

Article original / Original article

Induction d'apoptose par la p-Phénylènediamine dans un myélome murin

p-Phenylenediamine induces apoptosis in murine myeloma cells

Ghita Benzakour¹, Noredine Habti^{2,3}, Mounia Oudghiri^{2*}, Abdallah Naya¹, Ouafaa Elmaataoui⁴, Brahim Farouqui⁴, Noufissa Benchemsi³, Said Motaouakkil²

¹ Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Hassan II Ain Chock, Route El Jadida, BP 5366, Maârif, Casablanca, Maroc

² Laboratoire de Médecine Expérimentale, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Hassan II Ain Chock, Casablanca, Maroc

³ Laboratoire de Génie Génétique et Cellulaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Hassan II Ain Chock, Casablanca, Maroc

⁴ Laboratoire d'immunologie, CHU Ibn Rochd, Casablanca, Maroc

Résumé – Objectif : Les mécanismes de toxicité et de génotoxicité induits par la Para-phénylèneDiamine (p-PD), un composant de la teinture pour cheveux suspecté d'être carcinogène, sur des cellules tumorales murines, type P3X63Ag8.653 ont été étudiés. **Méthodes :** L'effet de la p-PD sur la viabilité et celui sur la prolifération cellulaire ont été évalués par la méthode d'exclusion du bleu de trypan. Son effet sur l'ADN des cellules P3X63Ag8.653 a été analysé après une extraction d'ADN et une électrophorèse sur gel d'agarose puis confirmé par la technique TUNEL en cytométrie en flux. **Résultats :** Un blocage de la prolifération avec diminution de la viabilité cellulaire ont été observés. La fragmentation de l'ADN dose-dépendante témoignant de l'effet apoptotique a été détectée sur gel d'agarose et confirmée par cytométrie en flux (technique TUNEL). **Conclusion :** Les résultats obtenus montrent que la p-PD induit *in vitro* un blocage de la prolifération cellulaire et une apoptose dose-dépendante des cellules tumorales murines.

Mots clés : Para-phénylèneDiamine (p-PD), apoptose, cellules tumorales murines, toxicité, teinture capillaire

Abstract – Aims: The mechanism of toxicity and genotoxicity of p-Phenylenediamine (p-PD), a component of human permanent hair dye and suspected to be a carcinogen, on the growth of murine tumor cells (P3X63Ag8.653) was investigated. **Methods:** The effect of p-PD on cell viability and proliferation was evaluated by the trypan blue exclusion method. The effect on the P3X63Ag8.653 cell DNA was analyzed by gel electrophoresis and confirmed by flow cytometry analysis (TUNEL technique). **Results:** A dose-dependent DNA fragmentation analyzed by gel electrophoresis shows a strong correlation with the flow cytometry analysis (TUNEL technique), suggesting that the effect of p-PD on overall viability and proliferation is mediated by DNA damage and an increase in apoptosis. **Conclusion:** The results suggest that the effect of p-PD on overall viability and proliferation of murine tumor cells is mediated by DNA damage and an increase in apoptosis in a dose-dependent manner.

Key words: Para-Phenylenediamine (p-PD), apoptosis, murine tumor cells, toxicity, permanent hair dye

Reçu le 23 mars 2010, accepté après modifications le 31 mars 2011

Publication en ligne le 8 juin 2011

1 Introduction

La ParaphénylèneDiamine (p-PD) ou Para-aminobenzène est une amine aromatique dérivée de la famille des anilines, utilisée depuis 1863 par les femmes comme teinture capillaire noire ou adjuvant au henné pour les tatouages dans plusieurs pays d'Afrique et du Moyen Orient. Elle est également très utilisée en milieu industriel pour la teinture des fourrures et du textile, dans la fabrication d'articles domestiques, d'agents

cosmétiques, des pneus et des caoutchoucs, dans la synthèse du plastique ou comme révélateur photographique [1,2].

