types of binding proteins. Binding of accessory protein may both physically cover the antibody recognition sites (as may be the situation if the Cx43 sequence 362-375 binds 14-3-3 proteins) and induce altered conformation of Cx43.

Short exposures to HPPs did not affect the pattern of Cx43 fluorescence in spite of the strong effect on GJIC. However, MEHP, but not DEHP, showed a TPA-like effect on Cx43 immunofluorescence in both SHE and V79 cells after 4 and 24 hr exposures. MEHP is the primary metabolite of DEHP (Albro, 1986), and it is assumed that the metabolites of DEHP, rather than DEHP itself, are the biologically active compounds (Albro, 1986). Several other compounds that decrease GJIC may have a similar TPA-like effect on Cx43 immunofluorescence without decreasing the amount of Cx43 in the cells (Kenne *et al.*, 1994; Rivedal *et al.*, 1994). It is unexpected that MEHP causes such an effect when GJIC is partially (4 hr) or fully normalized (24 hr) in SHE cells. To the best of our knowledge, such a dissociation has not been shown before. Again, this might point to the possibility of inhibitory and non-inhibitory complexes with Cx43, and/or that other connexins participate in GJIC in the present systems. HPPs are supposed to act through the peroxisome proliferator activated receptor. Since the two more potent HPPs, clofibrate and MCP, do not give a similar effect as MEHP, the peroxisome proliferator activated receptor is probably not involved in the TPA-like effect of MEHP in the immunofluorescence experiments. Other factors may therefore be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ms. Claudine Rast is gratefully acknowledged for assistance with the cell cultures. Dr. E. Rivedal is thanked for making the anti Cx43 antiserum available to us. This work has been partly supported by grants from the Blix Family's Fund for the Advance of Medical Science (to S.-O.M.) and the Anders Jahre Foundation (to S.-O.M. and T.S.). Owing to editorial policy, the number of references are limited.

REFERENCES

- AITKEN, A., 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol.*, **6**, 341-347 (1996).
- ALBRO, P.W., Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl)phthalate by rats and mice. *Environ. Health Perspect.*, **65**, 293-298 (1986).
- ASAMOTO, M., OYAMADA, M., EL AOUMARI, A., GROS, D. and YAMASAKI, H., Molecular mechanisms of TPA-mediated inhibition of gap-junctional intercellular communication: evidence for action on the assembly or function but not the expression of connexin 43 in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, **4**, 322-327 (1991).
- ASHBY, J., BRADY, A., ELCOMBE, C.R., ELLIOTT, B.M., ISHMAEL, J., ODUM, J., TUGWOOD, J.D., KETTLE, S. and PURCHASE, I.F., Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. exp. Toxicol.*, **13**, S1-S117 (1994).
- CHEN, L. and MENG, M.Q., Compact and scattered gap junctions in diffusion mediated cell-cell communication. *J. theor. Biol.*, **176**, 39-45 (1995).
- CRUCIANI, V., RAST, C., DURAND, M.-J., NGUYEN-BA, G. and VASSEUR, P., Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Carcinogenesis*, **18**, 701-704 (1997).
- DORMAN, B.H. and BOREIKO, C.J., Limiting factors of the V79 metabolic cooperation assay for tumor promoters. *Carcinogenesis*, **4**, 873-877 (1983).
- DYBING, E., MIKALSEN, S.-O., HUTTUNEN, J.K. and SANNER, T., Peroxisome proliferation, genotoxicity and carcinogenicity. *IARC Technical Report*, **24**, 55-85 (1995).
- FLAGG-NEWTON, J.L., DAHL, G. and LOEWENSTEIN, W.R., Cell junction and cyclic

AMP: 1. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor. *J. membr. Biol.*, **63**, 105-121 (1981).

GREEN, C.R., PETERS, N.S., GOURDIE, R.G., ROTHERY, S. and SEVERS, N.J., Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J. histochem. Cytochem.*, **41**, 1339-1349 (1993).

HIL, C.S.T., FERRANTE, A., SCHMIDT, S., RATHJEN, D.A., ROBINSON, B.S., POULOS, A. and MURRAY, A.W., Inhibition of gap junctional communication by polyunsaturated fatty acids in WB cells: evidence that connexin 43 is not hyperphosphorylated. *Carcinogenesis*, **16**, 1505-1511 (1995).

HUSØY, T., MIKALSEN, S.-O. and SANNER, T., Phosphatase inhibitors, gap junctional intercellular communication and [125 I]-EGF binding in hamster fibroblasts. *Carcinogenesis*, **14**, 2257-2265 (1993).

ISFORT, R.J., CODY, D.B., ASQUITH, T.N. and LEBOEUF, R.A., Phenotypic differences between Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.7 or 7.3. *In Vitro Cell dev. Biol.*, **28A**, 635-642 (1992).

JANSEN, L.A.M. and JONGEN, W.M.F., The use of initiated cells as a test system for the detection of inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, **17**, 333-339 (1996).

JONE, C., TROSKO, J.E., AYLSWORTH, C.F., PARKER, L. and CHANG, C.C., Further characterization of the *in vitro* assay for inhibitors of metabolic cooperation in the Chinese hamster V79 cell line. *Carcinogenesis*, **6**, 361-366 (1985).

KENNE, K., FRANSSON-STEEN, R., HONKASALO, S. and WÄRNGÅRD, L., Two inhibitors of gap junctional intercellular communication, TPA and endosulfan: different effects on

phosphorylation of connexin 43 in the rat liver epithelial cell line, IAR 20. *Carcinogenesis*, **15**, 1161-1165 (1994).

KRUTOVSKIKH, V.A., MESNIL, M., MAZZOLENI, G. and YAMASAKI, H., Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *Lab. Invest.*, **72**, 571-577 (1995).

MEHTA, P.P., YAMAMOTO, M. and ROSE, B., Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol. biol. Cell*, **3**, 839-850 (1992).

MIKALSEN, S.-O. and KAALHUS, O., A characterization of permolybdate and its effect on cellular tyrosine phosphorylation, gap junctional intercellular communication and phosphorylation status of the gap junction protein, connexin43. *Biochim. biophys. Acta*, in press (1997).

MIKALSEN, S.-O. and SANNER, T., Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis*, **14**, 251-257 (1993).

MORENO, A.P., FISHMAN, G.I. and SPRAY, D.C., Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels. *Biophys. J.*, **62**, 51-53 (1992).

MORGAN, A. and BURGOYNE, R.D., Interaction between protein kinase C and Exo1 (14-3-3 protein) and its relevance to exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.*, **286**, 807-811 (1992).

MUSIL, L.S., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G.M. and GOODENOUGH, D.A., Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.*, **111**, 2077-2088 (1990).

MUSIL, L.S. and GOODENOUGH, D.A., Biochemical analysis of connexin43 intracellular

transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.*, **115**, 1357-1374 (1991).

OH, S.Y., GRUPEN, C.G. and MURRAY, A.W., Phorbol ester induces phosphorylation and down-regulation of connexin 43 in WB cells. *Biochim. biophys. Acta*, **1094**, 243-245 (1991).

RIVEDAL, E., YAMASAKI, H. and SANNER, T., Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis*, **15**, 689-694 (1994).

ROBINSON, K., JONES, D., PATEL, Y., MARTIN, H., MADRAZO, J., MARTIN, S., HOWELL, S., ELMORE, M., FINNEN, M.J. and AITKEN, A., Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A₂ activity. *Biochem. J.*, **299**, 853-861 (1994).

TOMASETTO, C., NEVEU, M.J., DALEY, J., HORAN, P.K. and SAGER, R., Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol.*, **122**, 157-167 (1993).

VÍTEK, J.A., The behavior of cells during the evaluation of gap junctional intercellular communication by metabolic cooperation assay. *Neoplasma*, **43**, 119-123 (1996).

YAMASAKI, H. and NAUS, C.C., Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis*, **17**, 1199-1213 (1996).

YANCEY, S.B., EDENS, J.E., TROSKO, J.E., CHANG, C.-C. and REVEL, J.-P., Decreased incidence of gap junctions between Chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Exp. Cell Res.*, **139**, 329-340 (1982).

TABLE I - EFFECT ON GJIC IN SHE CELLS BY RE-EXPOSURE REGIMENS.

Exposure	GJIC (% of control)		
	Procedure A (4 hr exp.)	Procedure B (4 hr + 5 min exp.)	Procedure C (5 min exp. to spent medium)
Clofibrate (250 μ M)	83$\pm$3 (57)	16$\pm$2 (60)¹	34$\pm$2 (62)²
MEHP (200 μ M)	104$\pm$3 (68)	52$\pm$2 (65)¹	96$\pm$3 (53)³
DEHP (100 μ M)	102$\pm$2 (70)	48$\pm$2 (75)¹	95$\pm$3 (70)³
MCP (250 μ M)	97$\pm$3 (68)	46$\pm$2 (76)¹	95$\pm$3 (66)³

¹ p<0.001 vs. procedure A.

² p<0.001 vs. procedures A and B.

³ p=n.s. vs. procedure A, p<0.001 vs. procedure B.

The data are shown as mean $\pm$ SEM (*n*). The percentages shown are calculated on the basis of procedure-matched unexposed controls: Procedure A, 40.7 $\pm$ 1.1 dye-containing cells, *n*=78; Procedure B, 41.8 $\pm$ 1.1 dye-containing cells, *n*=79; Procedure C, 40.7 $\pm$ 0.7 dye-containing cells, *n*=81.

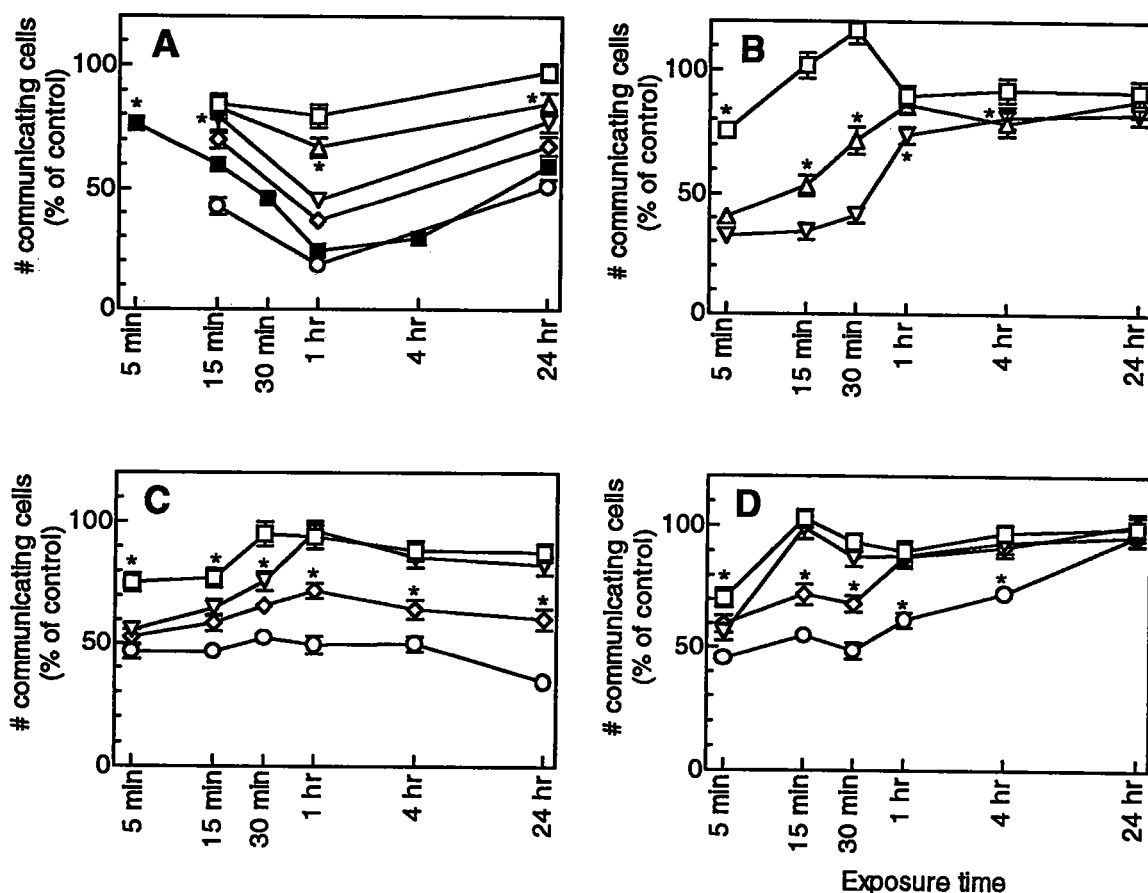


FIGURE 1- Inhibition of GJIC in SHE cells by TPA and HPPs. GJIC was assessed by the microinjection/dye transfer method after the indicated exposure periods. (a) TPA was added to SHE cells in concentrations of (□) 1 nM, (Δ) 3 nM, (▽) 10 nM, (◇) 37.5 nM, (■) 150 nM and (○) 300 nM. $n=35-54$ for 1, 3, 10, 37.5 and 300 nM TPA. $n=92-158$ for 150 nM TPA which were run in separate experiments with separate time-matched controls. (b) MCP was added to SHE cells at concentrations of (□) 25 μ M, (Δ) 150 μ M and (▽) 250 μ M ($n=30-61$). (c) DEHP was added to SHE cells in concentrations of (□) 25 μ M, (▽) 100 μ M, (◇) 200 μ M and (○) 400 μ M ($n=40-62$). Not shown is the curve for 50 μ M DEHP which behaved similarly to 25 μ M DEHP. (d) MEHP was added to SHE cells in concentrations of (□) 25 μ M, (▽) 100 μ M, (◇) 200 μ M and (○) 400 μ M ($n=41-71$). For each point of time, only the lowest concentration that achieved statistical significance is marked (*, $p<0.01$). The number of communicating cells varied between 35.3 ± 0.7 to 40.6 ± 1.0 (mean $\pm$ SEM, $n=50-181$) in the controls.

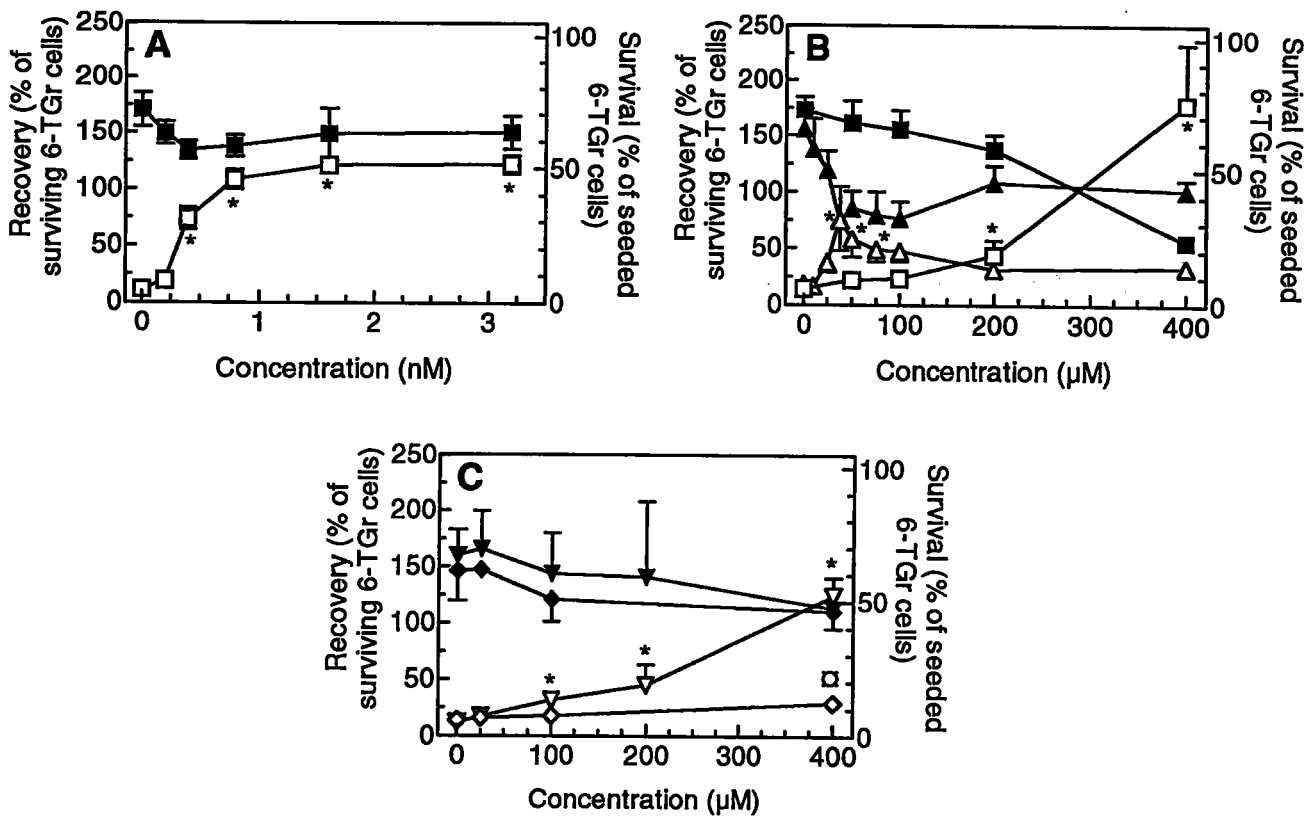


FIGURE 2 - Inhibition of metabolic cooperation in V79 cells by TPA and HPPs. V79 cells were exposed to (a) (■, □) TPA, (b) (■, □) clofibrate or (▲, △)MCP, and (c) (◆, ◇) DEHP or (▼, ▽) MEHP. The inhibition of metabolic cooperation was measured as the increase in recovery of V79 6-TGr cells coincubated with 6-TGs cells (open symbols), and the survival was measured as the number of colonies of V79 6-TGr cells in dishes without 6-TGs cells (closed symbols). The data are shown as mean±SEM with $n=70$ dishes for 1.6 nM TPA, $n=18-20$ dishes for the other concentrations of TPA; $n=29-40$ dishes for clofibrate; $n=20$ dishes for 200 and 400 μM MCP, $n=29-59$ dishes for the other concentrations of MCP; $n=18-29$ dishes for DEHP; and $n=20-30$ dishes for MEHP. $\square$, $p<0.05$; *, $p<0.01$.

