Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Les mécanismes de régulation hépatique de la connexine 32 lors de l'hépatocancérogenèse induite par l'hexachlorobenzène chez le rat femelle

Par Isabelle Plante, M.Sc.

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Éric Asselin, UQTR
Examinateur externe	Nicole Beauchemin, McGill
Examinateur interne	Patrick J. Devine, INRS
Directeur de recherche	Michel Charbonneau, INRS
Codirecteur de recherche	Daniel G.Cyr, INRS

© droits réservés d'Isabelle Plante, 2006

RÉSUMÉ

L'hexachlorobenzène (HCB) est un cancérigène épigénétique largement répandu dans l'environnement. Il a été démontré qu'une exposition de cinq jours à l'HCB rend les rats femelles plus susceptibles au développement de tumeurs hépatiques que les mâles, suite à l'injection d'un initiateur de tumeurs 95 jours plus tard. Les cancérigènes épigénétiques peuvent favoriser le développement de tumeurs en inhibant les interactions intercellulaires. Les jonctions adhérentes sont impliquées dans l'interaction entre les cellules et dans la signalisation intracellulaire. Elles sont formées d'un complexe de protéines cytoplasmiques lié à une famille de protéines transmembranaires, les cadhérines. Les jonctions lacunaires permettent la communication directe entre des cellules adjacentes. Elles sont formées de canaux cylindriques, composés par une famille de protéines appelées connexines.

Des travaux antérieurs ont démontré que l'HCB inhibe la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires et l'expression des connexines hépatiques uniquement chez les femelles traitées à l'HCB. Aucune diminution n'a été détectée chez les mâles. Un dimorphisme sexuel a aussi été observé au niveau des connexines hépatiques chez le rat : les mâles ont des niveaux basaux de connexine 32 plus élevés que les femelles, mais des niveaux de connexine 26 plus bas.

L'objectif principal de ce projet était de déterminer les mécanismes de régulation hépatique de la connexine 32 chez les rats, plus particulièrement chez les femelles exposées à l'HCB. Cet objectif comportait trois volets : (1) déterminer si l'expression de la E-cadhérine est inhibée chez les femelles traitées à l'HCB, et si cette inhibition est due à une activation de la voie de signalisation de la kinase liée aux intégrines (« Integrin-Linked kinase », ILK), une voie reconnue pour réguler la E-cadhérine ; (2) confirmer, à l'aide d'un modèle *in vitro* l'implication de la voie de l'ILK dans la régulation de la E-cadhérine et de la connexine 32 ; et (3) caractériser la régulation transcriptionnelle de la connexine 32 en étudiant la liaison des facteurs de transcription sur son promoteur, lors de l'exposition à l'HCB et au niveau basal.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont démontré qu'une exposition à l'HCB active la voie de signalisation de l'ILK chez les femelles, mais pas chez les mâles.

Cette activation résulte en l'inactivation de la GSK3β, ce qui diminue l'expression de la E-cadhérine. Parallèlement, l'ILK active la protéine Akt, qui transloque dans le noyau et inhibe l'expression de la connexine 32 en diminuant la liaison d'un facteur de transcription sur son promoteur. La liaison d'un autre facteur de transcription est également inhibée ; ce facteur se lie dans la séquence basale du promoteur et est également impliqué dans le dimorphisme sexuel basal dans l'expression de la connexine 32 hépatique. L'inhibition de la liaison de ces deux facteurs amène une baisse de l'expression de la connexine 32.

Globalement, en activant une seule voie de transcription l'HCB prédispose les rats femelles au développement de tumeurs hépatiques en inhibant à la fois les jonctions lacunaires, via une inhibition de la connexine 32, et les jonctions adhérentes, via une inhibition de la E-cadhérine. Ces travaux proposent une donc une voie de signalisation, allant du cytoplasme de la cellule jusqu'à une action nucléaire, pouvant expliquer la baisse des interactions cellule-cellule via une inhibition concomitante des jonctions lacunaires et adhérentes. Étant donné que l'activation de la voie de l'ILK est un événement courant dans la cancérogenèse et que l'inhibition des interactions intercellulaires l'est également, ce mécanisme pourrait être présent lors de la cancérogenèse dans d'autres tissus que le foie.

Isabelle Plante

Michel Charbonneau

Daniel G.Cyr

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de recherche :

- Michel Charbonneau, pour son éternel positivisme, pour ses encouragements et pour sa confiance.
- Daniel G.Cyr, pour m'avoir transmis sa passion pour la science, pour sa disponibilité et pour sa confiance.

Merci à vous deux d'avoir cru en moi, dans les bons comme dans les moins bons moments. Merci pour m'avoir guidé lors de ces années qui resteront gravées dans ma mémoire. Merci pour cet enseignement que j'espère pouvoir transmettre aussi bien dans quelques années. J'espère pouvoir vous côtoyer encore dans les années à venir..!

Merci à Guylaine Lassonde, technicienne du Dr Charbonneau, pour ces conseils, pour son aide, mais surtout pour sa grande amitié. Je vais m'ennuyer de toi !

Merci à Julie Dufresne, assistante de recherche du Dr Cyr, pour son enseignement, sa passion et son expertise. Merci surtout pour ton amitié.

Merci à Mary Gregory, assistante de recherche du Dr Cyr, pour ses conseils, son aide et son chocolat ! Dis merci à Caroline pour m'avoir diverti grâce à ses livres lors de mes (quelques) temps libres.

Merci pour leur aide et leur amitiés à tous mes collègues de laboratoires au fil des années (désolée, la liste est trop longue pour tous vous nommer, mais vous vous connaissez !), plus particulièrement, à Noël et à Benjamin pour avoir égayer mes dernières années, à Robert, Stéphane et Jean-Marc, pour leurs conseils « de grands ».

Merci à mes amis des autres laboratoires pour ces belles années. Un merci tout spécial à Martin pour sa confiance, ses conseils et ses BD.

Merci à ma famille, mon père Roger, ma mère Nicole et mon grand frère Jean-François pour leurs encouragements et leur amour. Merci pour votre soutient moral dans mes moments de doutes. Merci aussi à Michelle pour son enthousiasme et son soutient moral.

Finalement, merci à Frédéric pour ton amour, ta grande patience, tes encouragements, mais surtout pour être là dans les bons et les moins bon moments. Garde confiance, je vais arrêter d'aller à l'école un jour !