Sa disponibilité, en absence de réglementation, a conduit vers d'autres utilisations notamment dans un but d'autolyse ou d'avortement. Ses effets toxiques apparaissent en général entre 1 h à 3 h après son ingestion. Les symptômes d'intoxications à la p-PD sont stéréotypés : un œdème cervico-facial et pharyngo-laryngé à l'origine du syndrome asphyxique est d'abord observé nécessitant une trachéotomie ou une intubation en urgence. Ensuite, une lyse musculaire diffuse à

* Correspondance : Mounia Oudghiri, oudghiri.m@menara.ma

partir de la 24^e heure affectant tous les muscles squelettiques. Finalement, la néphrotoxicité par les dérivés de la p-PD se manifeste par une oligurie avec émission d'urines foncées très caractéristiques [2–5]. L'application cutanée de la p-PD cause des inflammations caractérisées par des irritations aiguës, suivies d'ampoules, de plaies purulentes, de rougeurs et de desquamations de la région en contact avec la p-PD [6].

Plusieurs études expérimentales ont étudié la toxicité de la p-PD au niveau musculaire. Mascres et Jasmin [7] ont observé chez le rat des lésions musculaires diaphragmatiques. Munday et coll. [8] ont constaté après une injection en sous-cutanée de la p-PD chez le rat une nécrose musculaire de sévérité variable touchant le diaphragme et la langue. Dans une autre étude chez le rat [9] une rhabdomyolyse aiguë avec nécrose segmentaire des myofibrilles, une prolifération des cellules satellites et une infiltration par des macrophages ont été observées à la 72^e heure.

Le tableau clinique de l'intoxication par la p-PD était expliqué depuis longtemps par l'approche physiopathologique classique où la plupart des manifestations étaient automatiquement imputées à la rhabdomyolyse [3, 5, 10]. Cependant, de nouvelles constatations expliquent le rôle immunogénique de la p-PD [11], et surtout de ses dérivés d'oxydation dans la genèse de la dermatite de contact.

Les études *in vitro* ont montré que la p-PD, comme plusieurs autres amines aromatiques de la famille des anilines peut réagir avec l'ADN et provoquer des cassures [12]. L'effet génotoxique de la p-PD a été montré dans plusieurs études [13–15]. Guarrigue et coll. et Chye et coll. ont également mis en évidence les propriétés génotoxiques de la p-phénylènediamine et de ses dérivés acétylés [12, 16]. Picardo et coll. ont démontré que la p-phénylènediamine à de faibles concentrations (plus que 10 microgrammes/mL) et pour des temps d'exposition courts (0,5 h) augmentait la prolifération des kératinocytes, mais qu'à de fortes concentrations et pour des temps d'exposition longs, induisait un blocage du cycle cellulaire et une toxicité [17]. D'autres études ont révélé que la p-PD serait mutagène du fait qu'elle était capable de provoquer des mutations dans le TP53 et par conséquent une augmentation de l'expression et de l'accumulation de la protéine p53 mutée [18]. Il en résulte un dérèglement dans le contrôle du cycle cellulaire aboutissant à une tumeur [11, 12]. En effet la p-PD a été associée à plusieurs cancers notamment des leucémies [19–23]. Par contre d'autres auteurs suggèrent que la toxicité de la p-PD serait due à une stimulation de l'apoptose suite à une augmentation dose-dépendante de l'activité de l'oncoprotéine p53 non mutée [18, 24, 25]. L'apoptose est un processus régulé qui implique l'expression de gènes distincts qui protègent la cellule des altérations tumorigéniques. Une cellule qui est incapable d'échapper à l'apoptose après l'action d'un agent génotoxique démarre un processus cancérogène.

La p-PD présente un intérêt dans les études des voies d'apoptose et de génotoxicité. En chimiothérapie, le contrôle des cancers peut être effectué par des molécules apoptotiques qui permettent la régulation de la prolifération cellulaire et dont les effets cliniques indésirables sont minimes ou inexistantes.

Toutes ces études ont été réalisées sur des cellules normales en culture primaire, jamais sur des cellules tumorales.

L'objet de cette étude était d'évaluer les effets génotoxiques de la p-PD *in vitro* sur des cellules tumorales murines et d'explicitier son mode d'action.