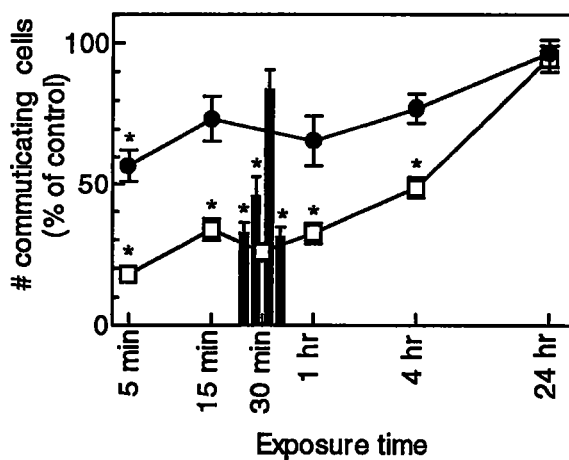


FIGURE 3 - Inhibition of dye transfer in V79 cells by TPA and HPPs. The response to (●) 200 μ M or (□) 400 μ M clofibrate was followed over periods from 5 min to 24 hr ($n=29-60$). The four bars at 30 min show the effect of 30 min exposures to (from left to right) DEHP (400 μ M, $n=17$), MEHP (400 μ M, $n=19$), MCP (400 μ M, $n=21$) and TPA (1.6 nM, $n=19$). MCP showed some toxicity as some cells rounded up and detached. Control levels varied between 9.8 ± 0.95 (mean $\pm$ SEM) to 12.3 ± 0.81 dye-containing cells/injection with $n=11$ for 1 h, $n=32-51$ for the other points of time. *, $p < 0.01$.

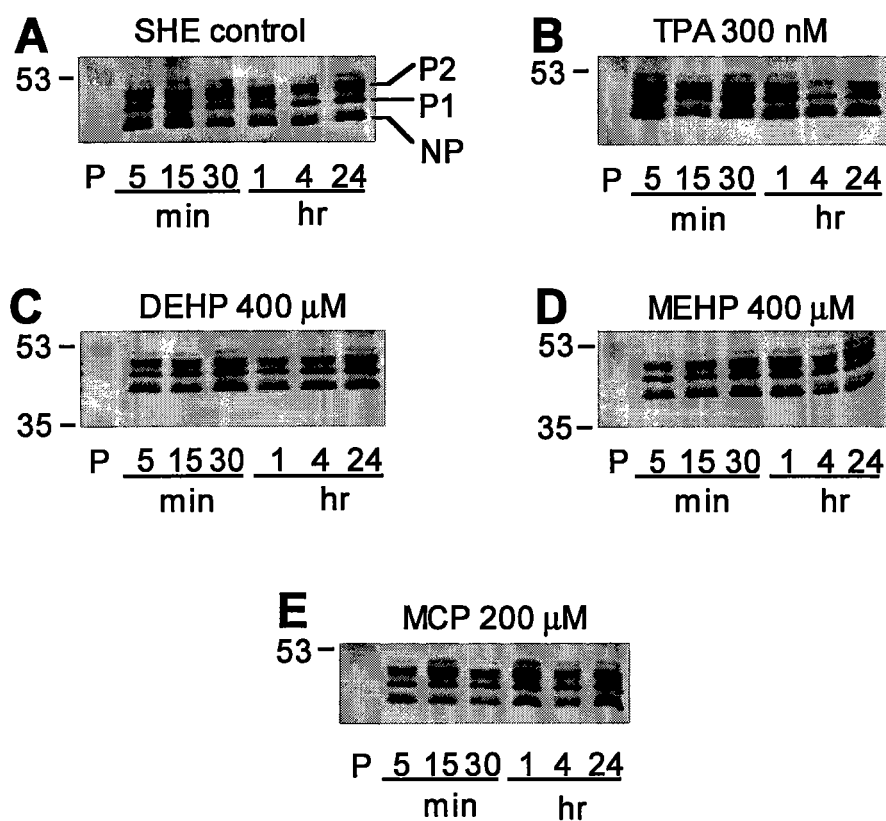


FIGURE 4 - Western blotting of Cx43 from SHE cells. Time-dependent changes in Cx43 band pattern in (a) control cells, or cells exposed to (b) 300 nM TPA, (c) 400 μ M DEHP, (d) 400 μ M MEHP, or (e) 200 μ M MCP. Samples were made at the indicated exposure times, and analyzed by Western blotting as described in Materials and Methods.

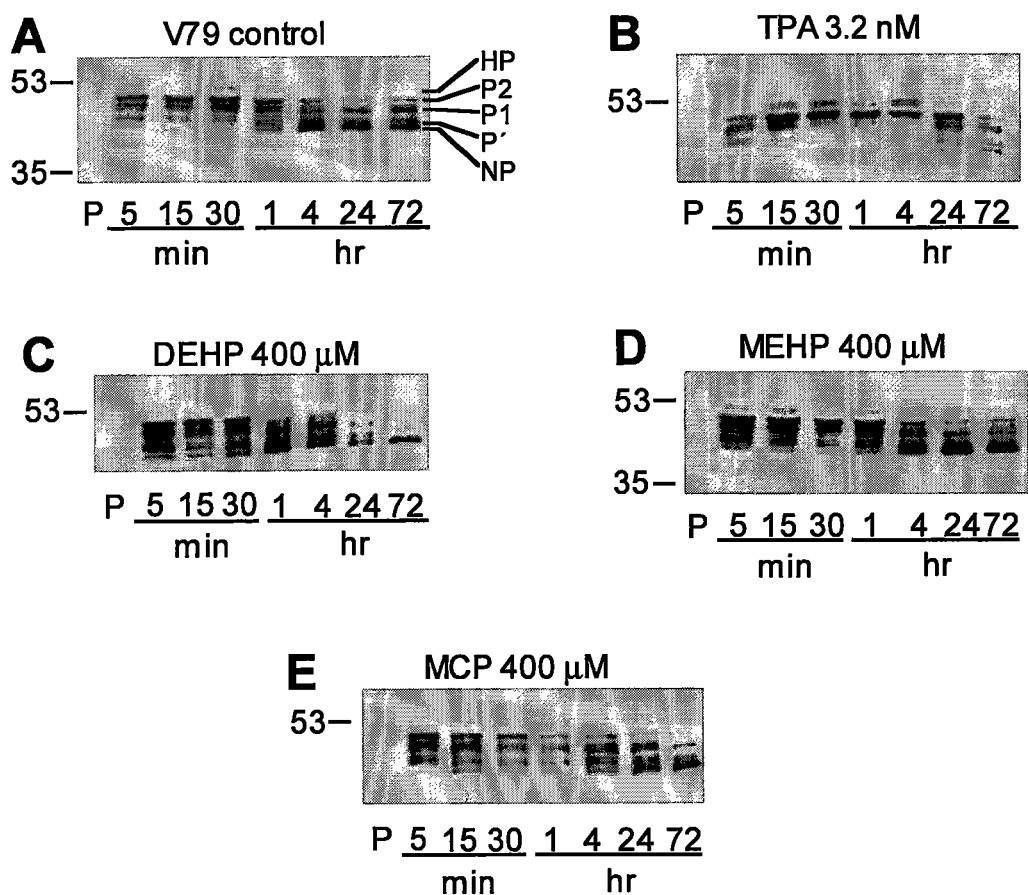
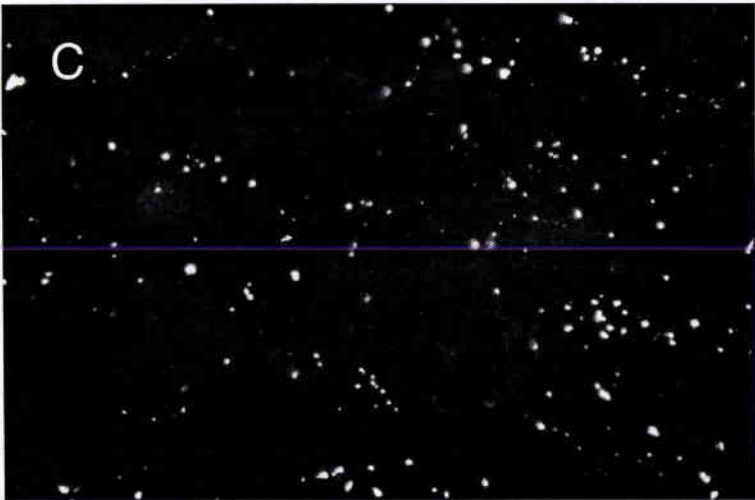
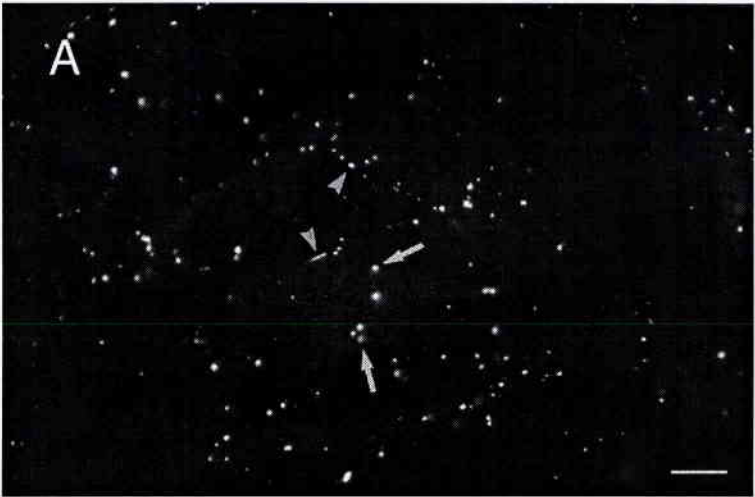


FIGURE 5 - Western blotting of Cx43 from V79 wild type cells. Time-dependent changes in Cx43 band pattern in (a) control cells, or cells exposed to (b) 3.2 nM TPA, (c) 400 μ M DEHP, (d) 400 μ M MEHP, or (e) 400 μ M MCP. Samples were made at the indicated exposure times, and analyzed by Western blotting as described in Materials and Methods.



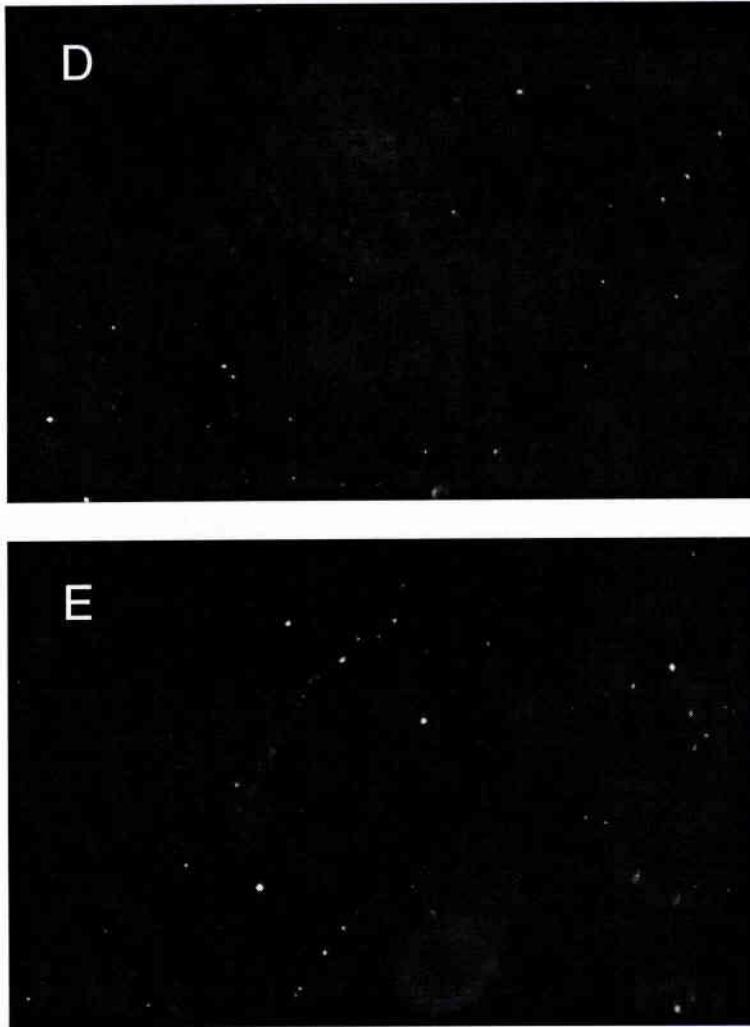


FIGURE 6 - Immunostaining of Cx43 in SHE cells. (*a*) Control. Examples of Cx43-positive gap junction plaques at the cell-cell borders are marked with arrowheads, and intracellular Cx43-positive spots are marked with arrows. The scale bar indicating 50 μm are applicable to all micrographs in Figs. 6 and 7. (*b*) Cells were exposed to 150 nM TPA for 4 hr. Note that the number of Cx43-positive spots have decreased relative to the control. (*c*) Cells were exposed to 250 μM MCP for 4 hr. The distribution and number of Cx43-positive spots are similar to the control cells. (*d*) Cells were exposed to 400 μM MEHP for 4 hr. The number of Cx43-positive spots has strongly decreased. (*e*) 400 μM MEHP for 24 hr. The number of Cx43-positive spots is still very low.

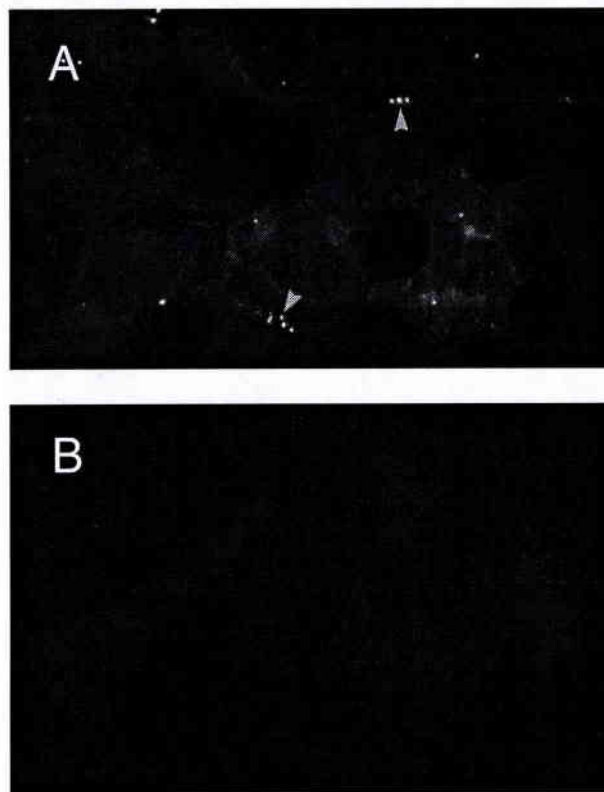


FIGURE 7 - Immunostaining of Cx43 in V79 wild type cells. (*a*) Control. A few Cx43-positive gap junction plaques are seen at the cell-cell borders (arrowheads). (*b*) Cells were exposed to 400 μ M MEHP for 4 hr. Note the near complete lack of Cx43-positive areas.

Publication 4 : “In vitro assays for detection of non genotoxic carcinogens.”

Durand *et al.*, dans : Wells P.G., Lee N. and Blaise C. (eds) “Microscale Aquatic Toxicology: Advance Techniques and Practice”. CRC Press Publishers, Florida, sous presse.

IN VITRO ASSAYS FOR DETECTION OF NON GENOTOXIC CARCINOGENS

M. J. DURAND¹, V. CRUCIANI¹, S. ALEXANDRE¹, J. C. HOFLACK¹, H. BESSI², C. BLAISE³ and P. VASSEUR¹

¹ Centre des Sciences de l'Environnement, BP 94025. F- 57040 Metz Cedex.

² Faculté des Sciences et Techniques , BP 146, 20650 Mohammedia-Maroc.

³ Centre Saint-Laurent, Environment Canada, 105 rue McGill, Montréal, QUE., Canada, H2Y 2E7.

Table of Contents

I. INTRODUCTION

II. GENOTOXIC AND NON GENOTOXIC CARCINOGENS

III. *IN VITRO* CELL TRANSFORMATION ASSAY

IV. ROLE OF GAP JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION FOR THE DETECTION OF NON GENOTOXIC CARCINOGENS

V. IMPACT OF EPIGENETIC CARCINOGENS ON POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE

VI. CONCLUSION

VII. REFERENCES

I. INTRODUCTION

Cancer is not specific to humans and may also affect wildlife. A number of isolated as well as epizootic neoplasms have been reported since the mid-20th century in aquatic populations. The first case of liver cancer in wild fish populations, where pollution was suspected as a possible etiological factor, was noticed in white suckers in Maryland¹. Later studies confirmed that liver tumours appeared to be associated with pollution more than any other tumour type in flatfish,²⁻⁵ though skin neoplasms besides epidermal lesions have also been described.⁶⁻⁸ Polycyclic aromatic hydrocarbons could be identified as partly responsible for the increase in neoplasm prevalence in fish living in contaminated areas.⁹ However, correlations between exposure to known genotoxic pollutants and prevalence of cancer in aquatic species was poor. It was thus suggested that a number of unidentified chemical factors acting as carcinogens, cocarcinogens or tumour promoters could be involved in the disease.¹⁰ These chemical substances can be anthropogenic contaminants, but may also have a natural origin. Some strong tumour promoters, such as okadaic acid produced by sponges, can be found among other aquatic toxins of fungi, blue green algae and dinoflagellates. Little attention has been paid up to now to non-genotoxic carcinogens, compared to the genotoxic ones. Yet, their relation to cancer may be important and certainly deserves to be taken into account.

A few models based on the use of mammalian cells have been developed to screen non genotoxic carcinogens. These mammalian models still need to be standardized and are not yet currently applied in toxicity screening. However, it should be emphasized that *in vitro* screening for aquatic toxicity could benefit from the experience gained in working with mammalian cells. This could then be useful for developing cellular models derived from aquatic species.

In the following chapter, we shall focus on mechanisms of carcinogenesis from which arose *in vitro* mammalian assays to detect carcinogens, especially the non genotoxic ones. As an introduction to these methods, it seems logical to recall the basic concepts of carcinogenesis and the problems posed by non-genotoxic carcinogens.

II. GENOTOXIC AND NON GENOTOXIC CARCINOGENS

At present, the assessment of the biological risk due to environmental chemical carcinogenesis is based largely on short term genotoxicity assays using prokaryotic and eukaryotic cells. While this approach is useful, it can only detect genotoxic chemicals. Since nearly 40% of carcinogens are non genotoxic (epigenetic carcinogens) according to the US National Toxicology Program, they will escape the *in vitro* screening currently applied. For such chemicals, carcinogenicity can only be detected by means of long term animal experiments or epidemiological studies.

Unfortunately, the use of animal experiments is time consuming and costly, and thus cannot be applied to all chemicals and to environmental contaminants. There is an urgent need, therefore, to develop and to validate *in vitro* assays for the detection of non genotoxic carcinogens in order to complete the battery of short term bioassays for carcinogenicity.

Carcinogenesis is a multistage process resulting from complex interactions of genetic and epigenetic factors (figure 1). At the moment, there is a consensus to classify carcinogens in two groups:

(i) genotoxic carcinogens including mutagens, which may react with DNA and irreversibly alter the genome. They are capable of initiating cells and are named initiators. Initiators involve chemicals, radiations (UV, X Rays, etc.), as well as viruses causing genetic damage. The initiated cells have a decreased responsiveness to inter and intracellular signals that maintain normal tissue homeostasis. Initiated cells may be less responsive to negative growth factors, to inducers of terminal cell differentiation and/or programmed cell death.¹¹ DNA damage able to alter protooncogenes and/or tumor suppressor genes expression enhances the probability for initiated cells to convert to malignancy. Progression to malignancy can also be increased when the genes involved in the control of cell cycle and mitosis are mutated.