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ III

REMERCIEMENTS V

TABLE DES MATIÈRES VII

LISTE DES ABRÉVIATIONS XI

LISTE DES FIGURES XIII

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE 3

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 1 : LES JONCTIONS LACUNAIRES 7

1. LES JONCTIONS LACUNAIRES 7
1.1. Le rôle de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires 7

1.2. Structure des connexines et des jonctions lacunaires 8

1.3. Importance de la connexine 32 dans le foie 15

1.4. Régulation des connexines et la connexine 32 16
1.4.1. Séquençage du gène et du promoteur de connexine 32 18
1.4.2. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation 21

1.5. Importance des jonctions lacunaires dans la cancérogenèse 23

1.6. Interactions entre les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes 25

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 2 : LES JONCTIONS ADHÉRENTES 28

2. LES JONCTIONS ADHÉRENTES 29
2.1. Le rôle et la structure des jonctions adhérentes 29

2.2. Importance des jonctions adhérentes dans la cancérogenèse 31

2.3. Implication de la voie de l'ILK dans la régulation de l'expression de E-cadhérine 31

2.3.1. Implication de la voie dans la cancérogenèse 32
2.3.2. Description de la voie de signalisation..... 34
2.3.4. Le rôle de la Glycogène Synthétase kinase-3β..... 36

2.4. Définition de la cancérogenèse.....35

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 3 : L'HEXACHLOROBENZÈNE 41

3. L'HEXACHLOROBENZÈNE 41
3.1. Définition et caractéristiques de l'hexachlorobenzène..... 41

3.2. Utilisation, sources d'émission et distribution environnementale..... 41

3.3. Dose journalière d'exposition 42

3.4. Politiques gouvernementales concernant l'hexachlorobenzène au Canada 42

3.5. Évidences de la cancérogenèse due à l'hexachlorobenzène..... 42

3.6. Les effets de l'hexachlorobenzène sur les jonctions lacunaires..... 43
3.6.1 Le protocole ABC 43
3.6.2. Inhibition des jonctions lacunaires par l'hexachlorobenzène 46

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE 48
SECONDE PARTIE : ARTICLES 51

SECONDE PARTIE, SECTION 1: INVOLVEMENT OF THE INTEGRIN-LINKED KINASE PATHWAY IN HEXACHLOROBENZENE-INDUCED GENDER-SPECIFIC RAT HEPATOCARCINOGENESIS..... 53
1.1. Résumé français de l'article 53

1.2. Contribution de l'étudiante..... 54

SECONDE PARTIE, SECTION 2: ACTIVATION OF THE INTEGRIN-LINKED KINASE PATHWAY DOWN-REGULATES HEPATIC CONNEXIN32 VIA NUCLEAR AKT 67
2.1. Résumé français de l'article 67

2.2. Contribution de l'étudiante..... 68

SECONDE PARTIE, SECTION 3: SEXUAL DIMORPHISM IN THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF LIVER CONNEXIN32 IN HEXACHLOROBENZENE-TREATED RATS.. 103
3.1. Résumé français de l'article 103

3.2. Contribution de l'étudiante..... 104

TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSIONS 143

Mécanisme de l'hépatocancérogenèse induite par l'HCB chez les rats femelles 145

La voie de l'ILK et la cancérogenèse 148

Importance du mécanisme présenté dans la législation concernant l'HCB 149

Avenues thérapeutiques impliquant la voie de l'ILK 150

Perspectives d'études découlant de ces résultats 152
Les récepteurs impliqués dans l'activation de la voie de l'ILK par l'HCB . 153
Le rôle de Snail dans l'inhibition de la E-cadhérine 154
Identification des facteurs de transcription 155
L'implication de la connexine 26 157

Conclusion générale 158

CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES 159

BIBLIOGRAPHIE 161

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ARN — Acide ribonucléotique messager
- AMP — Adénosine monophosphate
- ADP — Adénosine diphosphate
- ATP — Adénosine triphosphate
- BPC — Biphényls polychlorés
- CL — Domaine cytoplasmique en boucle des connexines
- CT — Extrémités C-terminale des protéines
- Cx26 KO — Déficience en connexine 26
- Cx32 KO — Déficience en connexine 32
- DEN — Diéthylnitrosamine
- E1 et E2 — Domaines extracellulaires en boucle des connexines
- EAF — Foyers prénéoplastiques
- EGF — Facteur de croissance épithélial
- EHEN — N-éthyl-N-hydroxyéthylnitrosamine
- EMSA — Electrophoresis Mobility Shift Assay
- EMT — Transition épithéliale-mésenchymale
- GSK3β — Glycogène synthétase kinase-3β
- HCB — Hexachlorobenzène
- HNF-1 — Hepatocyte Nuclear Factor-1
- ILK — Kinase liée aux intégrines
- KDa — kiloDalton
- M1 à M4 — Domaines transmembranaires en hélice-α des connexines
- MAPK — Mitogen-Activated Protein Kinase
- mp — «maping point», localisation sur le gène à partir du site d'initiation de la transcription
- NF-1 — Nuclear factor-1
- NT — Extrémité N-terminale des protéines

- PKA — Protéine kinase A
- PKC — Protéine kinase C
- Ser473 — Sérine 473
- siRNA — Small interference RNA, ARN d'interférence
- Thr308 — Thréonine 308
- VEGF — Facteur de croissance épithéliale vasculaire
- WT — Wildtype, de type sauvage

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle représentant la structure conservée des connexines 10

Figure 2 : Modèle représentant la structure des jonctions lacunaires 12

Figure 3 : Représentation des différents types de connexines selon le type de connexines présentes dans un tissu 14

Figure 4 : Représentation schématique de la structure du gène de la connexine 20

Figure 5 : Séquence du promoteur de la connexine 32 actif dans le foie de rat adulte 22

Figure 6 : Schéma de la jonction adhérente 30

Figure 7 : Activation de la voie de l'ILK 33

Figure 8 : Rôle de GSK3β lorsque la voie de l'ILK est inactive 38

Figure 9 : Protocole ABC utilisé pour l'étude des effets de l'hexachlorobenzène sur les jonctions lacunaires et sur l'hépatocancérogenèse 45

Figure 10 : Mécanisme d'action de l'hexachlorobenzène dans le foie des rats femelles 147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Distribution des connexines dans les différents tissus chez le rat 9

INTRODUCTION

L'hexachlorobenzène (HCB), un polluant environnemental, est un cancérigène épigénétique. Il a été démontré qu'une exposition à l'HCB rend les femelles plus susceptibles que les mâles au développement de tumeurs hépatiques (Larouche, 1993; Rizzardini et Smith, 1982). Une modulation des interactions cellule-cellule est un mécanisme utilisé par les cancérigènes épigénétiques afin de promouvoir la formation de tumeurs (Ruch et Trosko, 2001).