2 Matériel et méthodes

2.1 Conditions de culture de la lignée cellulaire

Le myélome P3X63Ag8.653 de souris Balb/c (European Collection of Cell Cultures, Grande Bretagne) a été utilisé. Les cellules ont été suspendues à 1×10^5 cellules/mL dans du milieu de culture RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) contenant du sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 10 % (Sigma-Aldrich, USA), de la pénicilline à 100 UI/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL, du glucose à 4 g/L, de la L-glutamine à 0,3 g/L et mises en culture à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Tous les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions de culture avec des cellules en phase exponentielle suspendues à 2×10^5 cellules/mL dans des flacons de 25 cm² ou dans des plaques de 6 puits. Les cultures ont été maintenues pendant 5 jours en absence ou en présence de différentes concentrations de p-PD. Le contrôle positif de l'effet apoptotique sur les cellules a été réalisé en remplaçant la p-PD par de la dexaméthazone à 200 nM.

2.2 Test d'évaluation de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité cellulaire a été évaluée durant les 5 premiers jours de culture par numération quotidienne au bleu de trypan.

2.3 Test de prolifération

Cinq cents cellules ont été réparties dans des plaques de 96 puits à raison de 5 cellules/puits. Trois plaques contenant différentes concentrations de la p-PD et une plaque contrôle sans p-PD ont été préparées. L'incubation a duré 4 jours dans les mêmes conditions de culture décrites ci-dessus. Le pourcentage de prolifération a été calculé après comptage au microscope des puits présentant une prolifération cellulaire.

2.4 Test d'évaluation de la génotoxicité (fragmentation d'ADN sur gel d'agarose)

Les cellules cultivées en absence ou en présence de p-PD à différentes concentrations ou en présence de dexaméthazone ont été récupérées. L'ADN a été extrait par la technique du chlorure de sodium décrite par Miller et coll. en 1988 [20]. La lyse des cellules a été effectuée par du dodécyl sulfate de sodium (SDS) 20 %. L'ADN nucléaire a été dénudé des protéines par l'ajout de la protéinase K à 10 µg/mL dans du tampon NaCl 5 M, EDTA 0,5 M pH 8. Le mélange a été incubé 30 mn à 56 °C puis 100 µL d'une solution de NaCl 6 M ont été rajoutés. L'ADN a été précipité par 900 µL d'éthanol absolu et centrifugé 10 mn à 1000 g. Le culot a été suspendu dans 1 mL

d'éthanol 70 % et centrifugé 10 mn à 1000 g avant d'être séché et reconstitué dans 100 µL du tampon tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 8. Les échantillons d'ADN ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 % contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. La migration électrophorétique a été réalisée dans un tampon tris-borate-EDTA 2 h à 50 V. Le gel a été photographié sous une lampe UV.

2.5 Évaluation de l'apoptose par la technique TUNEL

La technique TUNEL a été réalisée à l'aide d'un Kit pour la détection et la quantification des cellules apoptotiques (MEBSTAIN Apoptosis Kit Direct – Beckman Coulter, France).

Un million de cellules a été lavé et centrifugé 2 min à 700 × g. Les cellules ont été fixées 30 min à -20 °C dans 200 µL de para formaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon NaH₂PO₄ 0,1 M pH 7,4. Les cellules fixées ont été ensuite lavées 2 fois et centrifugées 3 min à 700 × g à température ambiante, puis reprises dans 200 µL d'éthanol à 70 % et incubées 30 min à -20 °C afin de perméabiliser les membranes plasmiques. Les cellules ont été ensuite lavées et reprises dans du tampon mix contenant le tampon TdT, les nucléotides marqués à la FITC (FITC-dUTP) et la « terminal deoxynucleotidyl transférase » (TdT) puis incubées 1 h à 37 °C. Les cellules lavées sont reprises à nouveau dans du tampon phosphate PBS à 0,2 % de BSA et conservées à 4 °C à l'obscurité pendant 24 h. Les lavages ont été réalisés dans 1 mL de PBS à 0,2 % de BSA. Le contrôle négatif était une suspension cellulaire sans aucun traitement toxique et sans TdT préparé dans le tampon mix. Le contrôle positif était une suspension cellulaire traitée par de la dexaméthazone à 200 mM dans les mêmes conditions expérimentales que les autres échantillons. La lecture de la fluorescence a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux (Facs Calibur, Becton Dickinson, États-Unis).