(ii) non genotoxic carcinogens, which may alter the proliferation and the differentiation patterns in cells.¹² They may perturb DNA repair systems leading to a fixation of DNA lesions,¹³ thus increasing the survival of initiated cells. Cellular targets which lead to a disturbance of these processes are multiple and involve mechanisms such as:

- interference on transduction signals which control normal cell growth and differentiation,
- activation of protein kinase C and inhibition of protein phosphatases,
- activation of the metabolism of polyamines (activating ornithine decarboxylase, the rate limiting enzyme of the synthesis of polyamines which are directly linked to cell proliferation),¹⁴
- increase in the production of free radicals,
- structural and functional alterations of cytoplasmic membranes and disturbances of intercellular communications,
- inhibition of mechanisms involved in apoptosis,¹⁵
- modification of the DNA methylation profile.¹⁶

Cyclin dependent kinases which play an important role in eukaryotic cell cycle regulation, for example by interaction with transcription factors, by phosphorylation of histone H1 or by phosphorylation of retinoblastoma susceptibility gene product (pRb), may also contribute to the development of neoplastic disorders.^{17,18} These crucial events should be considered in the development of *in vitro* assays for carcinogenicity.

The variety of the mechanisms involved in the control of cell cycle and mitosis explains the difficulty in screening non genotoxic carcinogens. Several endpoints would require to be investigated to detect these properties, unless a criterion integrating the effects of these various disturbances can be used. Morphological transformation seems to fulfill this last characteristic. Indeed, malignant cells exhibit progressive phenotypic changes during tumor progression: loss of contact inhibition, increase in the ratio of nucleus /cytoplasm volume, change in the morphology of cells and colonies due to cytoskeleton alterations. These changes either precede or occur concomitantly with genomic disturbances. Indeed, cancer cells display chromosomal instability, abnormal number (aneuploidy) and chromosomal structural changes such as amplification and translocation of genes.¹¹ Thus, these changes in cell morphology can be criteria for carcinogenicity.

In the following sections, we shall focus on three relevant and promising assays for detection of carcinogens. The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system and measurements of intercellular communication through gap junctions will be especially described. The former has recently been proposed as an OECD guideline for the testing of chemicals. The gap junctional intercellular communication (GJIC) assays are also considered within the objectives of OECD. Poly(ADP ribosyl)ation involved in DNA repair will also be considered due to its importance in maintaining the integrity of the genome and its relevance as a criterion for non genotoxic carcinogenicity, though this field of research has by far not been as broadly investigated as the former two.

III. IN VITRO CELL TRANSFORMATION ASSAY

Various *in vitro* cell transformation systems have been developed using established cell lines such as BALB/3T3,¹⁹ C3H10T1/2²⁰ or primary or secondary SHE cells.^{21,22} The end point of such systems is the formation of either transformed foci for cell lines (BALB/3T3, C3H10T1/2) or morphologically transformed colonies for SHE cells. Morphological transformation (MT) is a recognized step in the multistage process of conversion of a non tumorigenic to a neoplastic state. MT phenotype is characterized by loss of contact inhibition, pattern of growth in three dimensions within the colony resulting in random (criss cross) orientation . Cells in MT colonies are more basophilic and display an increased nuclear to cytoplasmic ratio (figure 2).

Though established cells lines can be grown easily *in vitro* , they have some disadvantages due to their subtetraploidy, their limited metabolizing capacities, their high level of spontaneous transformation frequency and the long time needed (three to eight weeks) for the transformation to be expressed.^{19, 20}

In contrast, primary SHE cells are normal diploid cells with metabolizing capacities and low spontaneous transformation frequency. Morphological transformation of SHE cells closely

mimics the first steps of the carcinogenic process. Several studies showed a good correlation between (i) the multistage neoplastic transformation of SHE cells and *in vivo* carcinogenesis.²³⁻²⁷ Cells derived from transformed colonies were shown to induce tumor formation when inoculated in an isogenic animal.²¹

Moreover the SHE cell morphological transformation assay may detect non genotoxic as well as genotoxic carcinogens. This argues in favor of the use of this assay for the screening of carcinogens. The synergistic effects between genotoxic and non genotoxic chemicals could be shown in the SHE cell assay by using a sequential treatment consisting in an initiation-promotion procedure (figure 3).

In order to assess the transforming capacity of a chemical, SHE cells are seeded at clonal density on a monolayer of feeder cells and treated during one to seven days with the tested compound. The latter can be applied alone or associated to other carcinogens, initiators or tumour promoters, in order to detect interacting effects. Co-exposure or sequential treatment is carried out with (i) benzo(a)pyrene (BaP) used at low concentrations ($0.4 \mu\text{M}$) as an initiator to detect a promoting effect of the tested substance, or (ii) 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, $0.16 \mu\text{M}$) to evaluate an initiating capacity.

Cells are incubated during a 7-d period to allow the development of colonies and phenotypic modifications. Cells are then fixed and stained with Giemsa. Microscopic examination is performed to identify transformed colonies. The number of morphologically transformed colonies relative to normal colonies in chemically-treated groups is compared to controls.^{24,26,28-30}

We showed that chlorothalonil, a fungicide classified as a non genotoxic carcinogen, promoted MT of SHE cells previously initiated by BaP which caused no effect on its own at the low concentration used (figure 4).

Chlordane, a cyclodiene pesticide reported to be carcinogenic in rodents but devoid of genotoxic properties, could induce MT of SHE cells at non cytotoxic concentrations. Chlordane potentiated TPA effects and enhanced MT frequency in SHE cells. These results underlined that interactions between non genotoxic substances may also have dramatic consequences on cell transformation.³⁰

In considering all the available data,²⁸⁻³² it is clear that the SHE cell transformation assay appears a relevant model for carcinogenicity. The initiation - promotion protocol increases the capacity of the model to detect carcinogenic properties. Nevertheless, this assay suffers some drawbacks :

- the low transformation frequency induced by chemical carcinogens requires the examination of a large number of colonies,
- the plating efficiency and the transformation frequency are dependent on growth factors provided by the fetal calf serum added to the culture medium. These variability factors can be

lowered by pretesting the serum and the batches of embryo cells in order to optimize the above parameters. The development of synthetic serum allowing growth of cells at clonal density will certainly help us to solve this problem in the future,

- the phenotypic changes are detected by microscopic examination of colonies. Thus, criteria for transformation need to be clearly defined in order to limit subjectivity in scoring the morphologically transformed colonies. Biomarkers of MT phenotype in addition to morphological criteria could be useful to identify cell transformation. At the moment, such biochemical indicators are not available and research is needed in this area.

Even if this transformation cell assay still requires some improvements experimentally, it constitutes a good alternative to animal experiments for the detection of non genotoxic carcinogens. Another application of SHE cells could be envisaged owing to the fact that SHE cells are composed of a mixture of fibroblastic and epithelial cells and since most cancers are epithelioma (carcinoma). It would therefore be interesting to recover epithelial cells by selective growth media and to use these cells in testing. At the moment, morphological cell transformation assays use mammalian cells. Yet it would certainly be of interest to adapt this test system to cells derived from aquatic vertebrates or invertebrates in the future.

IV. ROLE OF GAP JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION FOR THE DETECTION OF NON GENOTOXIC CARCINOGENS

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is one of the major means by which multicellular organisms mediate the direct intercellular exchange of cellular signal factors (small molecules and ions) from the interior of one cell to neighbouring cells. GJIC plays a crucial role in the maintenance of cell homeostasis and aberrant GJIC is often involved in carcinogenesis. Gap junctions are formed by the contact of two hemichannels (connexons) penetrating the plasma membranes of adjacent cells (figure 5).³³ Hemichannels are formed by six protein subunits named connexins (Cx).³⁴

It has been shown that many tumor-promoting agents alter the regulation of GJIC. The inhibition of GJIC is an epigenetic event which may be related to cell transformation and proliferation of cancer cells.^{13,35} There are several levels of regulation of GJIC. Permeability decrease or inhibition may result from changes in the expression of Cx during transcription and translation. Alteration of post translational processing and alteration of connexon assembly and insertion into the plasma membrane can also be involved in the deregulation of GJIC. Most transformed and tumorigenic cells show aberrant GJIC but the transfection of connexin genes into these tumorigenic cells may restore the normal phenotype. This emphasizes the relevance of GJIC in cancer promotion. All these topics have been extensively reviewed.³⁵⁻³⁸

Budunova³⁴ reported that 60% of a set of 80 substances with known carcinogenic activity inhibit GJIC. Antipromoting and anticarcinogenic agents such as retinoic acid, glucocorticoids, quercetin, etc., may prevent the inhibition of GJIC induced *in vitro* by the tumor promoter TPA.³⁴ These results strongly support the hypothesis that alteration of GJIC is a critical event in carcinogenesis.

Several methods were developed to study GJIC. One approach called metabolic cooperation is based on the transfer of small molecules between cells. The first experimental assay used to study metabolic cooperation is the coculture of 6-thioguanine (6-TG) resistant and 6-TG sensitive V79 cells.¹³ 6-TG sensitive cells are able to phosphoribosylate this synthetic purine. The phosphoribosylated purine is a toxic metabolite which kills 6-TG resistant cells after its transfer through operational gap junctions. The number of resistant cells recovered after exposure of the coculture to the test substance is a quantitative indicator of its capacity to inhibit GJIC. Another approach to study GJIC consists in dye transfer techniques. These methods register the spread of fluorescent dye (lucifer yellow) microinjected into one of the cells (figure 6). These techniques are easy to perform and give rapid results, which make them powerful tools in screening.

We showed that chlordane which induced the morphological transformation of SHE cells also inhibited intercellular communication. Inhibition of GJIC by chlordane was revealed by a dye transfer technique in SHE cells and with the metabolic cooperation assay with V79. These results emphasized the epigenetic character of this pesticide which disturbs homeostasis by several mechanisms.³⁰

It was initially postulated that inhibition of GJIC could be a common property of non genotoxic carcinogens. Some of them, however, do not comply with this postulate. As an example, chlorothalonil was not found to inhibit intercellular communication either in V79 cells or in SHE cells, while it promoted MT in SHE cells.²⁹ Thus, caution is required in interpreting negative results, which are not a guarantee of safety. Indeed, GJIC is a complex process controlled by many cellular and environmental factors. In the case of responses demonstrating an inhibition of intercellular communication, GJIC remains a useful criterion which may relate to carcinogenic potential.

The above examples illustrate the wide spectrum of activities of epigenetic carcinogens and emphasize the need for developing and validating several types of assays for the evaluation of non genotoxic carcinogens. Another area worth investigating is the complex DNA repair system. This system can be the target of chemicals which will indirectly increase genomic alterations.

V. IMPACT OF EPIGENETIC CARCINOGENS ON POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; EC 2.4. 2. 30.) is a zinc binding nuclear enzyme that catalyzes the synthesis of the polymer poly(ADP-ribose) (pADPr) from its substrate, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺).³⁹ The intracellular synthesis of poly(ADP-ribose), a process called poly(ADP-ribosyl)ation, is induced by strand breaks in DNA.⁴⁰ The polymer pADPr will bind to nuclear proteins and histones, leading to chromatin decondensation which facilitates the activity of DNA repair enzymes.⁴¹

Thus, PARP through poly(ADP ribosyl)ation of nuclear proteins plays an essential role in DNA metabolism (replication and repair) in eukaryotic cells. Cell cycle, cell transformation, cell differentiation, spermatogenesis and embryogenesis are also controlled by PARP.⁴²⁻⁴⁵

An inhibition of poly(ADP-ribose) synthesis may be deleterious to DNA metabolism and integrity, and to cell growth and differentiation. Thus, poly(ADP ribosyl)ation pattern in cells could be used as an early and general end point in genetic toxicology.

Specific inhibitors of PARP are not genotoxic but can disturb the cell cycle in S and G2 phases.⁴⁵ 3-aminobenzamide (3-AB), an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthesis, was shown to induce sister chromatid exchanges,⁴⁶ and also to potentiate the genotoxic effects of clastogens.⁴⁷ At present, there is a consensus suggesting that PARP inhibitors could induce variations in carcinogenicity. The mechanisms by which poly(ADP-ribosyl)ation interferes in this process remain to be elucidated. Considering the importance of PARP cellular functions, poly(ADP-ribosyl)ation deserves to be more thoroughly studied.

As epigenetic carcinogens may change PARP expression and synthesis of pADPr,⁴⁸ the relationships between poly(ADP-ribosyl)ation and cell transformation is another area worthy of investigation. These effects could be monitored in cells by measuring poly(ADP-ribose) levels according to the method of Shah *et al.*⁴⁹

VI. CONCLUSION

One of the major challenges of our times is to prevent the environmental consequences of pollution for human and environmental safety. Efficient prevention requires that the regulation of new chemicals be improved in order to fill the present gap concerning carcinogenicity.

The variety of mechanisms involved in the control of cell cycle and mitosis explains the difficulty in screening non genotoxic carcinogens. This contrasts with genotoxic substances easily detected by mutations, genomic and chromosomal alterations.

The detection of genotoxic carcinogens by *in vitro* short term assays is quite efficient, but at this time no test has been validated for non genotoxic carcinogens. Cell morphological transformation assays and GJIC measurements are relevant methods which deserve to be considered in a battery of *in vitro* short term assays for carcinogenicity. It is imperative that these methods become standardized in the near future.

Environmental problems result in a great part from the interactions between a multitude of contaminants in the ecosystems. These interactions cannot be underestimated in the context of a multistage and multifactorial carcinogenic process. They may involve genetic as well as epigenetic factors, acting directly or not on DNA metabolism and on cellular homeostasis. Up to now, scientists have mainly focussed on the study of DNA damaging agents, i.e. initiators. It now appears essential that non genotoxic carcinogens and the combined effects of initiators and tumour promoters be investigated more extensively.

Presently, *in vitro* genotoxicity assays for chemicals use mainly mammalian cells. A logical next step would be to develop new techniques from selected aquatic (in)vertebrate cells. The promotion of such techniques should be encouraged so as to offer more relevant diagnostic tools to ensure better protection for the aquatic environment.

VII. REFERENCES

1. Dawe, C. J., Stanton, M. F., and Schwartz, F. J., Hepatic neoplasms in native bottom feeding fish of deep creek lake, Maryland, *Cancer Res.*, 24, 1194, 1964.
2. Pierce, K. V., McCain, B. B., and Wellings, S. R., Pathology of hepatomas and other liver abnormalities in English sole (*Parophrys vetulus*) from the Duwamish river estuary, Seattle, Washington, *J. Natl. Cancer Inst.*, 60, 1445, 1978.
3. Murchelano, R. A., and Wolke, R. E., Epizootic carcinoma in the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, *Science*, 228, 587, 1985.
4. Bucke, D., Watermann, B., and Feist, S., Histological variations of hepato-splenic organs from the North Sea dab, *Limanda limanda* L., *J. Fish. Dis.*, 7, 255, 1984.
5. Malins, D. C., Krahn, M. M., Brown, D. W., Rhodes, L. D., Myers, M. S., Mc Cain, B. B. , and Chan, S. L., Toxic chemicals in marine sediment and biota from Mukiteo, Washington: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*), *J. Natl. Cancer Inst.*, 74, 487, 1985.
6. Black J.J., Field and laboratory studies of environmental carcinogenesis in Niagara river fish, *J. Great Lakes Res.*, 9, 326, 1983.
7. Dethlefsen V., Observations on fish diseases in the German Bight and their possible relation to pollution, *Rapp P-v Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 179, 110, 1980.
8. Vethaak A.D., Fish disease and marine pollution, *Thesis Universiteit van Amsterdam*, 1993.

9. Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M., and McCain, B. B., Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast, *Environ. Health Perspect.*, 90, 7, 1991.
10. Vasseur, P., Godet, F., Bessi, H., and Lambolez, L., Indices for carcinogenicity in aquatic ecosystems: significance and development, in *Evaluating and Monitoring the Health of Large-Scale Ecosystems*, Rapport, D. J., Gaudet, C. L., and Calow, P., Eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1995, 179.
11. Harris, C. C., Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s, *Cancer Res.*, 51, 5023s, 1991.
12. Weinstein, I. B., The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implication for cancer prevention and treatment, *Cancer Res.*, 48, 4135, 1988.
13. Trosko, J. E., Jone, C., and Chang, C. C., The use of *in vitro* assays to study and to detect tumor promoters, in *Models, mechanism and etiology of tumors promotion*, IARC Sc. Publ., 56, Lyon, 1984.
14. Raunio, H., and Pelkonen, O., Effect of polycyclic aromatic compounds and phorbol esters on ornithine decarboxylase and aryl hydrocarbon hydroxylase activities in mouse liver, *Cancer Res.*, 43, 782, 1983.
15. Bayly, A. C., Roberts, R. A., and Dive, C., Suppression of liver cell apoptosis *in vitro* by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin, *J. Cell Biol.*, 125, 197, 1994.
16. Counts, J. L., and Goodman, J. I., Hypomethylation of DNA: a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion, *Toxicol. Lett.*, 82/83, 663, 1995.
17. Wolowiec, D., and Ffrench, M., Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine, *Médecine/Sciences*, 12, 165, 1996.
18. Tyson, J. J., Novak, B., Odell, G. M., Chen, K., and Thron, C. D., Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation, *Trends Biochem. Sci.*, 21, 89, 1996.
19. Kakunaga, T., A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from Balb/3T3, *Int. J. Cancer*, 12, 463, 1973.

20. Reznikoff, C. A., Bertram, J. S., Brankow, D., and Heidelberger, C., 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, 1973.
21. Berwald, Y., and Sachs, L., *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens, *Nature*, 200, 1182, 1963.
22. Di Paolo, J. A., Quantitative *in vitro* transformation of Syrian golden hamster embryo cells with the use of frozen stored cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 1485, 1980.
23. Barrett, J. C., Hesterberg, T. W., and Thomassen, D. G., Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenicity, *Pharmacol. Rev.*, 36, 535, 1984.
24. Pienta, R. J., Poiley, J. A., and Lebherz, W. B., Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens, *Int. J. Cancer*, 19, 642, 1977.
25. Chouroulinkov, I., and Lasne, C., Two stage (initiation-promotion) carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*, *Bulletin du cancer*, 65, 255, 1978.
26. Pienta, R. J., Lebherz, W. B., and Schuman, R. F., The use of cryopreserved Syrian hamster embryo cells in a transformation test for detecting chemical carcinogens, in *Short term tests for chemical carcinogens*, Stick, H. F., and San, R. H. C., Eds., Springer-Verlag, New York, 1981, 323.
27. LeBoeuf, R. A., Kerckaert, G. A., Poiley, J. A., and Raineri, R., An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH, *Mutat. Res.*, 222, 205, 1989.
28. Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Danieri, M. C., Terzetti, F., Baruthio, F., Fournier, M., and Cavelier, C., Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 10, 2043, 1989.
29. Bessi, H., Rast, C., Nguyen-Ba, G., and Vasseur, P., Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit GAP junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line, *Cancer J.*, 7, 248, 1994.