Les jonctions lacunaires permettent une communication directe entre des cellules adjacentes. Elles sont composées de quelques-uns jusqu'à des milliers de canaux cylindriques, formés d'une famille de protéines appelées connexines (Laird, 1996). Les jonctions lacunaires permettent le passage direct de petites molécules (<1 KDa), incluant les ions et les messagers secondaires, d'une cellule à l'autre. Par leurs fonctions, elles participent au maintient de l'homéostasie dans les tissus et à la coordination de l'épithélium. Une inhibition de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires et une mauvaise expression des connexines ont toutes deux été associées à la cancérogenèse (Chipman et al., 2003).

Des résultats antérieurs chez le rat ont démontré qu'une exposition de cinq jours à l'HCB inhibe la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires dans le foie 95 jours suivant l'exposition chez les femelles exposées (Plante et al., 2002). Cette baisse de la communication est précédée d'une inhibition des connexines hépatiques au jour 50, et ce, uniquement chez les femelles, les mâles ne présentant aucune modification tant au niveau des connexines ou de la communication intercellulaire. Par contre, ces travaux ont démontré que les niveaux hépatiques basaux de connexines présentent un dimorphisme sexuel : les mâles ont plus de connexine 32 que les femelles, mais moins de connexine 26. Cependant, les mécanismes contrôlant la régulation basale des connexines et impliqués dans le dimorphisme sexuel ou menant à une baisse de leur expression suite à une exposition à des substances épigénétiques sont très peu connus.

Une inhibition des protéines formant les jonctions adhérentes a également été associée à la cancérogenèse (Van Aken et al., 2001; Conacci-Sorrell et al., 2002). Plus particulièrement, une baisse de l'expression de la E-cadhérine est un événement important

dans le processus de la formation des tumeurs. Il a été démontré que les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires sont étroitement reliées (Wang et Rose, 1997; Meyer et al., 1992). Plus particulièrement, les connexines et les cadhérines sont souvent inhibées de façon concomitante dans les tumeurs, suggérant des mécanismes communs de régulation.

L'objectif principal de cette étude était de déterminer les mécanismes de régulation hépatique de la connexine 32 chez les rats, plus particulièrement chez les femelles exposées à l'HCB. Cet objectif comportait trois volets : (1) déterminer si l'expression de la E-cadhérine est inhibée chez les femelles traitées à l'HCB, et si cette inhibition est due à une activation de la voie de signalisation de la kinase liée aux intégrines (« Integrin-Linked kinase », ILK), une voie reconnue pour réguler la E-cadhérine ; (2) confirmer, à l'aide d'un modèle *in vitro* l'implication de la voie de l'ILK dans la régulation de la E-cadhérine et de la connexine 32 ; et (3) caractériser la régulation transcriptionnelle de la connexine 32 en étudiant la liaison des facteurs de transcription sur son promoteur, lors de l'exposition à l'HCB et au niveau basal. Les expériences réalisées afin de répondre à ces questions ont été réalisées soit *in vivo* avec des rats mâles et femelles exposés à l'HCB, soit *in vitro* à l'aide d'une lignée cellulaire d'hépatocytes de rats.

La première partie de cette thèse est une revue de la littérature abordant les grands thèmes de ce projet. La première section présente les caractéristiques et les fonctions des jonctions lacunaires. Un intérêt particulier est porté à la connexine 32 puisque la majeure partie des travaux y est consacrée, de par son importance dans la cancérogenèse hépatique. Cette première section permettra au lecteur de se familiariser avec les jonctions lacunaires et de comprendre leur implication dans le processus de cancérogenèse. Par la suite, la deuxième section est un sommaire des connaissances concernant les jonctions adhérentes : leur structure, leurs fonctions et également leur implication dans la cancérogenèse. Le rôle de la voie de l'ILK dans la régulation de la E-cadhérine y est également abordé. Finalement, la dernière section de cette revue de la littérature a pour sujet l'HCB. Cette brève introduction permettra de mieux comprendre la législation entourant son utilisation et les impacts d'une exposition. Les résultats

antérieurs sur les effets de l'HCB sur la communication intercellulaire et les connexines y sont également résumés.

La deuxième partie de cette thèse est constituée des trois manuscrits rédigés à partir des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de doctorat. Le premier a été publié dans la revue « Toxicological Sciences » en 2005. Le deuxième manuscrit a été accepté pour publication dans la revue « Carcinogenesis », tandis que le troisième le sera soumis sous peu.

Finalement, la troisième partie de ce document présente une discussion sur des sujets n'ayant pas été abordés préalablement et les conclusions générales de ce projet. La contribution des présents travaux aux domaines de recherche de la cancérogenèse environnementale et des jonctions intercellulaires y est également soulignée.

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Les jonctions lacunaires

1.1. Le rôle de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires, aussi connues sous leur nom anglais « Gap Junctions », sont présentes à la membrane plasmique de presque tous les types de cellules. Elles ont été observées pour la première fois vers la fin des années 50 chez les grenouilles et l'humain (Robertson, 1957). Quelques années plus tard, il a été suggéré que ces structures pouvaient être spécialisées dans la communication intercellulaire, par l'observation de molécules voyageant entre des cellules adjacentes (Kanno et Loewenstein, 1964; Simpson et al., 1977). Il est maintenant confirmé que le rôle principal des jonctions lacunaires est de coordonner la communication intercellulaire et la réponse tissulaire dans les tissus lors de différents processus (Giepmans, 2004; Krutovskikh et Yamasaki, 1997; Trosko et Ruch, 1998). Par exemple, elles permettent : (1) la transmission rapide des potentiels d'action dans le cœur et les tissus neuraux; (2) la diffusion de métabolites et de nutriments, tel que les nucléotides et le glucose, entre les cellules adjacentes; (3) la propagation de messagers secondaires, comme le calcium, l'inositol-triphosphate et les nucléotides cycliques, qui peuvent être impliqués dans l'apoptose, la transcription génique et le contrôle de la croissance; (4) la régulation du développement embryonnaire en dispersant les signaux morphologiques et en défendant les barrières des compartiments en développement; (5) l'élimination de dérivés métaboliques non désirés, facilitée par un gradient de l'intérieur du tissus vers le système vasculaire pour l'excrétion. Par ces fonctions, les jonctions lacunaires sont donc fortement reliées à l'homéostasie des tissus. Ainsi, un dysfonctionnement des jonctions lacunaires dans un tissu a des conséquences non négligeables sur le contrôle de la prolifération cellulaire, sur l'apoptose et sur le fonctionnement normal du tissu. D'ailleurs, plusieurs maladies humaines ont été associées à des mutations au niveau des connexines, les protéines qui composent les jonctions lacunaires (Richard, 2003). Par exemple, des mutations de la connexine 32, composante majeure des jonctions lacunaires dans le foie, mais également présente dans les cellules de Schwann du système nerveux, ont été associées à une dégénération neurologique