3 Résultats

3.1 Effets des différentes doses de p-PD sur la prolifération et la viabilité du myélome P3X63Ag8.653 en fonction des différentes phases de la culture cellulaire

La figure 1 montre qu'à 18,5 µM, la p-PD ralentit la croissance cellulaire entre le premier et le deuxième jour. Au-delà elle n'a plus d'effet. À la dose de 46,3 µM la prolifération est freinée et après trois jours de culture on note une mort cellulaire totale.

Au pic de la phase exponentielle correspondant au 3^e jour de culture, une seconde dose de p-PD a fait chuter la viabilité et la prolifération cellulaire pour les deux doses testées.

La mesure de l'effet des concentrations croissantes de p-PD (18,5 µM, 46,3 µM) sur le taux de prolifération d'un nombre restreint de cellules P3X63Ag8,653 (5 cellules par puits) a révélé qu'il était de 1 % pour la dose de 18,5 µM de p-PD et de 0 % pour 46,3 µM alors qu'il était pour les cellules non traitées de 100 % de prolifération après 4 jours de culture.

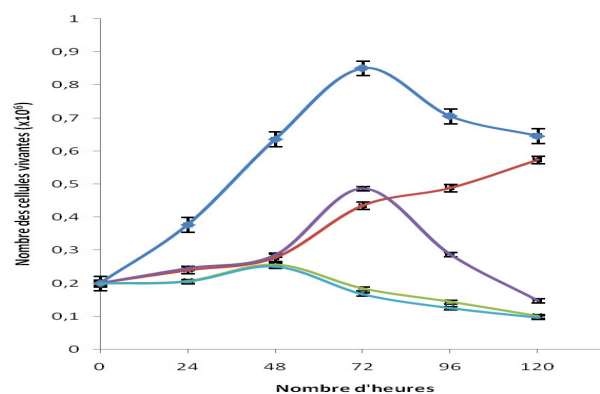


Fig. 1. Effets des différentes doses de p-PD sur la prolifération et la viabilité du myélome P3X63Ag8,653 en fonction des différentes phases de la culture cellulaire. Les cellules ont été mises en culture à une concentration de 2×10^5 cellule/mL dans le milieu RPMI 1640 à 10 % de SVF additionné ou non de p-PD et incubées dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et à 37 °C pendant 5 jours. Deux concentrations de p-PD ont été utilisées : 18,5 µM (→) et 46,3 µM (→) au jour 0 et pour certaines cultures une deuxième dose de la même concentration a été rajouté au 3^e jour de culture (→) (→). Une culture contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions mais sans aucun traitement toxique (→).

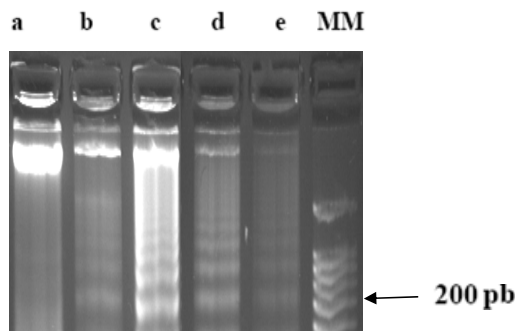


Fig. 2. Electrophorèse d'extraits d'ADN à partir des cellules myéломateuses préalablement traitées à la p-PD sur gel d'agarose (2 %). Les cellules myéломateuses ($3,0 \times 10^7$ cellules) ont été traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de p-PD. L'extrait d'ADN a subi une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. (a) Cellules non traitées ; (b) cellules traitées par la dexaméthazone à 200 nM ; (c) cellules traitées par la p-PD à 46,3 µM ; (d) cellules traitées par la p-PD à 231,5 µM ; (e) cellules traitées par la p-PD à 463 µM, (MM) marqueurs de poids moléculaires.