30. Bessi, H., Rast, C., Rether, B., Nguyen-Ba, G., and Vasseur, P., Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells, *Carcinogenesis*, 16, 237, 1995.
31. Rivedal, E., Mikalsen, S. O., Roseng, L. E., Sanner, T., and Eide, I., Effects of hydrocarbons on transformation and intercellular communication in Syrian Hamster Embryo Cells, *Pharmacol. & Toxicol.*, 71, 57, 1992.
32. Lasne, C., Gentil, A., and Chouroulinkov, I., Two stage malignant transformation of Syrian hamster cells, *Nature*, 247, 490, 1974.
33. Maillet, M., *Biologie Cellulaire*, 7th Edition, Masson, Paris, 1995.
34. Budunova, I. V., Alteration of gap junctional intercellular communication during carcinogenesis, *Cancer J.*, 7, 228, 1994.
35. Yamasaki, H., Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 11, 1051, 1990.
36. Yamasaki, H., Non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis: studies of cell transformation and gap junctional intercellular communication, *Toxicol Lett.*, 77, 55, 1995.
37. Mesnil, M., and Yamasaki, H., Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells : evidence and hypothesis, *Mol. Carcinogen.*, 7, 14, 1993.
38. Trosko, J. E., and Chang, C. C., Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis: role of inhibited intercellular communication, *Banbury Rep.*, 31, 139, 1988.
39. Chambon, P., Weill, J. D., Doly, J., Strosser, M. T., and Mandel, P., On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 25, 638, 1966.
40. Benjamin, R. C., and Gill, D. M., Poly(ADP-ribose) synthesis *in vitro* programmed by damaged DNA, *J. Biol. Chem.*, 255, 10502, 1980.
41. Ding, R., and Smulson, M., Depletion of nuclear poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression: influences on genomic stability, chromatin organization and carcinogen cytotoxicity, *Cancer Res.*, 54, 4627, 1994.

42. Sugimura, T., and Miwa, M., Poly(ADP-ribose) and cancer reasearch, *Carcinogenesis*, 12, 1503, 1983.
43. Jacobson, E. L., Meadows, R., and Measel, J., Cell cycle perturbations following DNA damage in presence of ADP-ribosylation inhibitors, *Carcinogenesis*, 6, 711, 1985.
44. Cleaver, J. E., and Morgan, W. F., Poly(ADP-ribose)polymerase: a perplexing participant in cellular responses to DNA breakage, *Muta. Res.*, 257, 1, 1991.
45. De Murcia, G., ADP-ribosylation reactions: Mechanisms and biological significance, Part I, *Biochimie*, 77, 5, 1995.
46. Morgan, W. F., and Cleaver, J. E., 3-Aminobenzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methyl methanesulfonate but not to ultraviolet light, *Mutat. Res.*, 104, 361, 1982.
47. Schwartz, J. L., Morgan., W. F., and Weichselbaum, R. R., Different efficiencies of interaction between 3-aminobenzamide and various monofunctional alkylating agents in the induction of sister chromatid exchanges, *Carcinogenesis*, 6, 699, 1985.
48. Singh, N., Poirier, G., and Cerutti, P., Tumor promoter phorbol-12-myristate-13- acetate induces poly(ADP-ribosyl)ation in fibroblasts, *EMBO J.*, 4, 1491, 1985.
49. Shah, G. M., Poirier, D., Duchaine, C., Brochu, G., Desnoyers, S., Lagueux, J., Verreault, A., Hoflack, J. C., Kirkland, J. B., and Poirier, G. G., Methods for biochemical study of poly(ADP-ribose) metabolism *in vitro* and *in vivo*, *Anal. Biochem.*, 227, 1, 1995.

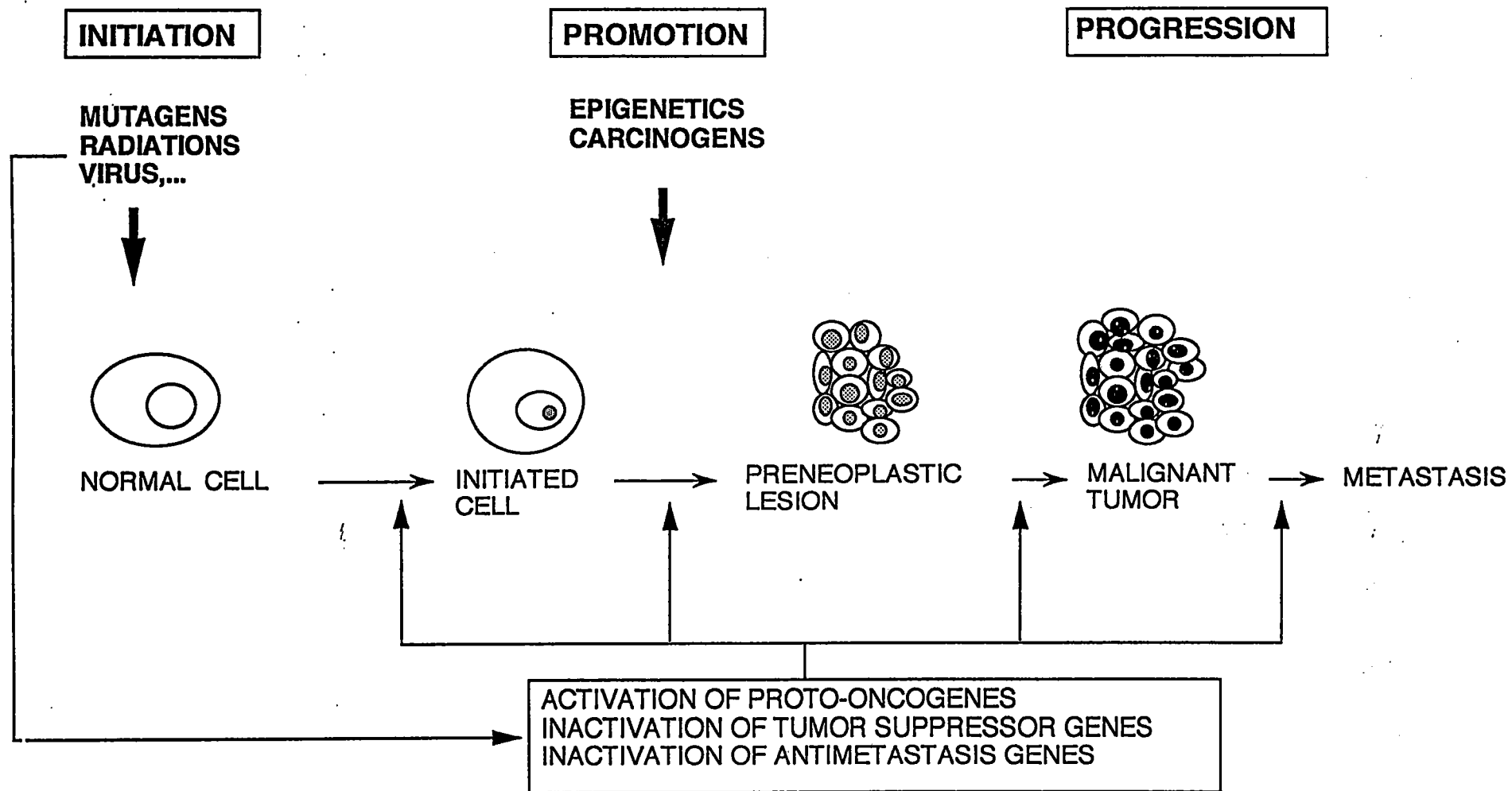


Figure 1: Multistage process of carcinogenesis according to Harris. 11



Figure 2: Colonies of syrian hamster embryo cells after 7 days of growth at cloning density in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 15% fetal calf serum.
Normal colony of cells (x80) (a).
Morphologically transformed colony of SHE cells (x80) (b).

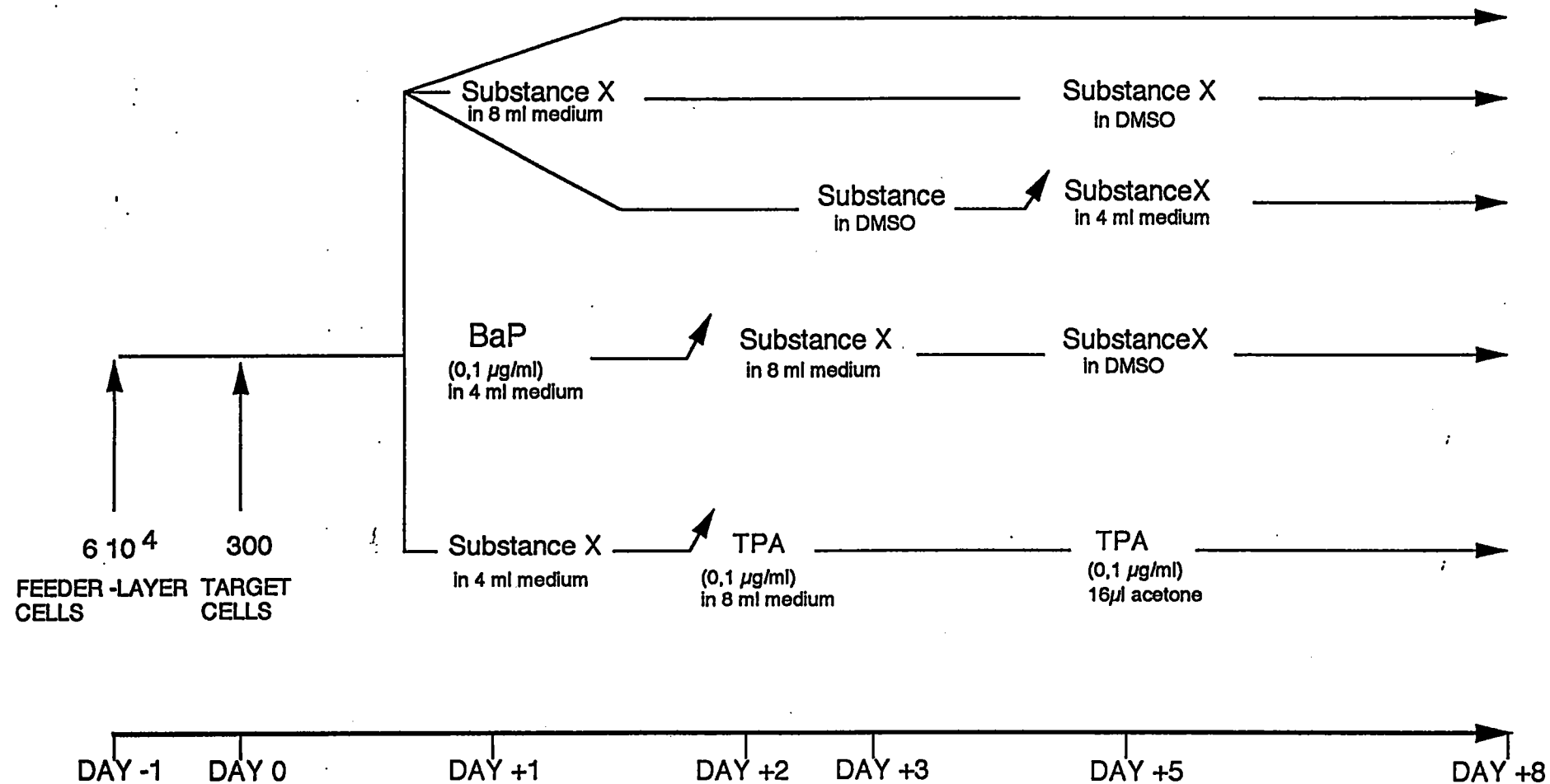


Figure 3: Initiation-promotion protocol used for the detection of epigenetic carcinogens.

↗ indicates the removal of the medium which is replaced by new medium supplemented with the substance to test or TPA according to the protocol used.

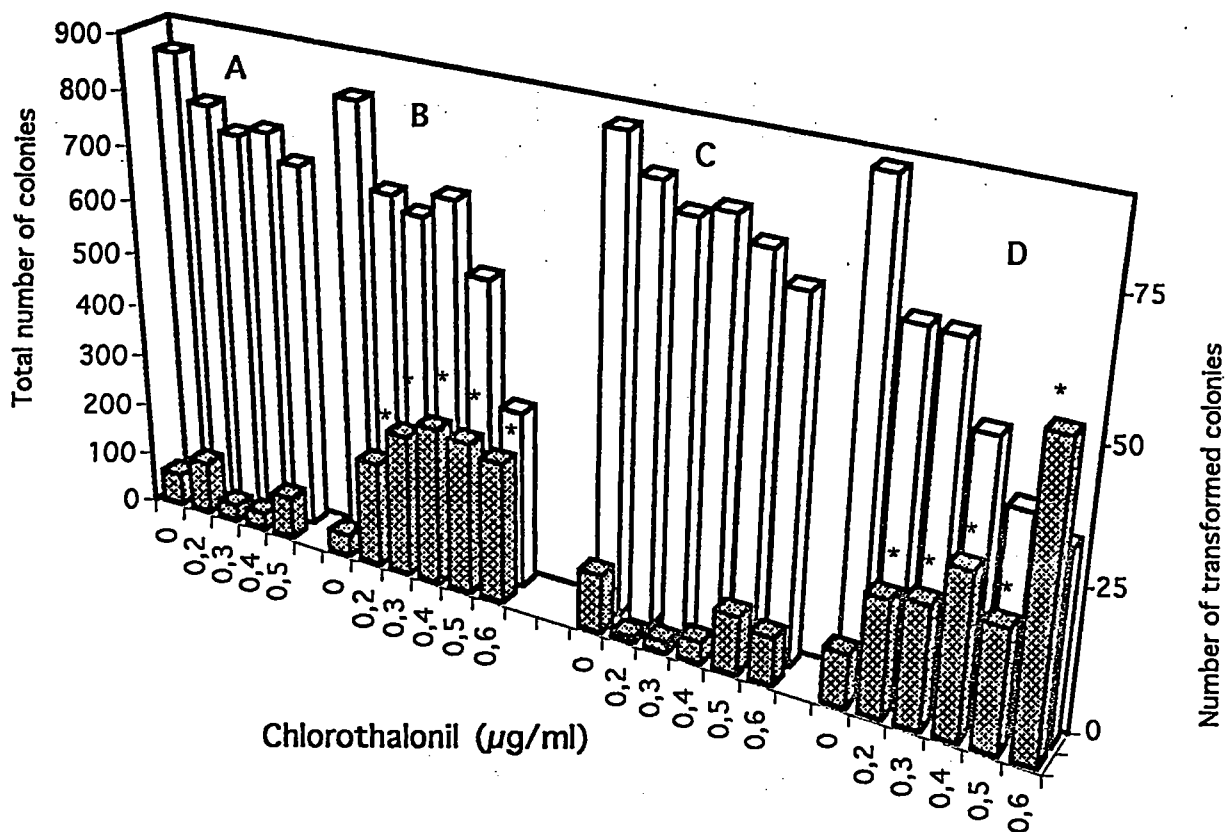


Figure 4: Effects of chlorothalonil on cloning efficiency and morphological transformation of primary SHE cells.

Cells were exposed for 24 h to: (A) 0.1 μg/ml BaP followed by single treatment of chlorothalonil at day 2 (B) 0.1 μg/ml BaP followed by two applications of chlorothalonil at day 2 and day 5 (C) 0.2 μg/ml BaP followed by single treatment of chlorothalonil at day 2 (D) 0.2 μg/ml BaP followed by two applications of chlorothalonil at day 2 and day 5

* values significantly different from their respective controls (P < 0.05, test Mann-Whitney).

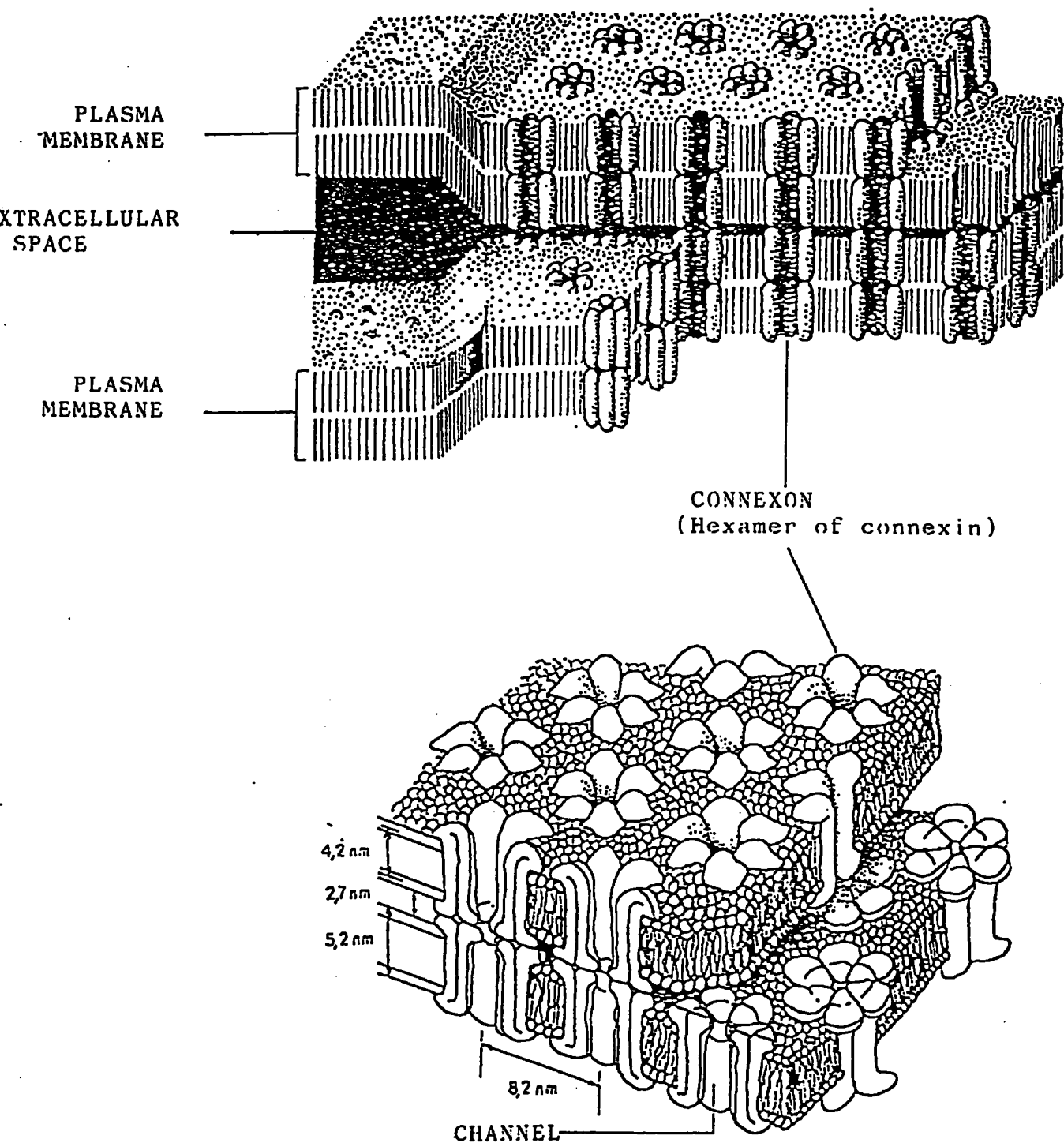
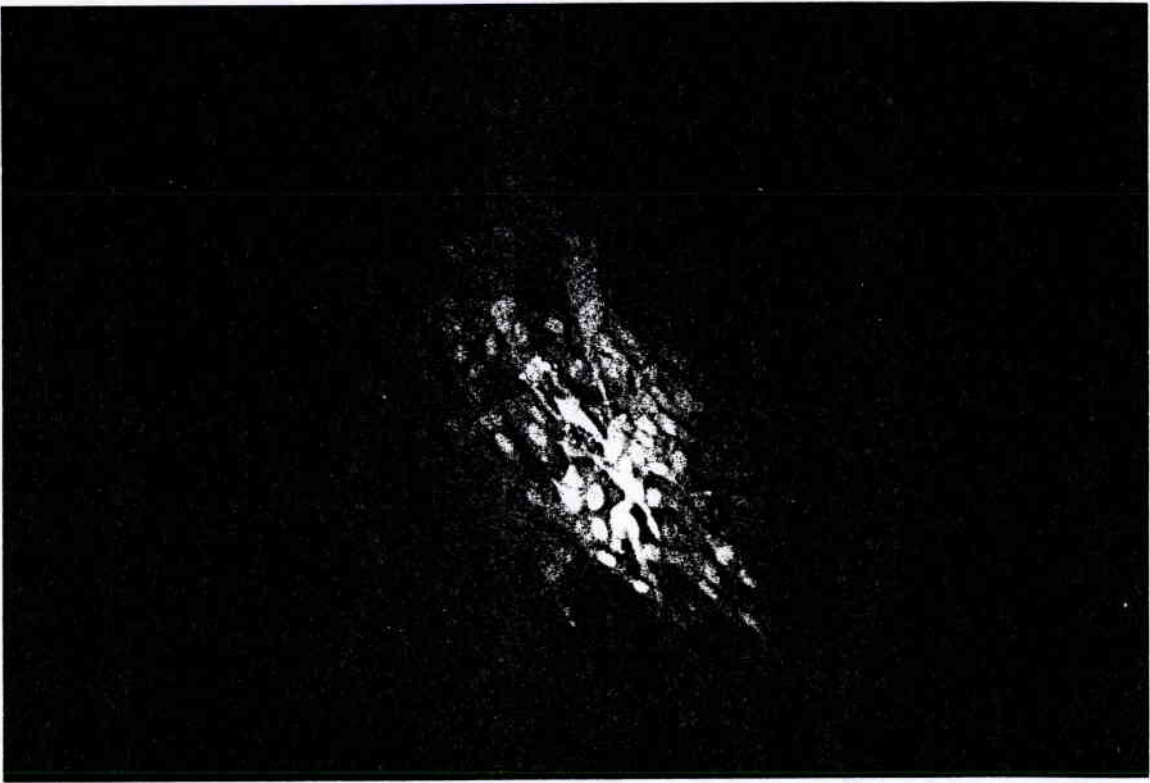