appelée la maladie Charcot-Marie-Tooth (Abrams et al., 2000). La dysplasie oculodentodigitale, se manifestant par des malformations des os, a été associée, quant à elle, à différentes mutations du gène de la connexine 43 (Roscoe et al., 2005). Des mutations du gène codant pour la connexine 26 sont responsables de problèmes d'audition et de surdité (White, 2000; Lefebvre et Van De Water, 2000). Ce ne sont que quelques exemples de pathologies reliés aux connexines; plusieurs autres maladies reliées à une déficience des jonctions lacunaires ont aussi été identifiées. Depuis quelques années, l'utilisation de souris déficientes (souris « knockout ») ou de techniques *in vitro* ont grandement facilité la compréhension de ces problèmes en permettant l'étude de la structure des jonctions lacunaires, de celle des connexines qui les forment, de leur assemblage et du contrôle de leurs fonctions.

1.2. Structure des connexines et des jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires sont formées à partir d'une famille de protéines transmembranaires, les connexines. Ces protéines sont hautement conservées dans l'évolution et sont classées selon leur poids moléculaire. La première connexine clonée a été la connexine 32, la connexine la plus importante de par son abondance dans le foie (Kumar et Gilula, 1986; Paul, 1986; Zhang et Nicholson, 1989). Chez l'humain et les rongeurs, 21 connexines différentes ont maintenant été clonées et séquencées. Les connexines présentes sont différentes d'un tissu à l'autre; dans un tissu, généralement deux ou trois types de connexines sont exprimés (Tableau 1). Chaque connexine est régulée de façon indépendante tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel, ainsi que lors de sa dégradation (Laird, 2005; Cruciani et Mikalsen, 2002). Malgré cette grande diversité au niveau des tissus et de leur expression, la structure des connexines demeure semblable d'un type à l'autre et d'une espèce à l'autre.

Tableau 1 : Distribution des connexines dans les tissus chez le rat

Type de connexine	Tissu	Référence
Cx26	foie, glande mammaire, intestin, pancréas, épididyme, cochlée, placenta, peau, rein	Lautermann et al., 1998 ; Lee et Rhee, 1998 ; Monaghan et al., 1996 ; Pozzi et al., 1995 ; Kuraoka et al., 1993; Lee et al., 1992; Dufresne et al., 2003
Cx29	cerveau, système nerveux	Eiberger et al., 2006
Cx30	cerveau, peau, cochlée	Nagy et al., 1999 ; Dahl et al., 1996 ; Lautermann et al., 1999 ; Goliger et Paul, 1994
Cx30.2	?	Oyamada et al., 2005
Cx30.3	rein, peau	Tucker et Barajas, 1994 ; Hennemann et al., 1992
Cx31	rein, peau, placenta	Tucker et Barajas, 1994
Cx31.1	peau, épithélium	Budunova et al., 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Hennemann et al., 1992a
Cx32	glande mammaire, foie, système nerveux, pancréas, thyroïde, rein, épididyme	Munari-Silem, 1996 ; Pozzi et al., 1995 ; Krutovskikh et al., 1995 ; Zhang et Nicholson, 1994, 1989 ; Kuraoka et al., 1993 ; green et al., 1996 ; Dufresne et al., 2003
Cx33	testicule	Tan et al., 1996
Cx36	oeil, système nerveux central	Al Ubaidi et al., 2000 ; Belluardo et al., 1999
Cx37	cœur, endothélium, estomac, testicule, ovaire, peau, poumon	Haefliger et al., 2000; Chang et al., 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Reed et al., 1993 ; Willecke et al., 1991
Cx39[a]	muscles	Cruciani et Mikalsen, 2006 ; von Maltzahn et al., 2004
Cx40	cœur, endothélium, muscles lisses, poumon	Becker et al., 1998 ; Groenewegen et al., 1998 ; Little et al. ,1995
Cx43	cœur, endothélium, œil, cellules immunitaires, épididyme, glande mammaire, ovaire, utérus, pancréas, thyroïde, peau	Cyr et al., 1996 ; Monaghan et al., 1996 ; Munari-Silem, 1996 ; Pozzi et la., 1995 ; Goliger et Paul, 1994 ; Butterweck et al., 1994
Cx45	cerveau (embryonnaire), cœur, intestin, rein, poumon, peau	Davis et al., 1995 ; Butterweck et al., 1994 ; Hennemann et al., 1992b ; Willecke et al., 1991
Cx46	cœur, rein, lentille de l'œil	Hopperstad et al., 2000 ; Davis et al., 1995 ; Rup et al., 1993
Cx47	cerveau, moelle épinière	Kleopa et al., 2004 ; Teubner et al., 2001
Cx50	cœur, lentille de l'œil	Hopperstad et al., 2000 ; Zampighi et al., 1999 ; White et al., 1992
Cx57	Peau, cœur, rein, testicule, ovaire, intestin	Manthey et al., 1999

a : Bien que la connexine 39 a été identifée chez l'humain et la souris; la séquence chez le rat est partielle pour l'instant.

Tableau inspiré de Cyr, Pillet et Nicholas., 2001

Les connexines sont des protéines transmembranaires en forme de « M », possédant deux domaines extracellulaires en boucles (E1 et E2), un domaine cytoplasmique en boucle (CL), deux queues cytoplasmiques, la C-terminale et la N-terminale (NT et CT), et quatre domaines transmembranaires traversant la membrane en rangées parallèles (M1 à M4) (Figure 1) (Sosinsky et Nicholson, 2005). La C-terminale varie d'une connexine à l'autre, tant au niveau de la séquence qu'au niveau de sa longueur. En général, plus la queue C-terminale est longue, plus le poids moléculaire de la protéine est élevé.