L'effet dose-dépendant de la p-PD sur la lignée cellulaire testée est donc un effet de blocage de la multiplication cellulaire et cet effet est dose-dépendant.

3.2 Effet de la p-PD sur la qualité de l'ADN

La figure 2 montre les profils de migration d'ADN extrait des cellules non traitées (colonne a), de celles traitées pendant 24 h avec 200 mM de dexaméthazone (colonne b) ou avec 46,3 µM, 231,5 µM ou 463 µM de p-PD (colonnes c, d, e). On peut noter la présence d'une grande quantité d'ADN en haut de la colonne a, ce qui témoigne d'une absence de fragmentation

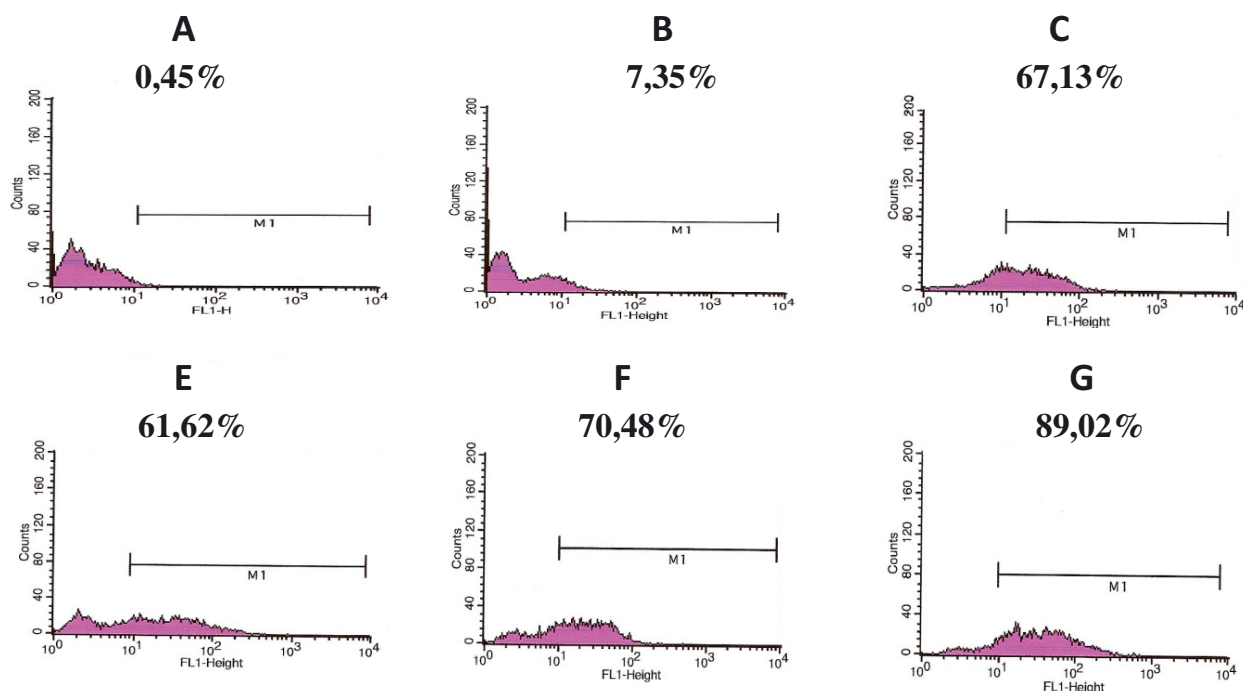


Fig. 3. Évaluation de la fragmentation d'ADN des cellules myélomateuses après 24 h de traitement par différentes concentrations de p-PD en cytométrie en flux. (A) Cellules sans traitement toxique et sans enzyme TdT. (B) Cellules sans traitement toxique et avec enzyme TdT. (C) Cellules traitées avec la Dexaméthazone à 200 nM. (D) Cellules traitées avec la p-PD à 46,3 μM. (E) Cellules traitées avec la p-PD à 231,5 μM. (F) Cellules traitées avec la p-PD à 463 μM.

de l'ADN et donc de migration. Pour les cellules traitées à la dexaméthazone (contrôle positif) ou à la p-PD, le gel d'agarose montre clairement une fragmentation de l'ADN de type apoptotique. En effet, sur la figure 2, des « DNA ladder » sont clairement visibles sur les tracés b, c, d et e. De plus, l'intensité de marquage des bandes d'ADN au bromure d'éthidium est inversement proportionnelle à la dose de p-PD.