Figure 5: Molecular organisation of a gap jonction.

a



b

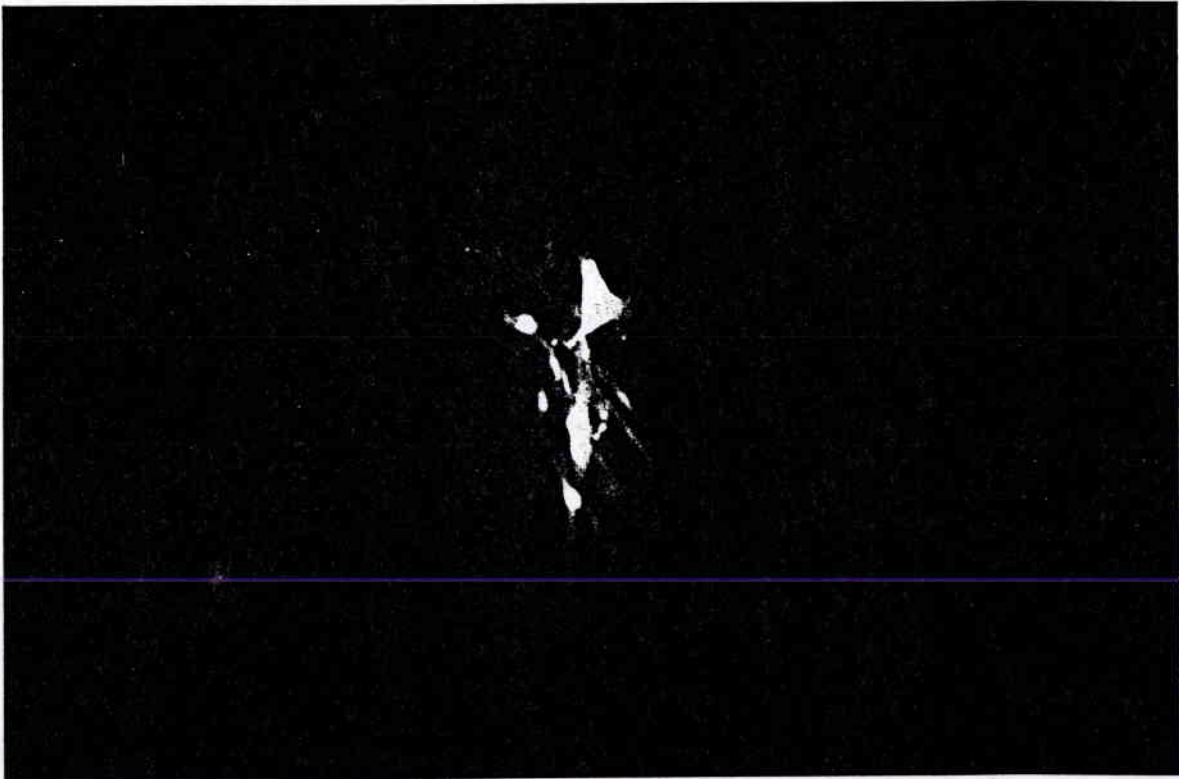


Figure 6: GJIC measured by dye transfert of lucifer yellow after microinjection of single SHE cell.

Control cells (a).

Inhibition of GJIC by TPA (1 hour exposure 0.1 $\mu\text{g/ml}$) (b).

Publication 5 : “SHE cell transformation assay as a predictive system for carcinogenicity of PAH and non-genotoxic carcinogens.”

Cruciani *et al.*, Polycyclic Aromatic Compounds 10, 307-314, 1996.

SHE CELL TRANSFORMATION ASSAY AS A PREDICTIVE SYSTEM FOR CARCINOGENICITY OF PAH AND NON-GENOTOXIC CARCINOGENS.

VERONIQUE CRUCIANI¹, HALIMA BESSI¹, STEPHANIE ALEXANDRE¹, MARIE-JOSE DURAND¹, CLAUDINE RAST¹, GIAO NGUYEN-BA² and PAULE VASSEUR¹

¹ Centre des Sciences de l'Environnement, 57040 Metz Cédex, France

² Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire, URA CNRS 1218, Faculté de Pharmacie, 92290 Chatenay-Malabry, France

Abstract The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay is an *in vitro* method for the detection of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. Its reliability as a multistage carcinogen screening method was demonstrated by several authors who showed that cells derived from transformed colonies were capable of tumour formation when inoculated in a suitable host animal. The SHE assay offers the advantage of using normal diploid cells with metabolizing capacities and low spontaneous transformation frequency. Epithelial cultures can be selected from the mixed cellular suspension obtained from the Syrian hamster embryos in order to develop an *in vitro* model for the detection of carcinogens inducing carcinomas..

Polycyclic aromatic hydrocarbons, such as BaP and DMBA were studied in depth for their cell transforming potency. The synergistic effects of PAH and tumor promoters can be demonstrated by using a sequential treatment consisting in an initiation-promotion scheme¹. This protocol also revealed interacting effects between non-genotoxic carcinogens ².

Key Words Cell transformation, SHE cells, non-genotoxic carcinogens, benzo(a)pyrene, initiation-promotion, tumor promoters

INTRODUCTION

The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay is an *in vitro* method for the detection of carcinogens, which closely mimics the first steps of the carcinogenic process. Its reliability as a multistage carcinogen screening method was first demonstrated by Berwald and Sachs³. These authors showed that cells derived from

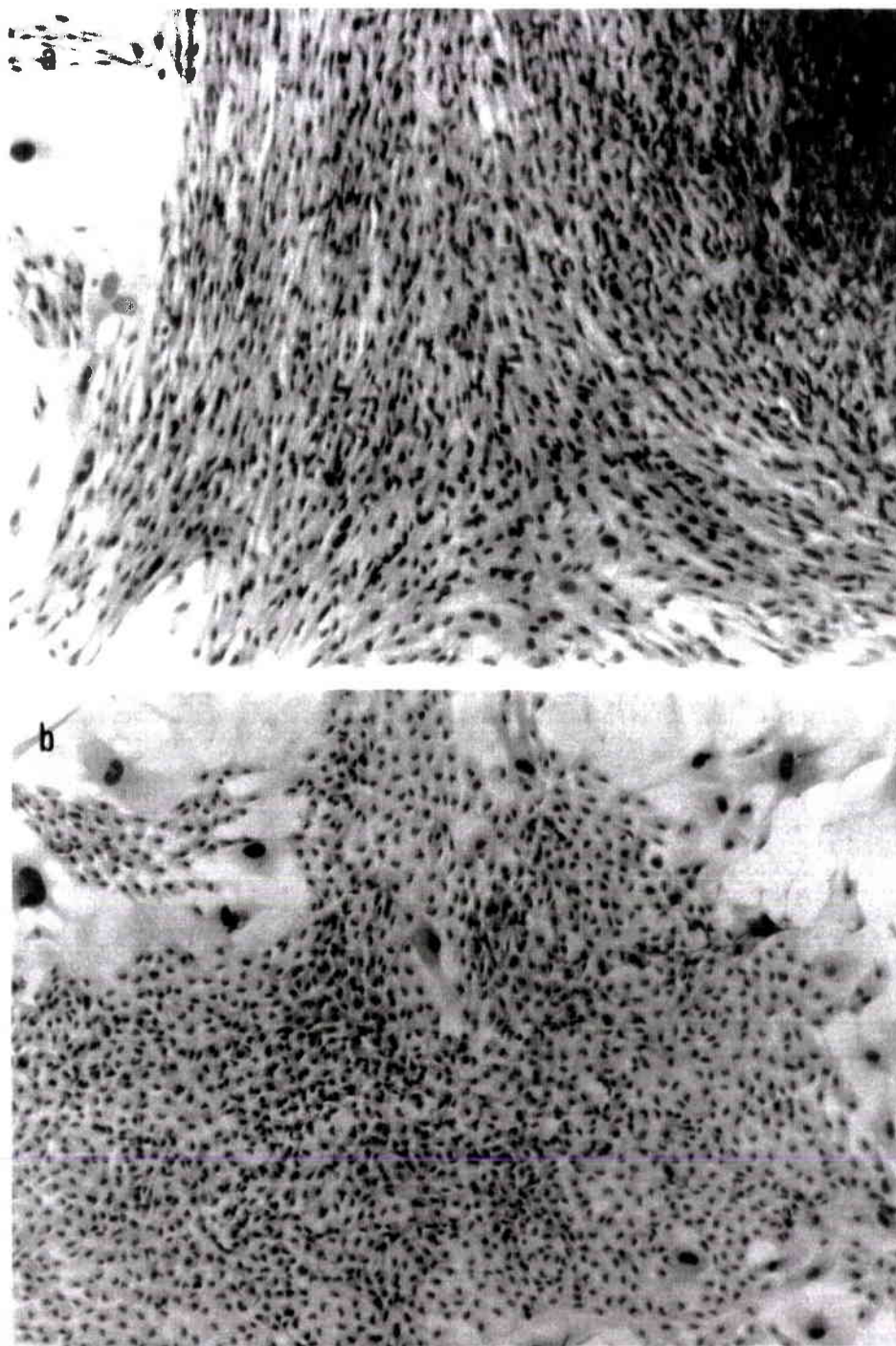


FIGURE 1 Colonies of Syrian hamster embryo cells after 7 days of growth at cloning density in DMEM. Normal colony of fibroblastic cells (x80) (**a**). Normal colony of epithelial cells (x60) (**b**).

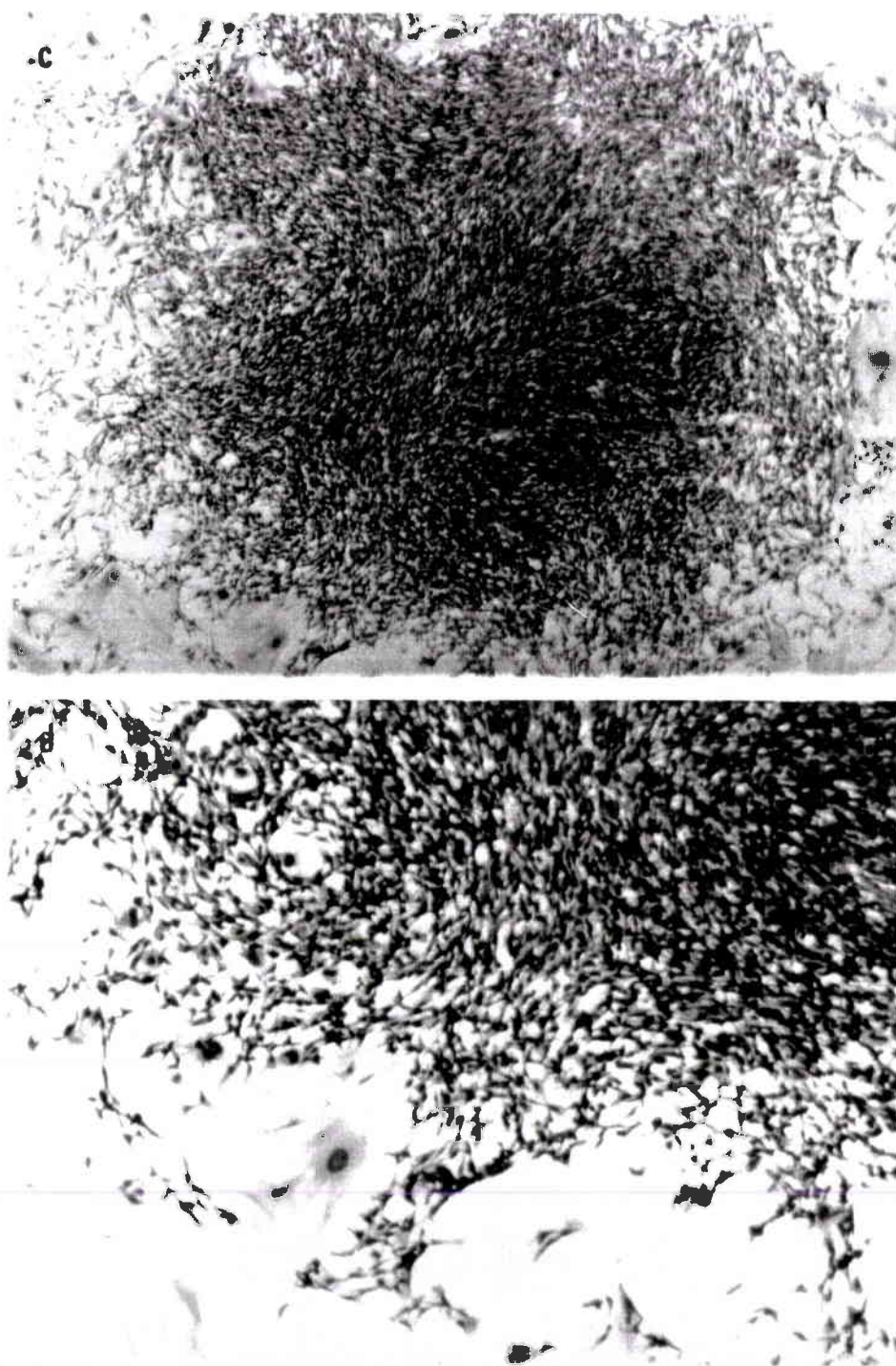


FIGURE 1 (continued) Morphological phenotype of a transformed colony (x40) (c). (x80) (d).

transformed colonies were capable of tumour formation when inoculated in a suitable host animal. Therefore, transformation of culture mammalian cells by a variety of chemicals has been used for more than three decades in studies on mechanisms of carcinogenesis. The *in vitro* SHE cell transformation assay which was described first by DiPaolo *et al.*⁴, measures the induction of morphological transformation (MT) of colonies after chemical treatment. MT is a recognized step in the multistep process of conversion of non tumorigenic mammalian cells to a neoplastic state. MT phenotype is characterized by a loss of contact inhibition of cells within the colony resulting in a random orientation (or criss-cross) pattern of growth in three dimensions (Figure 1). Cells in MT colonies are more basophilic and display increased nuclear to cytoplasmic ratio. These morphological changes express the perturbations of the cytoskeleton induced by cell transformation.

Cells forming the colonies may display either fibroblastic or epithelial morphology because they derive from a mixed cellular suspension obtained from the Syrian hamster embryos. Epithelial cells can be selected by means of selective growth media⁵. The use of an epithelial cellular model for *in vitro* carcinogenicity appears necessary, as carcinomas represent 95% of human cancers.

Transformation assays using established cell lines such as BALB/ 3T3 and C3H/10T½, were also proposed by Kakunaga⁶ and Reznikoff *et al.*⁷ respectively. The SHE cells offer several advantages compared to these cell lines : SHE cells are normal diploid cells with metabolizing capacities and low spontaneous transformation frequency. Moreover transformation of colonies can be revealed after a short time of exposure, i.e. 7 days.

The Syrian hamster embryo cell transformation assay detects genotoxic as well as non-genotoxic carcinogens. Polycyclic aromatic hydrocarbons, such as BaP (Benzo[a]pyrene) and DMBA (dimethylbenz[a]anthracene) were studied in depth for their cell transforming potency. Their synergistic effects with tumor promoters can also be easily detected using a sequential treatment following an initiation-promotion scheme¹. The interacting effects between non-genotoxic carcinogens can also be observed with this protocol².

The transforming capacities of BaP and DMBA will be shown in the following. Some results demonstrating the synergistic effects between BaP and the model of tumour promoter TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) will be presented in a second part.

MATERIAL AND METHODS

Protocol of the SHE Cell Transformation Assay

SHE cells from secondary or tertiary cultures (target cells) are seeded at cloning density (100 to 300 cells) in 60 mm Petri dishes with a feeder layer of irradiated cells in DMEM medium supplemented with 15% or 20% fetal calf serum (FCS) as described by Tu *et al.*⁸ and Lasne *et al.*⁹. The cells are treated 24 h later and incubated at 37°C in humidified air with 10% CO₂. At day 8, plates are washed with phosphate-buffered saline and cells are fixed with absolute ethanol and stained with 10% Giemsa. Colonies are scored under stereomicroscope for cloning efficiency and morphological transformation (number of transformed colonies / total number of colonies). Statistical analysis are done by the χ^2 test.