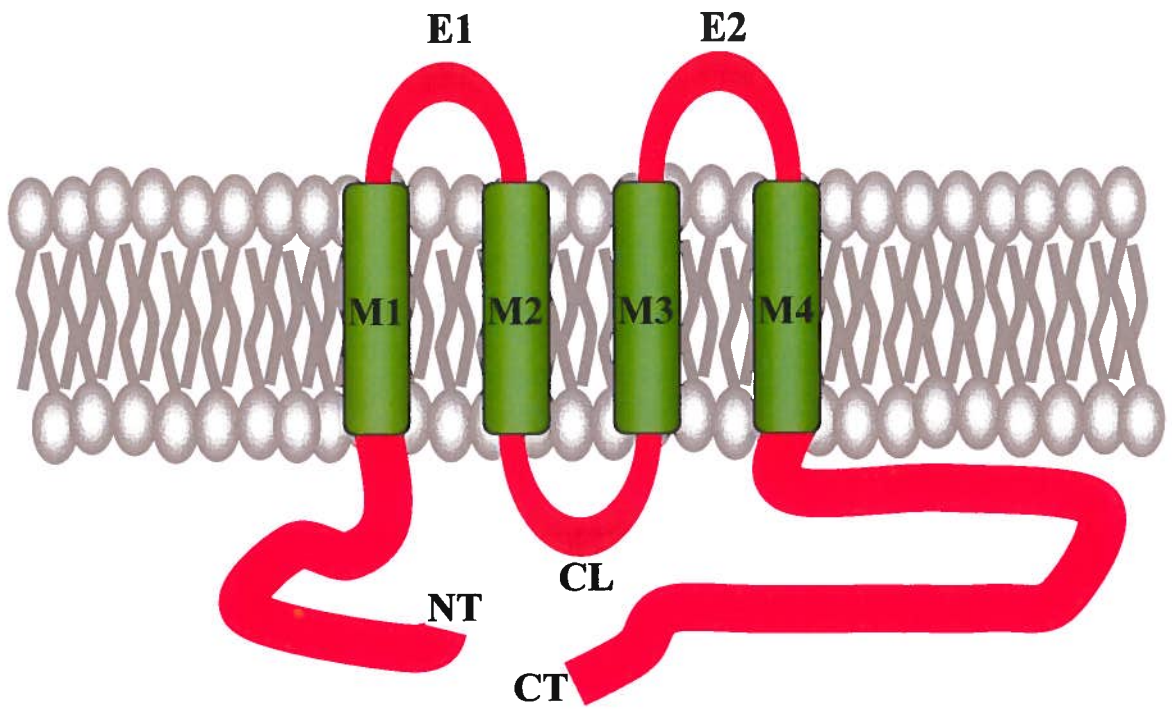


Figure 1: Modèle représentant la structure conservée des connexines
Les connexines sont composées de quatre domaines transmembranaires en hélice α (M1 à M4), reliés entre eux par deux boucles extracellulaires (E1 et E2) et une boucle intracellulaire (CT). Les régions N-terminale (NT) et C-terminale (CT) se retrouvent du côté cytoplasmique.

Les jonctions lacunaires sont en fait un regroupement de pores aqueux cylindriques, constitués de connexines (Laird, 1996). Chacun des canaux est formé par deux structures hexamériques, les connexons, composées eux-mêmes par six connexines provenant de chacune des cellules adjacentes (Figure 2). Les connexines se regroupent en connexon dans l'appareil de Golgi ou dans le reticulum endoplasmique, selon le type de connexines (Laird, 1996; Laird, 2005). Les connexons sont par la suite amenés à la membrane, soit par des vésicules de transport, soit par des expansions tubulaires. À la membrane, ils se lient avec les connexons de la cellule adjacente pour former un canal. Finalement, les connexons se regroupent en plaques, ou en groupes, comprenant d'une centaine à quelques milliers de canaux.

Les domaines transmembranaires en hélices-α (M1 à M4) des connexines forment les parois de ce pore aqueux; il semble que ce soient les domaines M1 et M3 qui tapissent l'intérieur du pore de par leurs composantes hydrophiles (Nunn et al., 2001). La liaison de deux connexons permet la formation d'un pore aqueux d'environ 1,5 à 2 nm entre les deux cellules et le passage rapide de petites molécules (≤1000 Da) d'une cellule à l'autre. Ainsi, les messagers secondaires, les ions, les acides aminés et d'autres petites molécules pourront passer directement d'une cellule à l'autre et permettrent la communication rapide entre les cellules. Les domaines extracellulaires E1 et E2 sont responsables de la liaison des connexons l'un à l'autre (Yeager, 1998). Il a été suggéré que E2 est la composante déterminante de la compatibilité des connexons formés de connexines de types différents (connexons hétérotypiques, sujet abordé subséquemment), alors que la partie comprise entre la NT et le E1 (NT, M1 et E1) est responsable du voltage et, en partie, de l'ouverture des canaux (White et al., 1995). Finalement, il a été suggéré que la boucle cytoplasmique, CL, joue un rôle dans la fermeture du canal, dans un modèle appelé « ball and chains ». Selon ce modèle, la queue C-terminale, CT, peut se lier à un récepteur sur la boucle CL, ce qui crée un encombrement et ferme le pore (Seki et al., 2004; Roscoe et al., 2005).