En somme la figure 2 montre clairement la fragmentation de l'ADN de type apoptotique après traitement des cellules avec différentes doses de p-PD. Ceci est en parfaite corrélation avec les résultats de la cytométrie en flux.

En effet, l'analyse TUNEL basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la *terminal* transférase (TdT) a permis de mettre en évidence cette activité endonucléasique. La fluorescence émise après polymérisation des dUTP marqués à la FITC au niveau des extrémités 3'-OH est détectée par cytométrie en flux (figure 3).

Les figures 3D–3F montrent que plus la dose de p-PD était forte, plus le pourcentage de fluorescence détecté dans la zone de positivité M1 était élevé en comparaison avec le témoin négatif traité à la TdT uniquement (figure 3B).

Pour les trois doses de p-PD utilisées (46,3; 231,5 et 463 μM), le pourcentage de fluorescence atteint les mêmes zones de valeurs (figures 3D–3F) que celles obtenues avec le test contrôle positif réalisé avec la dexaméthazone (figure 3C).

Le pourcentage de cellules en apoptose a montré que l'effet apoptotique était dose-dépendant. Il était de 61,62 %, 70,48 % et 89,02 % pour les cellules traitées avec 46,3 μM, 231,5 μM et 463 μM de p-PD respectivement ; par rapport au témoin négatif où le pourcentage ne dépassait pas 7,35 % de mortalité.

La fragmentation de l'ADN observée après migration sur gel semble être due à une induction d'apoptose par la p-PD comme confirmée par les analyses en cytométrie et celle-ci est dose-dépendante.

4 Discussion

Dans les conditions de cultures utilisées, on a noté un effet cytotoxique dose-dépendant de la p-PD révélé par une diminution de la viabilité et un arrêt de croissance des cellules tumorales.

En effet, un blocage de la multiplication suivi d'une diminution de la viabilité cellulaire a été observé pour les fortes doses de p-PD utilisées. Cependant, une résistance cellulaire à 18,5 μM de p-PD a été observée après trois jours de culture. La capacité de ces cellules à surmonter l'effet toxique de 18,5 μM de la p-PD pourrait être expliquée par l'augmentation des paramètres antioxydants tels que les catalases (CAT), les superoxydes dismutases (SOD) et/ou le glutathion (GSH) [17]. Le même effet a été démontré pour les kératinocytes : la p-phénylnédiamine à de faibles concentrations (plus que 10 μg/mL) et pour des temps d'exposition courts (0,5 h) augmentait la prolifération des kératinocytes, mais à de fortes concentrations et pour des temps d'exposition longs, induisait un blocage du cycle cellulaire et une toxicité [17].

Sous l'action des signaux tant physiologiques que pathologiques, intracellulaires ou extracellulaires (substances cytotoxiques « p-PD », privation en facteur de croissance, TNF-α, p53...), la cellule active un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire dite l'apoptose.

En dépit de ces signaux, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques (condensation du noyau et la chromatine) [26] et moléculaires (fragmentation d'ADN en fragments oligonucléosomiques) similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice ou pro-apoptotique commune à tous les types cellulaires [27]. Cette signalisation aboutit à l'activation irréversible des caspases et des endonucléases.