PAH can be applied either alone with one or two applications, or in a sequential treatment with TPA. The duration of the treatment may vary between 1 to 7 days, according to the authors. In sequential treatments, BaP is applied over 1, 2 or 3 days. Then the medium is replaced with one containing TPA, as described by Bessi *et al.*².

Cell Cultures of Feeder and Target SHE Cells.

Target and feeder cells are prepared as described by Pienta *et al.*¹⁰. Target cells are obtained from pre-selected primary cell cultures of Syrian hamster embryos at 13 days of gestation, then stored in liquid nitrogen².

Feeder cells kept frozen in liquid nitrogen are obtained after a 5000 rad X-ray irradiation of a SHE cell suspension

RESULTS

BaP and DMBA were investigated by several authors for their morphological transforming potency on SHE cells and have thus been used as model chemicals in transformation studies. The morphological transformation was studied in the range 0.04-3 µg/ml DMBA in an interlaboratory comparison of transformation in SHE cells carried out by Tu *et al.*⁸: the percentage of MT colonies could reach 3.3%. This study also showed that results depend on the experimental conditions used, including the quality and the percentage of FC serum (Table I). It confirmed also that the spontaneous transformation frequency of SHE cells is very low. This explains why a low level of transformed colonies may be significant.

BaP has been used as a model chemical for *in vitro* transformation in the range of concentration 0.05-1 µg/ml. The morphological transformation can be slightly induced at 0.05 µg/ml after 3 days of exposure (Table II). The transformation frequency may exceed 1% after a 24 h treatment at 0.1 µg/ml. It appears that using an acidic pH, such

TABLE I The morphological transformation of SHE colonies exposed to DMBA

DMBA (in $\mu\text{g/ml}$)	total number of colonies	number of transformed colonies	transfor- mation (%)	Experimental conditions	ref.
0	354	0	0	10 % FCS	4
0.1	218	37	16.9	300 target cells 6.10^4 feeder cells	
0	2983	0	0	10 % FCS 300 target cells 6.10^4 feeder cells	8
0.19-3.0	1001	33	3.3		
0	5158	0	0	300 target cells 6.10^4 feeder cells	
0.19-3.0	1065	25	2.3		
0	7226	0	0		
0.04-0.3	1551	6	0.4		
0	4321	0	0	20 % FCS 300 target cells 6.10^4 feeder cells	
0.2-3.0	1014	6	0.6		
0	3431	0	0		
0.2-3.0	2829	12	0.4		
0	5067	2	<0.1		
0.06-0.3	1040	34	3.3		

as 6.7 as recommended by Leboeuf and Kerckaert¹¹, increases the sensitivity of SHE cells to the morphological transformation. As indicated in Table II, the transformation frequency increases from 1.2% to 6.6% when pH is lowered from 7 to 6.7. It has to be noticed that the spontaneous transformation of SHE cells is also higher at acidic pH.

Non genotoxic carcinogens, such as TPA, were demonstrated to induce the morphological transformation. 0.1 $\mu\text{g/ml}$ TPA applied during 3 to 5 days may transform at least 1.2% of SHE colonies. The induction of morphological transformation is much more important when TPA is applied on BaP initiated cells. Synergistic effects between BaP and TPA were demonstrated in a high number of experiments (Table II). These effects can be easily revealed *in vitro* with a staged exposure of SHE cells following an initiation-promotion protocol as recommended initially by Chouroulinkov and Lasne¹².

Other chemicals, known as non genotoxic carcinogens, were shown to induce morphological transformation of SHE colonies and to potentiate the effects of carcinogens^{1,2}.

CONCLUSION

The SHE model has been extensively used to study the mechanism of neoplastic transformation. It would be worthwhile that this model is applied routinely as an

TABLE II The morphological transformation of SHE colonies exposed to BaP or TPA applied either alone or in a sequential treatment

treatment (in $\mu\text{g/ml}$)	total number of colonies	number of transformed colonies	transfor- mation (%)	Experimental conditions	ref.
none	1127	6	0.5	pH 7.35	2
BaP 0.1/1 day	1309	22	1.7	20 % FCS	
TPA 0.1/6 days	2572	61	2.4	300 target cells	
BaP + TPA	1503	71	4.7	4.10^4 feeder cells	
none	325	0	0	pH 7.2	13
BaP 0.05/3 days	301	1	0.3	20 % FCS	
TPA 0.1/3 days	518	9	1.7	200-250 target cells	
BaP + TPA	398	42	10.6	6.10^4 feeder cells	
none	348	0	0	pH 7.2 20 % FCS 200 target cells 6.10^4 feeder cells	14
BaP 0.05/3 days	660	1	0.2		
TPA 0.1/4 days	672	12	1.8		
BaP + TPA	396	54	13.6		
none	276	0	0	pH 7.2 20 % FCS 200 target cells 6.10^4 feeder cells	15
BaP 0.05/2 days	240	0	0		
TPA 0.1/5 days	168	2	1.2		
BaP + TPA	312	20	6.4		
none	500	0	0	pH 7 15 % FCS 200 target cells 4.10^4 feeder cells	16
BaP 0.05/3 days	500	2	0.4		
TPA 0.05/4 days	200	8	4		
BaP + TPA	304	69	22.7		
none	2001	1	<0.1	pH 6.7 20 % FCS 150 target cells 4.10^4 feeder cells	our data
BaP 0.05/3 days	1176	6	0.5		
TPA 0.05/5 days	936	20	2.1		
BaP + TPA	1386	150	10.8		
none	3254	4	0.1	pH 6.7 20 % FCS 150 target cells 4.10^4 feeder cells	our data
BaP 0.1/1 days	2950	31	1		
TPA 0.1/6 days	2573	43	1.7		
BaP + TPA	1475	48	3.3		
none	2917	11	0.4		
BaP 1/7 days	1130	14	1.2		
none	920	23	2.5		
BaP 1/7 days	805	53	6.6		

alternative method to animal experiments for the *in vitro* screening of non genotoxic carcinogens.

The SHE cell transformation assay was demonstrated to be a reliable model system for *in vitro* detection of the carcinogenicity of chemicals. Staged exposure of SHE cells to carcinogens following an initiation-promotion protocol increases significantly the sensitivity of the assay and may permit the detection of the synergistic effects between carcinogens. Moreover, the interest of this assay can be increased by selecting epithelial SHE cells for the detection of chemicals capable of inducing carcinoma.

REFERENCES

1. H. Bessi, C. Rast, G. Nguyen-Ba, and P. Vasseur, *The Cancer Journal*, **7**, 248-253 (1994)
2. H. Bessi, C. Rast, B. Rether, G. Nguyen-Ba and P. Vasseur, *Carcinogenesis*, **16**, 237-244 (1995)
3. Y. Berwald and I. Sachs, *Nature*, **200**, 1182-1184 (1963)
4. J.A. DiPaolo, P. Donovan and R. Nelson, *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 867-876 (1969)
5. N.C. Sun, R.Y. Sun, L. Chao, W.P. Fung, R.W. Tennant and A.W. Hsie, *Cancer Res.*, **41**, 1669-1676 (1981)
6. T. Kakunaga, *Int. J. Cancer*, **12**, 463-473 (1973)
7. C.A. Reznikoff, J.S. Bertram, D.W. Brankow and C. Heidelberger, *Cancer Res.*, **33**, 3239-3249 (1973)
8. A. Tu, W. Hallowell, S. Pallotta, A. Sivak, R.A. Lubet, R.D. Curren, M.D. Avery, C. Jones, B.A. Sedita, E. Huberman, R. Tennant, J. Spalding and R.E. Kouri, *Environ. Mutagen.*, **8**, 77-98 (1986)
9. C. Lasne, Y.P. Lu, L. Orfila, L. Ventura and I. Chouroulinkov, *Carcinogenesis*, **11**, 541-547 (1990)
10. R.J. Pienta, J.A. Poiley and W.B. Leberherz, *Int. J. Cancer*, **19**, 642-655 (1977)
11. R.A. Leboeuf and G.A. Kerckaert, *Carcinogenesis*, **7**, 1431-1440 (1986)
12. I. Chouroulinkov and C. Lasne, *Bull. Cancer*, **65**, 255-264 (1978)
13. E. Rivedal and T. Sanner, *Cancer Res.*, **41**, 2950-2953 (1981)
14. E. Rivedal and T. Sanner, *Cancer Lett.*, **17**, 1-8 (1982)
15. E. Rivedal and T. Sanner, *Carcinogenesis*, **6**, 955-958 (1985)
16. E. Rivedal, L.E. Roseng and T. Sanner, *Cell Biol. and Toxicol.*, **6**, 303-314 (1990)

Publication 6 : “Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities.”

Dhalluin *et al.*, Cellular Pharmacology 3, 23-28, 1996.



Staged Exposure of SHE cells to clofibrate and TPA: Correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities

S Dhalluin¹, V Cruciani², C Rast², P Vasseur², H Tapiero¹ and G Nguyen-Ba¹

¹Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS-URA 1218, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 5, rue Jean-Baptiste Clément-F 92290 Châtenay-Malabry. ²Centre des Sciences de l'Environnement-F 57000 Metz

Summary

The hypolipidemic drug Clofibrate (CLF) was reported to induce peroxisome proliferation in rodent liver with carcinogenic potential. In the present study we have investigated within the framework of the two-stage carcinogenesis (initiation-promotion) the relationship between morphological transformation frequency, ornithine decarboxylase (ODC) and metalloprotease activities in syrian hamster embryo cells (SHE). When SHE cells were treated at day 1 or at days 1 and 5 to high CLF concentration (200 μ M) no significant increase of transformed colonies has been observed. After three successive treatments at days 1, 3 and 5 significant increase in transformation frequency was observed at even low CLF concentration (25 μ M). Exposure to 0.16 μ M TPA (promoter) for 7 days achieved low transformation frequency. The number of transformed colonies increased by about 3 fold and 6 fold when SHE cells were preexposed respectively to 50 or 200 μ M CLF at the initiation stage followed by two applications of TPA. When Benzo(a)pyrene was used to initiate cells, no additional effect on transformation frequency was observed following CLF treatment in promotion stage.

After treatment of SHE cells with 50 or 100 μ M CLF, the basal ODC activity decreased. In contrast treating cells with 0.16 μ M TPA for 5 h increased the ODC level to 205% as compared to untreated cells. In two stage exposure (1 h to 50 μ M CLF followed by 5 h in the presence of TPA), the ODC level increased to 270%. Moreover, when SHE cells were treated similarly (1 h to 50 μ M CLF followed by 5 h in the presence of 0.16 μ M TPA) increased activity of a 72kDa cytosolic metalloprotease has been observed. By western blot analysis, it has been shown that this 72 kDa metalloprotease reacted against class 2 matrix metalloprotease antibody. It is therefore suggested that CLF is mainly active at the initiation stage without promoting effect and clonal expansion of neoplastic cells can not be induced by CLF.

Keywords: Clofibrate, SHE, cell transformation, ODC, metalloprotease, initiation phase.

Introduction

The peroxisome proliferator agent Clofibrate (ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate, CLF) has been used in the treatment of human hyperlipidaemias. CLF administration in vivo stimulated the proliferation of hepatic cytoplasmic peroxisomes and increased the oxidation of fatty acids within the peroxisomal matrix (for review see Refs. 1, 2). The hepatocarcinogenic effect of CLF may be due to oxidative stress generated by H_2O_2 which is responsible for DNA injury and described as one of the major factor for cancer induction.^{3,4} However recent data showed that the genotoxic pathway can not be the major carcinogenic mechanism, since (i) peroxisome proliferators (PP) are generally not mutagenic in standard tests and failed to display DNA damage,⁵ (ii) rat hepatocytes treated by PP often develop resistance toward H_2O_2 .⁶ It is assumed therefore that the carcinogenic potential of these compounds cannot only be related to some genotoxic effect.^{7,8} Several epigenetic mechanisms may be involved in neoplastic cell transformation, at least in the first stage of the process.

Ornithine decarboxylase (ODC, EC. 4.1.1.17) and putrescine increased in liver following subcutaneous injection of CLF to young rats.⁹ ODC is the first and rate limiting enzyme of the biosynthesis of intracellular polyamines. The level of ODC is closely related to the cell proliferation rate.¹⁰ In addition, ODC was found to be highly expressed in human cancer as in chemically induced carcinogenesis in rodents.^{11,12} The relationship between ODC overexpression and increased transformation, was recently demonstrated in Nermalite transformed SHE cells,¹³ transformed NIH/3T3 cell line, Rat-1 fibroblasts transfected with human ODC-cDNA in sense and antisense orientations,^{14,15} and in transgenic mice harbouring human ODC-cDNA.¹⁶ In contrast, inhibition of ODC activity by α -difluoromethylornithine in mice fed with a low polyamine diet, was found to decrease tumour development. This approach is now used in clinical trials to improve some chemotherapeutic treatments.^{17,18} Moreover when human and murine leukemia cells sensitive or resistant to Adriamycin (ADR) were treated with low doses of CLF, the cytotoxic effect of ADR was enhanced in both cell types. Whereas high level of

multidrug resistance (MDR) was obtained in rat liver and primary hepatocytes when treated with the hepatocarcinogens acetylaminofluorene or methylcholanthrene.¹⁹

Our aim in this work was to study the carcinogenic potential of CLF on SHE cells within the framework of the two-stage cell transformation process (initiation and promotion). SHE cells were representative of normal diploid cells, genetically stable and capable of activating a wide spectrum of chemical carcinogens. The probability of progressing toward a neoplastic phenotype is greater for SHE cells derived from transformed colonies than for parental cells.^{20,21} In parallel, we have studied the correlation between cell transformation, ODC and metalloprotease activities.

Results

Effects of CLF on SHE cell transformation

Absence of increased transformation (0.2–0.5%) was observed following a single or double exposure of SHE cells to various concentrations of CLF. The transformation frequency increased to 3% after three successive exposures to either 25, 100 or 200 μM CLF for days 1, 3 and 5 (Table 1). When cells were exposed to 0.16 μM TPA, only 1% of transformation frequency can be observed.

However, in a two-stage transformation protocol (SHE cells were exposed to 25 or 200 μM CLF for 24 h (initiation stage) followed by two successive treatments of 0.16 μM TPA) the number of transformed colonies increased to 3.5 and 6.3%, respectively. In contrast, no additional effect was observed when cells were pretreated with the cancer initiator BaP (0.40 μM) and CLF applied at days 2 and 5 (promotion stage).

Induction of ODC activity

In order to correlate SHE cell transformation with the ODC activity cells were treated in similar conditions. After 5 h exposure to 50 or 100 μM CLF the basal ODC activity level decreased from 18 nmol decarboxylated ornithine mg^{-1} protein h^{-1} to about 10 (Table 2). In contrast the ODC activity increased to 38 after 5 h in the presence of 0.16 μM TPA. When SHE cells were cotreated with 50 μM CLF and 0.16 μM TPA, the ODC activity was reduced to 24 as compared to cells treated with only TPA. The ODC activity level increased from 200 to 270% respectively in cells treated with TPA alone or following a two stage exposure (1 h to 50 μM CLF followed by 5 h in the presence of 0.16 μM TPA (Figure 1).

To determine the potential effect of CLF at the promotion stage, cells were pretreated with BaP (0.40 μM) followed by different concentrations of CLF. As compared to untreated cells, the ODC activity level

Table 1 Effects of Clofibrate on morphological transformation of SHE cells

Treatments μM	Applications	CE ^(a) %	TF	
			Ratio ^(b)	%
(i) Clofibrate				
0	1 application (day 1)	14	1/421	0.2
25		14.8	2/444	0.5
100		12.2	0/367	0.0
200		8.9	4/267	1.5
0	2 applications (days 1, 5)	12.7	3/382	0.8
25		12.4	5/372	1.3
100		13.3	1/399	0.3
200		7.1	0/211	0.0
0	3 applications (days 1, 3, 5)	14.8	3/443	0.7
25		15	14/451	3.1*
100		15.9	14/479	2.9*
200		8.1	8/242	3.3*
(ii) Clofibrate + TPA (0.16 μM)				
0		12.8	4/384	1.0
25		13.4	14/403	3.5*
100		12.6	17/378	4.5*
200		8.5	16/256	6.3*
(iii) BaP (0.40 μM) + Clofibrate				
0		13.9	9/416	2.2
25		12.9	4/387	1.1
100		11.3	11/338	3.3
200		13.5	14/404	3.5

Morphological transformation of SHE cells were studied using the initiation-promotion protocol treatment. (i): treatment with one, two or three applications of clofibrate; (ii): sequential treatment with clofibrate followed with two applications of TPA on days 2 and 5; (iii): treatment with BaP for 24 h, followed with two applications of clofibrate on days 2 and 5.

CE: cloning efficiency; TF: transformation frequency; ^(a) determined from 10 dishes for each treatment group; ^(b) number of transformed colonies/total number of colonies; * values significantly different from respective controls ($p < 0.05$).

Table 2 Effects of clofibrate (CLF) on basal ODC level and TPA-induced ODC in SHE cells

Treatments	ODC activity	% control
Control, 5 h	18.33 ± 0.45	100.0
TPA 0.16 µM, 5 h	37.65 ± 3.28	205.5
CLF 50 µM, 5 h	10.98 ± 2.51*	60.1
CLF 100 µM, 5 h	9.07 ± 1.96*	49.7
(a)TPA + CLF, 5 h	23.87 ± 1.65†	130.6
(b)TPA: 3 h + CLF: 2 h, 5 h	20.52 ± 5.80	112.0

For cell treatment, the pH 7.2 DMEM was replaced by pH 6.7 medium with a low concentration of NaHCO₃ and phenol red, with 5% foetal calf serum.

TPA: 0.16 µM; CLF: 50 or 100 µM; (a) cotreatment TPA and CLF for 5 h; (b) CLF was added 3 h after TPA for 2 h, 5 h treatment. ODC activity expressed as nmol decarboxylated ornithine mg⁻¹ protein h⁻¹. Results are the means of two experiments performed in triplicate (mean ± SD). * ODC inhibition with CLF significantly different from control ($p < 0.05$); † inhibition of TPA-induced ODC significantly different from TPA group ($p < 0.05$).

decreased by 25% when cells were treated with BaP alone and further decrease was observed when cells were sequentially treated with BaP and CLF (Figure 2).