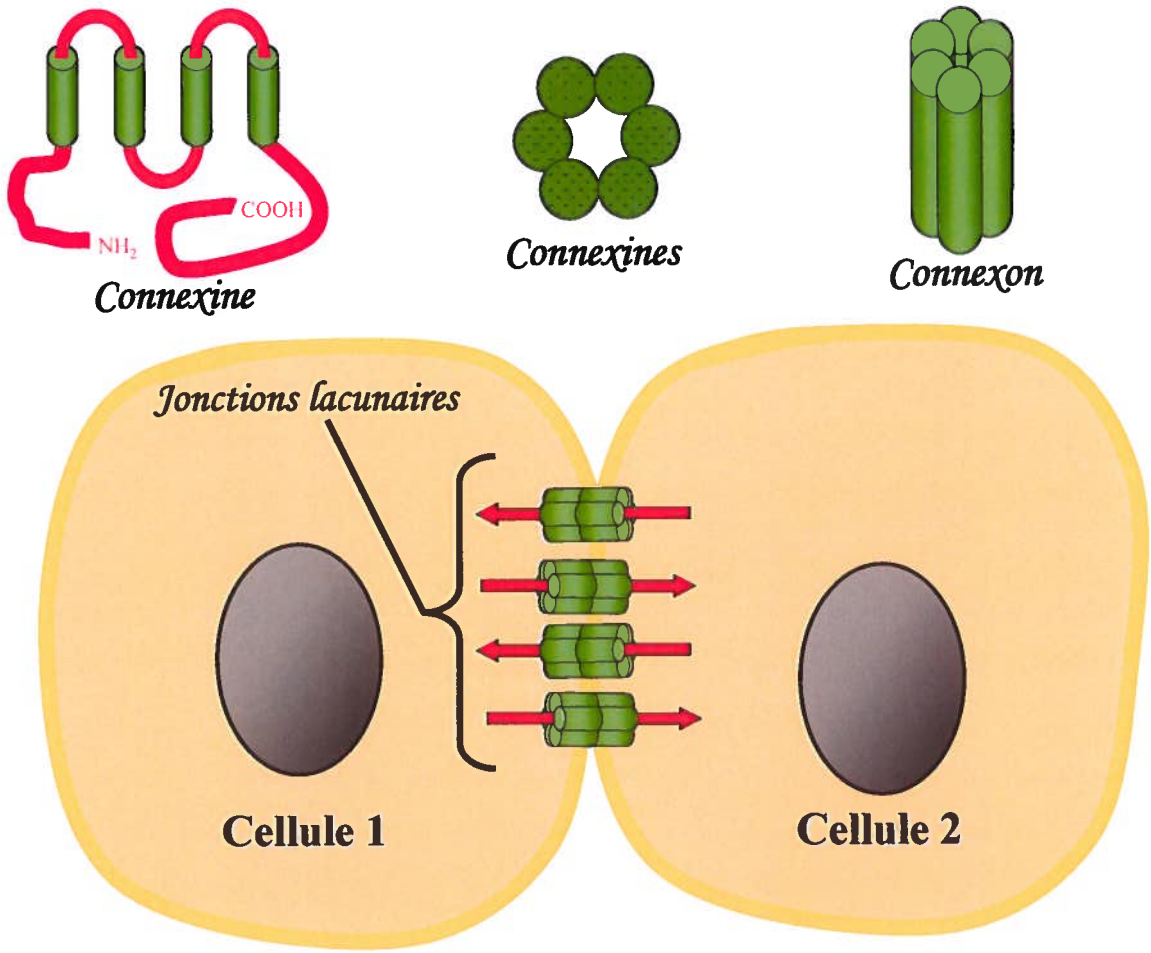


Figure 2: Modèle représentant la structure des jonctions lacunaires
Six connexines s'oligomérisent ensembles afin de former une structure cylindrique appelée connexon. Les connexons sont insérés à la membrane de la cellule et peuvent se lier aux connexons de la cellule adjacente afin de former un canal reliant les deux cellules. Le regroupement de centaines de ces canaux forme la jonction lacunaire. Les jonctions lacunaires permettent ainsi l'échange de petites molécules entre les deux cellules voisines.

Comme il a été mentionné précédemment, différents types de canaux peuvent être formés, selon les connexines présentes dans le tissu. Un connexon formé d'un seul type de connexines est appelé « homomérique », alors qu'un connexon comportant plus d'un type de connexines est appelé « hétéromérique » (Figure 3). De plus, les deux connexons formant le pore peuvent avoir la même composition en connexines (« homotypique »), ou être de compositions différentes (« hétérotypique »). Il a été démontré que selon le type de connexines qui forme les connexons, les propriétés du canal peuvent varier et avoir une perméabilité différente (Goldberg et al., 2004). Par exemple, dans des cellules C6 de gliomes modifiées afin d'exprimer soit la connexine 32 ou la connexine 43, l'adénosine passe 12 fois mieux dans les pores composé de connexines 32 que dans des pores composés de connexines 43 (Goldberg et al., 2002). Par contre, les molécules d'adénosine-triphosphate (ATP), -diphosphate (ADP) et -monophosphate (AMP) passent mieux dans les pores composés de connexines 43, suggérant que l'ajout de phosphate à la molécule d'adénosine change ses propriétés et sa capacité de passer à travers les jonctions lacunaires (Goldberg et al., 2002). Dans des lignées stables de cellules HeLa exprimant soit la connexine 40 ou la connexine 43, ou les deux, des études de transfert de colorants ont permis de déterminer que les canaux homotypiques de connexines 43 sont cinq fois plus perméables au jaune de Lucifer que les canaux homotypiques de connexines 40; les canaux hétérotypiques de connexines 40 et 43 ont, quant à eux, une perméabilité intermédiaire (Valiunas et al., 2002). Ces études démontrent bien l'importance de la composition des canaux et des propriétés que ceux-ci peuvent avoir selon le type de connexines qui les composent. Dans le foie, deux types de connexines sont présentes entre les hépatocytes, la connexine 26 et la connexine 32. On retrouve ainsi dans le foie des connexons homomériques formés de connexine 32 ou de connexine 26, des connexons hétéromériques, ainsi que des pores homotypiques et hétérotypiques (Falk et Lauf, 2001). Il est à noter que la connexine 43 est aussi présente dans le foie, mais uniquement au niveau des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins; elle ne forme pas de jonctions lacunaires entre les hépatocytes.