L'analyse du gel d'électrophorèse a révélé une augmentation progressive de la fragmentation en échelle entre 1200 et 100 Pb de l'ADN extrait des cellules traitées par 46,3, 231,5 ou 463 μ M de p-PD. Les données de la cytométrie en flux ont confirmé que la p-PD cause bien une fragmentation d'ADN dose-dépendante. Ces résultats suggèrent que l'action générale de la p-PD sur la viabilité cellulaire est médiée par une augmentation de l'apoptose dose-dépendante. Cet effet est comparable à celui observé chez les cellules de la lignée cellulaire Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK) [25] ainsi que sur des cellules urothéliales SV-HUC-1 [18]. Ceci pourrait expliquer les différents effets cliniques observés suite à un contact ou à l'ingestion de la p-PD en particulier la forte néphrotoxicité observée.

Par quelle voie apoptotique agirait la p-PD ? Deux voies principales d'induction d'apoptose sont actuellement identifiées : la voie extrinsèque par le biais des récepteurs à domaines de mort [28–30] (Fas – TNF- α) et la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie [31, 32]. D'après les études réalisées, les dommages nucléaires induits par la p-PD peuvent être la conséquence de l'interaction entre le TNF- α et son récepteur membranaire [33]. On a bien montré que la p-PD et ses dérivés stimulaient les lymphocytes T [34, 35] de sujets humains exposés à la p-PD. Les cellules T stimulées exprimaient le CD4+/CD45RO+/HLA II, cellules mémoires impliquées dans les réactions de dermatites de contact impliquant également la production de cytokines de type T_H1 dont le TNF- α [34].

De cette étude, on conclut que la p-PD-molécule très réactive serait capable d'induire une apoptose *in vitro* dose-dépendante se répercutant sur le cycle cellulaire et la viabilité des cellules myéломateuses.

Remerciements. Ce travail a été subventionné par les Laboratoires de « Physiologie et Génétique Moléculaire » de la Faculté des Sciences et de « Médecine Expérimentale » de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université Hassan II Ain Chock, Casablanca, Maroc.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Yagi H, El Hendi AM. Acute poisoning from hair dye. East Afr Med J. 1991; 68: 404-410.
2. Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, Ezzouine H, Guedari H, Nejmi H, Benslama A. Rhabdomyolyse et intoxication à la p-PD. Ann Fr Anesth Réanima. 2006; 25: 1-6.
3. Ashraf W, Dawling S. Systemic paraphenylenediamine poisoning: A case report and review. Human Exper Toxicol. 1994; 13: 167-170.
4. Saito K, Murai T, Yabe K, Hara M. Rhabdomyolyse due to praphenylenediamine (hair dye)-report of an autopsy case. Nippon Hiogaku Zasshi. 1990; 44: 469-474.
5. Shemesh I, Mishai Y, Baruchin A, Viskoper R, Azuri M. Rhabdomyolysis in Paraphenylenediamine intoxication. Veterinary Human Toxicol. 1995; 37: 244-245.
6. Dron P, Lafourcade MP, Leprince F, Nonotte-Varly C, Van Der Brempt X, Banoun L, Sullerot I, This-Vaissette C, Parisot L, Moneret-Vautrin DA. Les allergies au piercing et aux tatouages : enquête du réseau d'allergo-vigilance. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 2007; 47: 398-401.
7. Mascres C, Jasmin G. Étude pathogénique des lésions musculaires induites par la paraphénylène-diamine. Union Med Can. 1974; 103: 672-677.
8. Munday R, Manns E, Fowke EA. Muscle necrosis by N-methylated PPD in rats: structure activity relationships and correlation with free-radical production *in vitro*. Toxicology. 1989; 57: 303-314.
9. Averbukh Z, Modai D, Leonon Y, Weissgarten J. Rhabdomyolysis and acute renal failure induced by PPD. Hum Toxicol. 1989; 8: 345-348.
10. Munday R, Manns E. Muscle necrosis in rats induced by 2-methoxy-p-phenylenediamine. Food Chem Toxicol. 1999; 37: 561-564.
11. Yokozeki H, Watanabe K, Igawa K, Miyazaki Y, Katayama I, Nishioka K. The risk of active sensitization to PPD. Clin Exp Immunol. 2001; 125(3): 351-359.
12. Chye SM, Hseu YC, Liang SH, Chen CH, Chen SC. Single strand DNA breaks in human lymphocytes exposed to paraphenylenediamine and its derivatives. Bull Environ Contam Toxicol. 2008; 80(1): 58-62.
13. Soler-Niedziela L, Shi X, Nath J, Ong T. Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. Mutat Res. 1991; 259(1): 43-48.
14. Suter W, Ahiabor R, Blanco B, Locher F, Mantovani F, Robinson M, Sreenan G, Staedtler F, Swingler T, Vignutelli A, Perentes E. Evaluation of the *in vivo* genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the big blue transgenic mouse mutation assay. Environ Mol Mutage. 1996; 28(4): 354-362.
15. Crebelli R, Conti L, Carere A, Zito R. Mutagenicity of commercial p-phenylenediamine and resorcinol in salmonella typhimurium T.A98. Food Cosmet Toxicol. 1981; 19: 79-84.
16. Guarrigue J-L, Ballantyne M, Kumravel T, Lloyd M, Nohynek G, Kirkland D, Toutain H. *In vitro* genotoxicity of paraphenylenediamine and its N-monoacetyl or N, N'-diacetyl metabolites. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2006; 608: 58-71.
17. Picardo M, Zompetta C, Grandinetti M, Ameglio F, Santucci B, Faggioni A, Passi S. Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress in normal human keratinocytes in culture. Br J Dermatol. 1996; 134(4): 681-685.
18. Huang Ya-Chun, Hung Wen-Chun, Kang Wan-Yi, Chen Wan-Tzu, Chai Chee-Yin. p-Phenylenediamine induced DNA damage in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and expression of mutant p53 and COX-2 proteins. Toxicol Lett. 2007; 170: 116-123.
19. Altekruse SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). Cancer Causes Control. 1999; 10: 617-625.
20. Gargo-Dominiguez M, Castelao JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. Int J Cancer. 2001; 91: 575-579.