Protease activities

Since it is assumed that protease activities correlate with the ODC post-transcriptional regulation, the

ODC activity

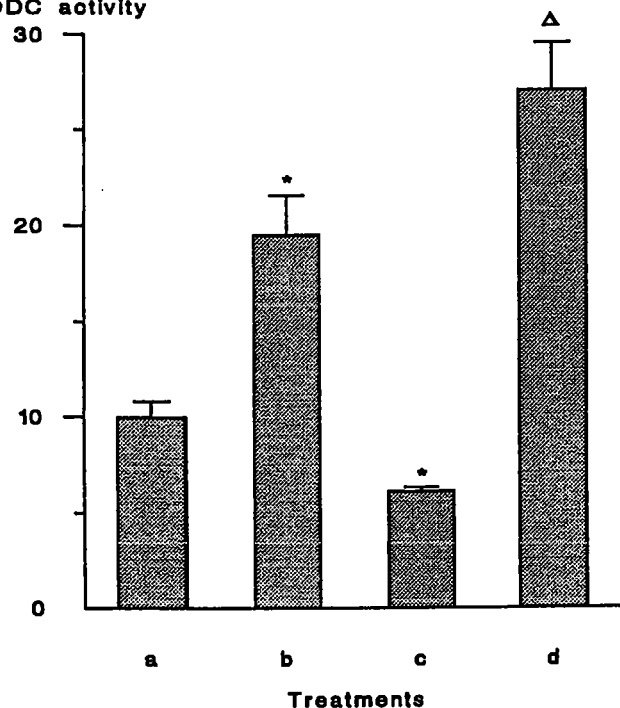


Figure 1 ODC overinduction in SHE cells stage-exposed to clofibrate (1 h initiation stage) and to TPA. ODC activity expressed as nmol decarboxylated ornithine mg⁻¹ protein h⁻¹. (a) control, pH 6.7 medium 5 h; (b) TPA 0.16 µM, 5 h; (c) clofibrate 50 µM, 5 h; (d) pretreatment with clofibrate 50 µM for one hour then removal and replacement with TPA, 5 h. * result significantly different from control ($p < 0.05$); (Δ) ODC stimulation significantly different from TPA alone (b) ($p < 0.05$). Results of triplicate determinations; a second independent experiment yielded similar results

ODC activity

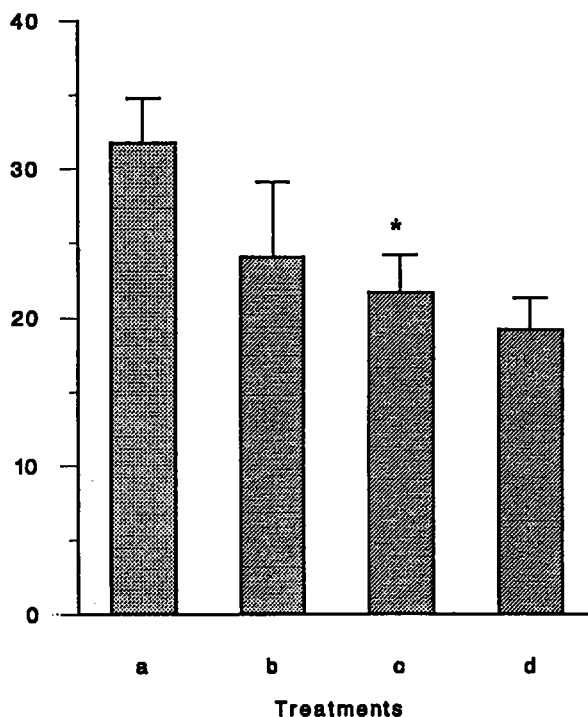


Figure 2 Effect of CLF on ODC activity in SHE cells exposed to BaP. ODC activity expressed as nmol decarboxylated ornithine mg⁻¹ protein h⁻¹. (a) control, pH 6.7 medium 5 h; (b) BaP 0.40 µM, 5 h; (c) clofibrate 50 µM, 5 h; (d) pretreatment with BaP for one hour then removal and replacement with clofibrate 50 µM, 5 h. * result significantly different from control ($p < 0.05$)

modulatory effect of CLF on protease activity has been investigated. Cytosol proteases were extracted and analysed by zymographic methods, using either gelatin or casein in substrate gels. While in the casein zymograms (indicative of cysteine protease activity), no band of proteolytic activity was identified, in the gelatin zymogram a major band of proteolysis in the vicinity of 72 kDa was detected. In cells treated 5 h with 50 µM CLF no change in the proteolytic pattern has been

Table 3 Activity of cytosolic protease in SHE cells treated with TPA and clofibrate

Treatments	Lysis area/µg protein	% control
1. Control	15.2	100
2. TPA 0.16 µM, 5 h	21.6	142
3. CLF 50 µM, 5 h	17.8	117
4. TPA + CLF, 5 h	27.4	137
5. CLF 1 h → TPA, 5 h	39.9	263

Proteolytic activities were analysed with zymographic method. Aliquots of cytosolic proteins were submitted to electrophoresis in 11% polyacrylamide resolving gel with a copolymerized α -gelatin substrate. A neutral proteinase induced gelatin lysis in the area corresponding to 72 kDa, which appears as a clear band on the blue background. Lytic areas determined with NIH Image v.1.43 programme were adjusted to µg proteins.

4. cotreatment TPA and CLF, 5 h; 5. preexposure of cells to CLF during 1 h, then the drug was removed and TPA was applied for 5 h.

observed. In contrast, when cells were treated with 0.16 μ M TPA alone or cotreated with CLF, 42% increase in a 72 kDa proteolytic band has been detected (Table 3). A more important increase (163%) was also detected after 1 h SHE cell exposure to CLF (initiation stage) followed by 5 h treatment with 0.16 μ M TPA.

To identify this 72 kDa cytosolic protease, western blot analysis using a polyclonal antibody raised against gelatinase A or MMP2 has been performed. Two small protein bands associated with a main 72 kDa were identified on the Immobilion membrane (data not shown). We suggest therefore that the cytosolic protease isolated from SHE cells corresponded to gelatinase A or MMP2.

Discussion

The results reported in this study showed that three repeated treatments of SHE cells with the hypolipidemic drug CLF, significantly increased the cell transformation frequency. In the multistage SHE cell transformation assay, the rate of transformation was higher, when CLF was applied during the initiation phase followed by treatment with the cancer promoter TPA. It has been demonstrated that cells derived from transformed colonies, exhibited growth characteristics of neoplastic cells.²¹ The high rate of cell transformation obtained with CLF was indicative of its carcinogenic potential. CLF with other peroxisome proliferators were considered as non-genotoxic carcinogens that are responsible for liver tumors in rodents.²² In view of data registered from *in vivo* experiments and since peroxisome proliferators could clonally expand initiated cells, it has been considered that they are promoters in hepatocarcinogenesis.²³ Other peroxisome proliferation-inducing plasticizer such as Diethylhexylphthalate (DEHP), did not show any promoting effect on 2-acetylaminofluorene or diethylnitrosamine-initiated liver cells.²³ Moreover, in preneoplastic foci and altered liver induced by peroxisome proliferators, glutathione S-transferase isomers differed from those induced by well known liver promoters such as phenobarbital.²⁴ Thus, it is assumed that all the peroxisome proliferators may not be carcinogenesis promoters.

Cell treatment by TPA strongly stimulated the ODC activity, whereas it was inhibited by CLF. But preexposure of the cells to CLF potentialized the inducing effect of TPA on ODC activity. Correlation between ODC activity and morphological transformation assay is observed when the two-stage protocol was used. CLF was active in the initiation stage and increased the number of transformed colonies induced by successive TPA treatments.

In SHE cells treated with the cancer initiator BaP (0.40 μ M), transformation frequency has been observed. But in cells treated with BaP (0.40 μ M), followed by CLF (at the promotion stage), the rate of ODC activity did not change nor the transformation frequency as compared to those induced by BaP alone. The mechanism by which a non-genotoxic agent like CLF may act at the initiation stage and not at the promotion stage

remains to be clarified. The action at the initiation stage has been observed with DEHP (a plasticizer, personal data) or Chlordane (a pesticide) other non-genotoxic carcinogens.²⁵ Preexposure of SHE cells to CLF even for a short time may modify the cell response to TPA: increased transformation frequency and overinduction of ODC. Recent studies indicated that ODC could be a common mediator of many oncogenes such as c-Ha-ras, neu and v-src, this may implicate the ODC gene as a proto-oncogene central for regulation of cell growth and transformation.¹⁵

In the support of previous data, post-transcriptional regulation of ODC may take place in SHE cells through the action of cytoplasmic proteinases.^{26,27} Recent studies have demonstrated the role of complex formation of specific ODC antizyme which render ODC highly susceptible to some proteolytic activities. We have observed a correlation between overinduction of ODC and overexpression of a 72 kDa cytosolic protease. In a SHE transformed cell line (SHE-Tr), similar pattern has been observed: overexpression of ODC (three times the control level) accompanied by strong proteolytic activity.¹³ We can postulate therefore that such a high level of cytosolic protease activity may be a rate limiting factor that maintains ODC and intracellular polyamines at a level compatible with survival and proliferative potency of the responding cells. Results with other cell types, this 72 kDa metalloprotease was described to be located in the extracellular matrix and suggested to participate in the metastatic process.²⁸

The assessment of carcinogenic risk for this drug is necessarily important in clinical use of CLF. In the transformed cell line SHE-Tr, overexpressing ODC, application of CLF decreased the ODC level in the same manner as did α -difluoromethylornithine, a well known ODC inhibitor. ODC inhibition correlated with a decrease of cell proliferation rate. In the multi-stage cell transformation assay with diploid cells, CLF is shown to be active at the initiation stage and not at the promotion stage. Further elucidation of this mechanism may help to assess whether when using CLF in treatment of tumour bearing organisms, the risk is minimal with regard to clonal expansion of tumoral cells.

Materials and methods

Chemicals

Clofibrate (ethyl-*p*-chlorophenoxyisobutyrate) was purchased from Sigma (France), TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) from LC Services Co, Woburn (MA, USA) : L-(1-14 C) ornithine from Amersham (U.K.), Benzo(a)pyrene from Sigma.

All other chemicals were commercial products of the highest available grade of purity. The chemicals were dissolved in acetone or dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium to the desired concentration just before use.

Cell cultures and treatments

Primary cell cultures were prepared from 13-day old golden Syrian hamster embryos, as described by Pienta *et al.*²⁰ In preliminary experiments to establish the conditions of the SHE cell transformation assay, the first

cell batch was tested for its capacity to develop transformed colonies in the presence of 4 μM of benzo(a)pyrene, only early passage diploid cells were used in the present study.

For the ODC activity assay, the cells (2×10^4) were seeded into 12-well culture plates. 72 h later they were submitted to chemical treatments as previously described.²⁶ Four treatment protocols were used to determine, (i) optimal doses of each chemical, (ii) optimal time of treatment, (iii) modulatory effect of CLF on TPA induced ODC activity, (iv) changes of ODC activity after cell exposure to CLF (initiation stage) and to TPA.

For cell transformation assays, target and feeder cells were prepared as described.²⁹ 300 target cells were seeded into 60 mm Petri dishes, onto a feeder layer of 60,000 irradiated cells in DMEM medium, pH 7.35, supplemented with 15% fetal calf serum. The cells were treated 24 h later with CLF alone or sequentially with different model carcinogens.

Cell transformation assay

Cells were seeded and after 24 h growth were treated with chemicals;²⁹ DMEM pH 7.35, 10% CO₂. On day 8, the plates were washed with PBS pH 7.4, the cells were fixed with absolute ethanol and stained with 10% aqueous Giemsa. Colonies were scored under a stereomicroscope for cloning efficiency and morphological transformation frequency. Cloning efficiency indicative of the toxic potential of chemicals, is defined as the number of colonies/number of cells plated $\times 100$, transformation frequency indicative of the carcinogenic potential of chemicals, is defined as the number of transformed colonies/total colonies scored $\times 100$.

Statistical analyses were performed using the χ^2 test or by the one-side Fischer's exact test. Three approaches for evaluating transforming effects on SHE cells were used: (i) treatment with CLF alone in one, two or three applications, (ii) sequential treatment with CLF on day 1 for 24 h, followed by two applications of TPA (0.16 μM) on day 2 and day 5, (iii) sequential treatment with BaP (0.40 μM) for 24 h, followed by one or two applications of CLF, days 2 and 5.

Assay of ODC activity

The ODC activity was determined in cell cultures by measuring the ¹⁴CO₂ released from ¹⁴C-labelled L-Ornithine as described.²⁶ Briefly, lysed cell cultures were incubated at 37°C, in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 40 mM pyridoxal phosphate, 2.5 mM dithiothreitol, 0.4 mM L-Ornithine containing ¹⁴C-labelled L-Ornithine 0.1 μCi (3.7 kBq), 0.4 ml final volume. ¹⁴C-labelled CO₂ released was adsorbed onto a filter disc (Whatman GF/C) and the radioactivity determined by liquid scintillation counting. Protein concentration was measured according to Bradford.³⁰

Assay of Protease Activities

Following the chemical treatment, the cells were washed with PBS, then scraped into 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. As previously described, the identification and quantification of neutral proteinase activities present within the cytosolic fractions, were performed by

zymography using gelatin type A (1 mg ml⁻¹) incorporated into sodium dodecyl sulfate (SDS), 11% resolving polyacrylamide minigel. Unreduced samples were subjected to electrophoresis for 45 min, at 8 mA, after which the gels were washed in 2.5% Triton X-100 and incubated in 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, 0.02% NaN₃ and 10 mM CaCl₂, at 37°C for 48 h.

The gels were fixed and stained with 0.5% Coomassie blue for 1 h and destained with acetic acid-methanol. Proteolytic activities appeared as clear bands on a blue background, the gels were scanned and the proteolytic activity was calculated from numeric images with NIH Image v.1.43 programme. Protein molecular weight markers (Amersham kit) were run on the same gel.²⁶

Western blot analysis of protease

Cytosolic proteases were characterized by immunoenzymatic assay as described by Towbin *et al.*³¹ Heated samples were electrophorised on a SDS PAGE gel (composed of a 4% stacking gel and a 10% separating gel) in a pH 8.3 Tris-Glycine-SDS running buffer. After electrophoresis, the protein was transferred to an Immobilon membrane at 30V overnight using a Bio-Rad Mini Trans-blot electrophoresis cell according to the method described. A portion of the membrane which contained molecular weight standards was stained with 0.1% Amido-Black 10 B. The remainder of the membrane was washed successively with Tris buffered saline (TBS)-Tween 20, 0.05%, TBS-BSA, 5%, TBS-milk 5%, and incubated in TBS pH 7.6 containing anti-MMP2 antibody (antigelatinase A, supplied by Dr H. Nagase) for 1 h, followed by three consecutive washes in TBS-Tween.

The membrane was incubated in a 10⁻⁴ dilution of biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (Dako), after three washes, it was incubated with a streptavidine-alkaline phosphatase complex, after three washes with TBS-Tween, the membrane was placed into developing buffer (Naphthol AS-MX phosphate free acid, N, N-dimethyl-formamide, Tris HCl pH 8.2, Levamisole and Fast Red TR-Sigma) for 10 mn. The reaction was stopped by immersion of the membrane in water.

Acknowledgements

This study was supported partly by grants from the French Ministry of Environment (Comm. 29/94), the European Community, DG XII (EEC-CT-91.0146) and Mitsuyoshi Nomura Foundation for Cancer and AIDS research. We are indebted to Dr W Hornebeck and Mrs V Foulon, for metalloprotease analysis and Dr L Pritchard for helpful discussions.

References

- 1 Reddy JK, Lalwai ND. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to human. *CRC Critical rev. Toxicology* 1983; 12: 1-58.
- 2 Rao MS, Reddy JK. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987; 8: 631-636.

- 3 Tolbert NE. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 1981; 50: 133-157.
- 4 Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-381.
- 5 Glauert HP et al. Effect of hypolipidemic peroxisome proliferators on unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes and on mutagenesis in Salmonella. *Cancer Lett.* 1984; 24: 147-156.
- 6 Garberg P, Stenius U, Nilsson K, Högborg J. Peroxisome proliferation and resistance to hydrogen peroxide in rat hepatocytes: is development of resistance an adaptation to cytotoxicity. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1751-1758.
- 7 Von Däniken A, Lutz WK, Schlatter C. Lack of covalent binding to rat liver DNA of the hypolipidemic drugs Clofibrate and Fenofibrate. *Toxicology Lett.* 1981; 7: 311-319.
- 8 Mikalsen SO, Holen I, Sanner T. Morphological transformation and Catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and Nickel sulfate. *Cell Biol. and Toxicology* 1990; 6: 1-13.
- 9 Fukami MH et al. Relation between induction of ornithine decarboxylase and specific gene expression in rat liver in response to the tumor promoter agent Clofibrate. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1441-1446.
- 10 Heby O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 1981; 19: 1-20.
- 11 O'Brien TG. The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly, obligatory event in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 1976; 36: 2644-2653.
- 12 Okuzumi J et al. Increase mucosal ornithine decarboxylase activity in human gastric cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 1448-1451.
- 13 Nguyen-Ba G et al. Overexpression of Ornithine decarboxylase and intracellular proteinase in SHE transformed cells. In: Li FP and Montesano R. (eds), *Interaction of cancer susceptibility genes and environmental carcinogens* Joint meeting AACR and IARC, A19. Lyon Nov. 1993, France.
- 14 Moshier JA, Dosescu J, Skunca M, Luk GD. Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Res.* 1993; 53: 2618-2622.
- 15 Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Hölta E. Ornithine decarboxylase is critical for cell transformation. *Nature* 1992; 360: 355-358.
- 16 Jänne J, Alhonen L, Halmekytö M, Hytinen JM. Transgenic mice overproducing putrescine in their tissues. In: Nishioka K. (ed), *Intern. Symp. Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches*, Vol. 22, Montgomery, Texas Nov. 1992. The University of Texas: MD Anderson Cancer Center, Houston (TX) USA.
- 17 Quemener V, Moulinoux JP, Havonis R, Seiler N. Polyamine deprivation enhances antitumoral efficacy of chemotherapy. *Anticancer Res.* 1992; 12: 1447-1454.
- 18 Mc Cann PP, Pegg AE. Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol. Ther.* 1992; 54: 195-215.
- 19 Thorgeirsson SS, Silvermann JA, Grant TW, Marino PA. Multidrug resistance gene family and chemical carcinogens. *Pharmac. Therap.* 1991; 49: 283-292.
- 20 Pienta RJ, Pooley JA, Lebhertz WB. III Morphological transformation of early passage Golden syrian hamster embryo derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer* 1977; 19: 642-655.
- 21 LeBoeuf RA, Kerckaert GA, Aardema RJ, Gibson DP. Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Res.* 1990; 50: 3722-3729.
- 22 Nilsson R et al. On the mechanism of the hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators. *Chem. Biol. Interactions* 1991; 78: 235-250.
- 23 James NH, Roberts RA. The peroxisome proliferator class of non-genotoxic hepatocarcinogens synergize with epidermal growth factor to promote clonal expansion of initiated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2687-2694.
- 24 Hasegawa R et al. Phenotypic alteration of hepatocellular foci in rats treated with clofibrate and phenobarbital. *Cancer Lett.* 1994; 83: 89-95.
- 25 Bessi H et al. Synergistic effects of Chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis* 1995; 16: 237-244.
- 26 Nguyen-Ba G et al. Modulatory effect of Dexamethasone on Ornithine decarboxylase activity and gene expression: a possible post-transcriptional regulation by a neutral metalloprotease. *Cell Bioch. and Function* 1994; 12: 121-128.
- 27 Pegg AE, Shantz LM, Coleman CS. Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. *Bioch. Soc. Transactions* 1994; 22: 846-852.
- 28 Nagase H. Matrix Metalloproteinases. Metalloproteinases and TIMP. In: Koide H, Hayashi T (eds), *Extracellular Matrix in the Kidney*, Karger, Basel, 1994; 107: 85-93.
- 29 Bessi H, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P. Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit GAP junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *The cancer JI.* 1994; 7: 248-253.
- 30 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- 31 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4350-4354.