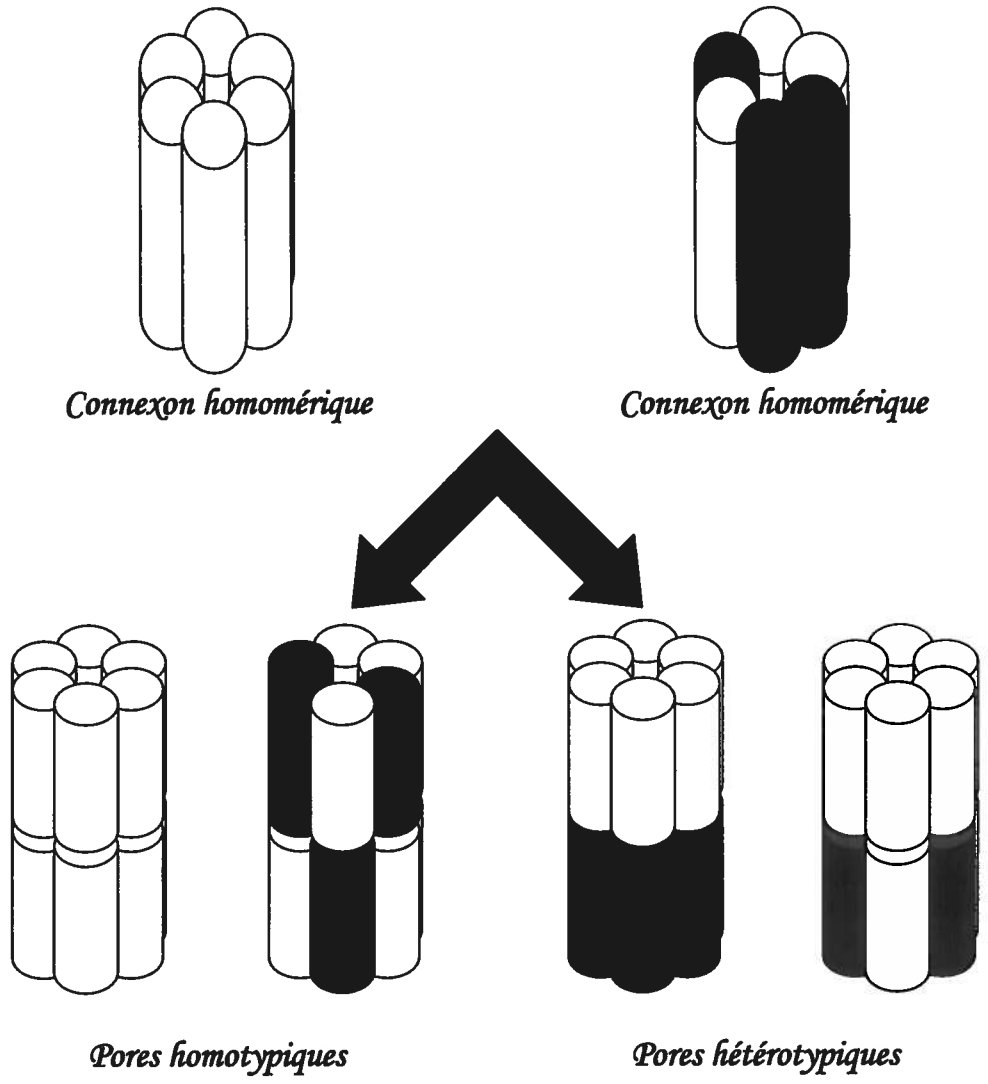


Figure 3: Représentation des différents types de connexines selon le type de connexines présentes dans un tissu
Les connexons peuvent être formés d'un seul (connexons homomériques) ou de différents types de connexines (connexons hétéromériques). Les pores intercellulaires peuvent également être formés de connexons de mêmes types (pores homotypiques) ou de types différents (pores hétérotypiques).

1.3. Importance de la connexine 32 dans le foie

La connexine 32 est la plus abondante dans le foie; elle est 50 fois plus transcrite et 20 fois plus détectée au niveau protéique que la connexine 26, l'autre connexine qui forme les jonctions lacunaires entre les hépatocytes (Zhang et Nicholson, 1989). Elle est ainsi la plus étudiée dans les recherches en hépatocancérogenèse. Elle est également probablement la plus impliquée des deux dans la cancérogenèse hépatique puisque son absence favorise le développement de tumeurs. Il a été démontré que les souris déficientes en connexine 32 (Cx32 KO) ont une plus grande susceptibilité au développement de tumeurs hépatiques provoquées chimiquement ou par radiation que les souris de type sauvage (« wildtype », WT) (Omori et al., 2001; Temme et al., 1997; King et Lampe, 2004a). Les souris Cx32 KO démontrent également un niveau plus bas de connexine 26 que les souris WT, ce qui suggère que la présence de la connexine 32 peut influencer celle de la connexine 26. Les études concernant les souris Cx32 KO proposent que la perte de connexine 32 favorise l'expansion clonale des cellules initiées, c'est-à-dire le développement de la tumeur et sa croissance (Omori et al., 2001; Temme et al., 1997; King et Lampe, 2004a). Cette hypothèse a été confirmée par une étude utilisant différentes lignées de souris Cx32 KO. Chez ces souris, l'absence de connexine 32 n'affecte pas le nombre de lésions présentes suite à une injection d'un initiateur de tumeurs, mais en favorise la croissance (Moennikes et al., 1999). Plus récemment, des analyses morphologiques et morphométriques des lésions formées par l'administration d'un initiateur de tumeurs chez des souris témoins et Cx32 KO, ont confirmé que les lésions sont légèrement plus nombreuses chez les souris Cx32 KO, mais surtout plus grosses, appuyant l'effet de promotion de l'hépatocancérogenèse provoquée par la perte de connexine 32 (Evert et al., 2002). Ces résultats appuient le rôle des jonctions lacunaires dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, puisqu'en leur absence, les cellules tumorales peuvent se multiplier de façon clonale et faire grossir la tumeur. Il est à noter que l'effet d'une déficience en connexine 26 sur l'hépatocancérogenèse ne peut être étudié puisque les souris Cx26 KO meurent au stade embryologique suite à des problèmes d'apports de nutriments à travers le placenta (Willecke et al., 2002).

Au niveau hépatique, d'autres études ont également démontré des modulations de la connexine 32 ou de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires aussi bien dans des tumeurs « bien formées » que lors des premiers stades de la cancérogenèse. Par des techniques de micro-injection de colorant *in vivo*, Krutovskikh et Yamasaki, (1997) ont observé une inhibition de la communication par les jonctions lacunaires aux premiers stades de l'hépatocancérogenèse expérimentale chez le rat. De plus, ni la protéine, ni les transcrits de la connexine 32 n'étaient détectables dans des foyers prénéoplastiques (EAF) présents dans le foie de ces rats. Il a également été démontré que plus l'hépatocancérogenèse progresse, moins les niveaux de connexine 32 sont élevés. En effet, une quantité décroissante de connexine 32 a été observée dans les cellules non-traitées, initiées (traitées avec du N-ethyl-N-hydroxy-ethylnitrosamine (EHEN)), des cellules de foyers, des cellules de nodules hyperplastiques et des cellules de carcinomes (Yamasaki et al., 1993). Des résultats semblables ont été obtenus dans 24 spécimens de cancer du poumon : dans les tissus cancéreux peu différenciés, la connexine 32 n'est pas détectée et les niveaux de connexine 43 sont considérablement réduits par rapport au tissu différentié (Jinn et al., 1998). Ces résultats suggèrent que lors de la progression de la cancérogenèse, il y a mise en place de voies de signalisation ou de mécanismes d'inhibition de la connexine 32, ce qui favorise le développement des tumeurs.