21. Hartge P, Hoover R, Altman R. Use of hair dyes and risk of bladder cancer. *Cancer Res.* 1982; 42: 4784-4787.
22. Rauscher GH, Shore D, Sabdler DP. Hair dye use and risk of adult acute leukemia. *Am J Epidemiol.* 2004; 60:19-25.
23. Thun MJ, Altekruze SF, Namboodiri MM, Calle EE, Myers DG, Heath Jr, CW. Hair dye use and risk of fatal cancer in US women. *JNCI.* 1994; 86: 210-215.
24. Chung K-T, Murdock CA, Stevens SE, Li Y-S, Wei C-I, Huang T-S, Chou MW. Mutagenicity and toxicity studies of p-phenylenediamine and its derivatives. *Toxicol Lett.* 1995; 81: 23-32.
25. Chen SC, Chen CH, Chem L, Hsu L-S, Huang YC, Chung KT, Chye SM. p-phenylenediamine induces p53-mediated apoptosis in Mardin Darby Canine Kidney cells. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 801-807.
26. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 1984; 142: 67-77.
27. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology.* 1993; 133: 591-599.
28. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* 1998; 396(6712): 699-703.
29. Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J.* 1997; 16: 3805-3812.
30. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11(2): 255-260.
31. Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 1998; 5(6): 547-552.
32. Munday R. Mitochondrial oxidation of p-Phenylenediamine derivatives in vitro: structure-activity relationships and correlation with mytotoxic activity in vivo. *Chem Biol Interact.* 1992; 82: 165-179.
33. Salcedo TW, Fleit HB. Detection of tumor necrosis factor induced nuclear damage with p-phenylenediamine. *J Immunol Methods.* 1992; 148(1-2): 209-216.
34. Sieben S, Kawakubo Y, Al Masaoudi T, Merk Hans F, Blömeke B. Delayed-type hypersensitivity reaction to paraphenylenediamine is mediated by 2 different pathways of antigen recognition by specific $\alpha\beta+$ human T-cell clones. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109(6): 1005-1010.
35. Kitagaki H *et al.* Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol.* 1997; 159: 2484-2491.