ANNEXES II à VI

ANNEXE II

Cancérogènes non-génotoxiques.

Toutes les substances présentées ici induisent une réponse négative chez *Salmonella*,
(adapté de Ashby et Tennant, 1991).

substance	réponse	substance	réponse
1. aniline, HCl	R	5-chloro- <i>o</i> -toluidine	S
4,4'-sulfonyldianiline	R	4-chloro- <i>o</i> -toluidine, HCl	s
N-phenyl-2-naphthylamine	(s)	roxarsone	(r)
rhodamine 6G, HCl	(r)		
2. chlorinated paraffins	R, S	polybrominated biphenyl	R, S
2,3,7,8-TCDD	R, S	2,4,6-trichlorophenol	R, S
chlorendic acid	R, S	1,4-dichlorobenzene	R, S
tetrachloroethylene	R, S	hexachloroethane	R, S
pentachlorophenol	R, S	1,1,2-trichloroethane	S
monuron	R	chlordane	s
chlorobenzilate	s	chlorothalonil	r
decabromodiphenyl oxide	r	dichlorodiphenyldichloro-	
heptachlor	s	ethylene	s
trichloroethylene	s	pentachloroethane	s
aldrin	(s)	1,1,1,2-tetrachloroethane	s
dicofol	(s)	1,1,2,2-tetrachloroethane	s
furosemide	(s)	chlorobenzene	(r)
stannous chloride	(r)	2,7-dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	(s)
tetrachlorodiphenylethane	(r)	dieldrin	(s)
hydrochlorothiazide	(s)	picloram	(r)
3. benzene	R, S	reserpine	R, S
di(2-ethylhexyl)phthalate	R, S	hydroquinone	R, S
nitrilotriacetic acid	R, S	11-aminoundecanoic acid	R
zearalenone	S	benzyl acetate	S
2-mercaptobenzothiazole	R	nalidixic acid	R
di(2-ethylhexyl)adipate	s	butyl benzyl phthalate	(s)
tris(2-ethylhexyl)phosphate	(s)	piperonyl sulfoxide	(s)
α -methylbenzyl alcohol	(r)	bisphenol A	(r)
methyldopa sesquihydrate	(s)	dimethyl terephthalate	(s)
oxytetracycline hydrochloride	(r)	propyl gallate	(r, s)
rotenone	(r)	ampicillin trihydrate	(r)
diphenylhydramine, HCl	(r)	4-hexylresorcinol	(s)
sodium fluoride	(r)		

substance	réponse	substance	réponse
4. allyl isovalerate	R, S	cinnamyl anthranilate	R, S
1,4-dioxane	R, S	benzofuran	R, S
furfural	R, S	phenylbutazone	R, S
N, N'-diethylthiourea	r	N-nitrosodiphenylamine	r
benzaldehyde	s	isophorone	(r)
trimethylthiourea	(r)	melamine	(r)
ziram	(r)	d-limonene	(r)
diallyl phthalate	<i>(r, s)</i>	eugenol	<i>(s)</i>
2,5-dithiobiurea	<i>(s)</i>	fluometuron	<i>(s)</i>
ethyl tellurac	<i>(r, s)</i>		
5. phenesterin	R, S	dimethyl-	
tetrachlorvinphos	R, S	morpholinophosphoramidate	r
tris(2-chloroethyl)phosphate	r	dimethyl methylphosphonate	(r)
pentaerythritol tetranitrate	<i>(r)</i>	2-chloroacetophenone	<i>(r)</i>

1. Composés aromatiques aminés ou nitrosés.
 2. Composés comportant un/des halogène(s) non-réactif(s).
 3. Composés sans groupement électrophile.
 4. Composés ne comportant pas de groupement à risque ("structural alert").
 5. Electrophiles naturels comportant des groupements halogénés réactifs.
- R** : cancérogène chez le rat, multiplicité des organes cibles.
- r** : cancérogène chez le rat, sur un organe.
- S** : cancérogène chez la souris, multiplicité des organes cibles.
- s** : cancérogène chez la souris, sur un organe.
- (entre parenthèses et en gras)** : cancérogène chez une seule espèce/sexe/organe.
- (entre parenthèses et en italique)** : preuves de cancérogénicité équivoques.

ANNEXE III

Effets de divers cancérogènes ou promoteurs sur les GJIC mis en évidence par :

1. l'essai d'inhibition de la coopération métabolique (CM) entre cellules V79,
2. le transfert de jaune de Lucifer (TC) après microinjection dans des cellules de types variés.

Adapté de Budunova et Williams (1994), la liste des composés présentée par ces auteurs comprend, en plus de ceux inclus dans ce tableau, des produits dont les effets sur les GJIC ont été évalués sans que leur activité *in vivo* ne soit connue.

substance	activité <i>in vivo</i> ^a	effet sur la CM ^b	effet sur le TC ^c
Phorbols et substances apparentées			
phorbol	P	0/–	–
phorbol-12,13-diacetate	P	0	0
4- <i>O</i> -methyl-TPA	P	0/–	0
phorbol-12,13-dibutyrate	P	–	–
phorbol-12,13-didecanoate	P	–	–
TPA	P	–	–
mezerein	P	–	–
12- <i>O</i> -retinoylphorbol-13-acetate	P	nt	–
Acides biliaires			
chenodeoxycholic acid	+/-	–	nt
cholic acid	+/-	0	nt
deoxycholic acid	P	0/–	0
lithocholic acid	P	–	0
Acides gras et lipides			
linoleic acid	P	–	nt
cholesterol-5 α ,6 α -epoxide	C?	–	nt
Composés organochlorés			
bromopropylate	non C	–	nt
carbon tetrachloride	C, P	0*	–
chloropropylate	non C	–	nt
chloroform	C, P	0*	–
aldrin	C, P	–	nt
α -benzene hexachloride	C	0/–	nt
β -benzene hexachloride	non C	0	nt
γ -benzene hexachloride	C?	–	nt
chlordane	C, P	–	–
chlorobenzilate	C, P	–	–**
DDT	C, P	–	–
DDE	C	–	nt
TDE	C	–	nt

dicofol	C, P	—	nt
dieldrin	C	—	—
endrin	C?	—	nt
heptachlor	C, P	—	—
kepone	C	—	nt
lindane	C, P	—*	—
methoxychlor	C	—	nt
mirex	C	—	nt
trichloroethylene	C, P	nt	0/—
trichloroacetic acid	C	nt	0/—
Biphényles polyhalogénés			
polybrominated biphenyls (mixture)	C	—	nt
2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	—	nt	0/—
3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl	P	nt	0
2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl	P	nt	—
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	P	nt	—
2,2',4,4',5,5'-hexabrombiphenyl	P	nt	—
Cycles benzeniques substitués			
catechol	—	0/—	nt
hydroquinone	C	—	nt
phenol	P	0/—	nt
pyrogallol	—	0/—	nt
quinol	—	0	nt
aniline	C	0	nt
2,4-dinitrifluorobenzene	P	—	nt
nitrophenylene diamine hair dyes - HC blue 1	C	—	nt
Peroxydes			
benzoyl peroxide	P	—*	0
hydrogen peroxide	C, P	0	—**
t-butyl hydroperoxide	P	0/—	nt
Antioxydants			
ascorbate	P	0	0
butylated hydroxyanisole	C, P	—	—
butylated hydroxytoluene	P	—	0/—
DPPD-(N,N'-diphenyl-1,4-phenylenediamine)	AP	0*	0**
superoxide dismutase	AP	0*	nt
all-trans-retinoic acid	AP	0/—	nt
vitamine E	AP	0*	0
Alcanes			
n-dodecane	P	0	nt
1-phenyldodecane	P	0	nt

Barbiturates			
amobarbital	–	–	nt
phenobarbital	P	0/–	+0/–
sodium barbital	P	nt	–
Proliférateurs des peroxyosomes			
di(2-ethylhexyl)phthalate	C, P	–	nt
nafenopin	C	–	nt
Hormones et facteurs de croissance			
dexamethasone	AP	0	nt
diethylstilbestrol	C	0	nt
estradiol	P	0	nt
fluocinolone acetonide	AP	0	nt
stilbestrol dipropionate	C	0	nt
TGF-β	P in vitro	nt	+0/–
Rétinoïdes			
retinoic acid	AP	nt	+
retinol	AP	nt	+
Caroténoïdes			
canthaxanthin	AC	nt	+
α-carotene	AC	nt	+
β-carotene	AC	nt	+
lutein	AC	nt	+
lycopene	AC	nt	+
methylobixin	AC	nt	+
Métabolites naturels			
L-isoleucine	P	–	nt
L-leucine	P	–	nt
D,L-tryptophan	P	–	nt
urea	P	–	nt
uracil	P	nt	0
Edulcorants			
saccharin	C, P	0/–	nt
sodium cyclamate	P	0/–	nt
sucrose	P?	–	nt
Fibres minérales			
UICC amosite	C	0	0
chrysotile asbestos	C	nt	0
glass fibers	C	nt	0
Mélanges complexes			
Asphalt fume condensate (AFC)	C, P	–	–
AFC fractions	P	–	–
cigarette smoke condensate	C, P	–	–

Divers			
antipain	AP	0	nt
leupeptin	AP	0	nt
anhydrodebromaplysiatoxin	+/-	-	nt
aplysiatoxin	P	-	nt
debromoaplysiatoxin	P	-	nt
palytoxin	P	0	nt
resiniferotoxin	-	0	nt
teleocidin	P	-	-
vomitoxin	P	-	nt
streptozotoxin	C	nt	-
nickel (II) chloride	C	-	nt
NiSO ₄	C	-*	-
cyclic AMP	AP	0	+/-
quercetin	AP	0	nt
anthralin	P	-	0/-
benzo(e)pyrene	P	0	0
diazepam	-	0/-	nt
diphenylhydantoin	C	-	nt
ethyl phenyl propiolate	+/-	-	nt
formaldehyde	C	0/-	nt
β-hydroxyanthralinic acid	C	-	nt
iodoacetic acid	P	0/-	nt
1-naphthylamine	non C	-	nt
thalidomide	T	0	nt
trisodium nitrilotriacetate monohydrate	C, P	-	-
DL-ZAMI 1305 (β-blocker)	C	nt	-
okadaic acid	P	nt	0
pH decrease	P in vitro	nt	-
lovastatin	C	nt	+
4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)	C	nt	-

^a P = promoteur ; - = analogue sans activité promotrice ; +/- = promoteur faible ; C = cancérigène ; AP = antipromoteur ; T = tératogène.

^b CM évaluée sur les cellules de la lignée V79 HGPRT⁺ et HGPRT⁻ avec du milieu contenant de la 6-thioguanine ; sauf * (milieu "HAT" ou autre).

^c TC évalué par microinjection de cellules variées ; sauf ** ("scrape loading" ou redistribution de la fluorescence après "photobleaching").

0 = pas d'effet ; - = inhibition des communications ; + = augmentation des communications ; nt = non testé ; 0/- ou +/- ou +/0- = résultat variable.

ANNEXE IV

Substances induisant la prolifération peroxysomale, adapté de Ashby *et al*, 1994.

Substance	n° CAS	Substance	n° CAS
acetylsalicylic acid	50-78-2	2,2,4,4,6,8,8-heptylmethyl	
beclobric acid	71548-88-4	nonane	4390-04-9
benzbromarone	3562-84-3	hexanoic acid	142-62-1
BBP	858-68-7	lactofen	3513-60-4
bezafibrate	41859-67-0	LK903	35704-01-9
bis(carboxymethyl		LS2265	72178-02-0
thio)-1,10-deacane	32827-49-9	LY 171883	88107-10-2
BR-931	65089-17-0	medica 16	87272-20-6
chlorinated paraffins (C ₁₂₋₁₄)	63449-39-8	methyl chlorophenoxyacetic	
cinnamyl anthranilate	3562-84-3	acid	94-74-6
ciprofibrate	52214-84-3	MCP	21340-68-1
citral	5392-40-5	1-mono(carboxyethylthio)	
clobuzarit	22494-47-9	tetradecone	1462-53-9
clofibrate	637-07-0	1-mono(carboxymethylthio)	
clofibric acid	882-09-7	tetradecone	2921-20-2
DG5685	79539-54-1	MEHP	4376-20-9
DH6463	79539-57-4	mono-n-octyl phthalate	5393-19-1
dibutyl phthalate	84-74-2	nafenopin	3771-19-5
2,4-D	94-75-7	niadenate	62601-22-1
DEHA	103-23-1	OKY-1581	75987-18-7
di(2-ethylhexyl)phosphate	298-07-7	perchloroethylene	127-18-4
DEHP	117-81-7	perfluorobutyric acid	375-22-4
di(2-ethylhexyl) sebacate	122-62-3	perfluorodecanoic acid	335-76-2
dihydroepiandrosterone		perfluorooctanoic acid	335-67-1
acetate	53-43-0	perfluoroocetyl sulphuric	
diisodecyl phthalate	26761-40-0	acid	1763-23-1
DINP	28553-12-0	RMI-14514	54857-86-2
dimethrin	70-38-2	S-8527	30299-08-2
diundecyl phthalate	3628-20-2	SaH-442348	22204-91-7
DL-040	99208-92-1	simfibrate	14929-11-4
ethyl 4-(chlorophenoxy)		tiadenol	6064-20-1
butanoate	78573-55-4	tibric acid	37087-94-8
2-ethylhexanoic acid	149-57-5	trichloroacetic acid	76-03-9
2-ethylhexanol	104-76-7	trichloroethylene	79-01-6
2-ethylhexylaldehyde	123-05-7	2,4,5-T	93-76-5
fenofibrate	49562-28-9	2,2,4-trimethylpentane	540-84-1
gemcadiol	35449-36-6	tridiphane	58138-08-2
gemfibrozil	25812-30-0	valproic acid	99-66-1
halofenate	26718-25-2	Wy 14,643	50892-23-4
hexadecanedioic acid	505-54-4		

ANNEXE V

Composition des milieux utilisés pour les cultures cellulaires : milieux de culture DMEM (GIBCO-BRL), DMEMM (HyClone) et DMEM modifié par LeBoeuf (LMDMEM).

composition en mg/l	DMEM	DMEMM	LMDMEM
Acides aminés			La composition exacte de ce milieu n'est pas connue. Nous ne mentionnons ici que les éléments dont nous sommes sûr qu'ils diffèrent d'avec les deux autres milieux.
L-arginine, HCl	84,0	84,0	
L-cystéine	48,0	48,0	
L-glutamine	584,0	584,0	
glycine	30,0	30,0	
L-histidine, H ₂ O	42,0	42,0	
L-isoleucine	105,0	105,0	
L-leucine	105,0	105,0	
L-lysine, HCl	146,0	146,0	
L-méthionine	30,0	30,0	
L-phénylalanine	66,0	66,0	
L-sérine	42,0	42,0	
L-thréonine	95,0	95,0	
L-tryptophane	16,0	16,0	
L-tyrosine	72,0	72,0	
L-valine	94,0	94,0	
Vitamines			
acide folique	4,0	4,0	
choline, Cl	4,0	4,0	
I-inositol	7,2	7,2	
nicotinamide	4,0	4,0	
D-Ca-pantothenate	4,0	4,0	
pyridoxal, HCl	4,0	4,0	
riboflavine	0,4	0,4	
thiamine, HCl	4,0	4,0	
Sels et autres			
pyruvate de sodium	110,0	110,0	
KCl	400,0	400,0	
CaCl ₂ (anhydre)	200,0	200,0	
NaCl	6400,0	6400,0	
NaHCO ₃	3700 (pH 7,35) 2200 (pH 7,0)	750 (pH 6,7)	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	125,0	125,0	
Fe(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	0,1	0,1	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	200,0	158	
MgCl ₂ , 6H ₂ O	/	/	
glucose	1000,0	1000,0	
rouge de phénol	15,0	5,0	

ANNEXE VI

Tampons et réactifs nécessaires à la réalisation du "SDS-PAGE/Western blot."

1. Solution de PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} .

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na_2HPO_4	5,75 g
KH_2PO_4	1,0 g
eau distillée	qsp 5 l

2. Tampon d'échantillonnage.

tris base	1,211 g
glycérol	15,0 g
sodium dodécyl sulfate	1,0 g
bleu de bromophénol	10,0 mg
β -mercaptoéthanol	5,0 ml
eau distillée	qsp 100 ml

Divisé en 5x20 ml et conservé à -20°C .

3. Tampon d'électrophorèse (10x).

tris base	30,275 g
glycine	144,1 g
sodium dodécyl sulfate	10,0 g
eau distillée	qsp 1 l

Dilué avec de l'eau distillée froide juste avant utilisation, non réutilisé

4. Tampon de blot (10x).

Solution A : tris base	30,275 g
glycine	144,1 g
eau distillée	qsp 1 l

Tampon de blot :	solution A	200 ml
	méthanol	400 ml
	eau distillée	qsp 2 l

Conservé à 4°C , utilisé deux ou trois fois.

5. Solution de révélation.

13 mg de chloronaphtol dissouts extemporanément dans 10 ml de méthanol et mélangés à 50 ml de PBS et 50 μl d' H_2O_2 . Ne se conserve pas.

6. Gel de séparation (4 gels).

Tampon A :

tris base	18,055 g
sodium dodécyl sulfate	0,4 g
eau distillée	qsp 100 ml

pH ajusté à 8,8 avec HCl, conservé à température ambiante.

Acryl/bis :	acrylamide	30 g
	bisacrylamide	0,8 g
	eau distillée	qsp 100 ml (73ml)

Conservé à température ambiante.

APS : ammonium persulfate à 10% dans de l'eau distillée, préparé extemporanément.

Gel :	acryl/bis	5 ml
	Tampon A	5 ml
	TEMED	10 μ l
	APS	100 μ l
	eau distillée	9,8 ml

3 à 4 h sont nécessaires à l'obtention d'une polymérisation complète.

7. Gel de concentration (4 gels).

Tampon B :

tris base	6,088 g
sodium dodécyl sulfate	0,4 g
eau distillée	qsp 100 ml

pH ajusté à 6,8 avec HCl, conservé à température ambiante.

Gel :	acryl/bis	1 ml
	Tampon B	1,9 ml
	TEMED	5 μ l
	APS	50 μ l
	eau distillée	4,5 ml

Gel réparti au dessus du gel de séparation, ½ h de polymérisation.