1.4. Régulation des connexines et la connexine 32

Il a été démontré que des changements de phosphorylation des connexines peuvent amener une fermeture des canaux, modifier la liaison des connexons, modifier le transport des connexines à la membrane et empêcher la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires (Lampe et Lau, 2004; Laird, 2005). Cette phosphorylation peut être faite par différentes kinases et la réponse obtenue peut varier selon le type de connexines et le tissu (Cruciani et Mikalsen, 2002). Par exemple, il a été démontré que l'AMP cyclique et la protéine kinase A (PKA) peuvent moduler la communication par les jonctions lacunaires de trois façons, selon le type cellulaire : (1) une augmentation lente de la communication par l'augmentation de la transcription des connexines ou une augmentation des niveaux protéiques; (2) une diminution rapide de la communication par les jonctions lacunaires; ou encore (3) une augmentation rapide de la communication, ces

deux dernières réponses étant probablement dues à des changements de phosphorylation des connexines (Cruciani et Mikalsen, 2002). La plupart des connexines possèdent des sites de phosphorylation, majoritairement situés dans la partie C-terminale cytoplasmique (Cruciani et Mikalsen, 2002). La connexine 32 ne fait pas exception et peut être régulée par phosphorylation.

Dans les hépatocytes, la conductance des jonctions lacunaires est augmentée après seulement quelques minutes en réponse à une exposition à des analogues de l'AMP cyclique; cette augmentation serait due à une hausse de la phosphorylation de la connexine 32 (Saez et al., 1986). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études *in vitro*, démontrant que la PKC et la PKA peuvent toutes deux phosphoryler la connexine 32 au niveau de la sérine 233 (Takeda et al., 1987; Takeda et al., 1989). Cette phosphorylation empêche la dégradation de la protéine, augmentant ainsi la communication entre les cellules vraisemblablement par une stabilisation et augmentation du nombre de canaux (Elvira et al., 1993). Il a également été démontré que les « mitogen-activated protein kinases » (MAP-kinases) peuvent inhiber l'expression de la connexine 32, et que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MAP-kinases empêche cette baisse (Yamamoto et al., 2004).

La calmoduline a également été associée à la régulation de la connexine 32. Elle peut réguler la connexine 32 en se liant sur deux sites, un situé dans la queue N-terminale et l'autre près de la partie C-terminale (Torok et al., 1997). Il a été suggéré que la calmoduline peut interagir avec la connexine 32 avant la formation des connexons et agir comme une sous unité intégrale régulant l'ouverture et la fermeture des connexons de connexines 32 (Peracchia et al., 2000). Le récepteur du facteur de croissance épithéliale (epithelial growth factor, EGF) peut également phosphoryler la connexine 32 suite à une stimulation à l'EGF; cette action est par contre grandement inhibée par la liaison de la calmoduline sur la connexine 32 (Diez et al., 1998). Au niveau transcriptionnel, peu d'études ont démontré l'implication de voies de signalisation dans la régulation des connexines, incluant la connexine 32. Cependant, la région promotrice du gène de la connexine 32 chez le rat est bien caractérisée.

1.4.1. Séquençage du gène et du promoteur de connexine 32

Le gène de la connexine 32 est localisé sur le chromosome X. Il a été séquencé et cloné pour la première fois en 1986 par deux équipes différentes (Paul, 1986; Kumar et Gilula, 1986). Depuis son séquençage, plusieurs équipes ont caractérisé à la fois le gène (Figure 4) et sa région promotrice (Figure 5). Il a été démontré que le gène de la connexine 32 est composé d'un cadre de lecture ouvert sur un seul exon, précédé par un large intron d'environ 6 kb et un petit exon non-codant en aval (Miller et al., 1988). Le gène de la connexine 32 est particulier puisque trois régions promotrices différentes ont pu être identifiées (Miller et al., 1988; Bai et al., 1993; Bai et al., 1995). La première est localisée en aval du premier exon, ne possède pas de boîte TATA, mais des sites Sp1 et des CCAAT ont pu être identifiés. Ce promoteur est actif dans le foie des rats adultes. Les deux autres promoteurs sont situés à l'intérieur de l'intron, possèdent des boîtes TATA et sont actifs dans les tissus neuraux et embryogéniques, mais sont inactifs dans le foie adulte (Neuhaus et al., 1995; Neuhaus et al., 1996). Le gène transcrit à partir des promoteurs consiste en trois exons, Ia, Ib et II, qui sont épissés alternativement afin de produire deux messager (ARNm) différents (Figure 4). L'exon Ia forme la plus grande partie de la région non traduite en 5' du transcrit présent dans le foie, alors que l'exon Ib est présent principalement dans le transcrit spécifique aux tissus nerveux. Le troisième exon II est partagé par les deux transcrits et contient le reste de région non traduite en 5', la région codante en son entier et la région non traduite en 3'.

Des îlots CpG ont également été identifiés dans la séquence, suggérant que la régulation de la connexine 32 pourrait aussi être influencée par la méthylation de son promoteur. Il a été démontré que la méthylation de cytidines à l'intérieur d'îlots CpG, un regroupement de cytidines et de guanines dans la séquence d'un gène, peut inhiber la transcription du gène (Jones et Baylin, 2002; Laird, 2003; Cedar, 1988). Cette hypothèse est supportée par une étude de la méthylation des promoteurs des connexines 32 et 43, dans deux lignées d'hépatocytes de rats : les MH_1C_1, une lignée bien différenciée qui exprime la connexine 32, mais pas la connexine 43, et les WB-F344, une lignée non transformée qui exprime la connexine 43, mais pas la connexine 32 (Piechocki et al., 1999). Les auteurs ont démontré que dans les cellules WB-F344, le promoteur de la connexine 32 est méthylé, alors que celui de la connexine 43 ne l'est pas. Par opposition,

le promoteur de la connexine 43 est méthylé dans les MH_1C_1, alors que celui de la connexine 32 ne l'est pas. Il a également été démontré que le promoteur de la connexine 32 est méthylé dans les cellules de carcinomes rénaux, ce qui inhibe sa transcription et inhibe son expression (baisse des niveaux d'ARNm) (Yano et al., 2004). Finalement, plusieurs sites conservés de liaison aux facteurs de transcription ont été identifiés dans la séquence promotrice de la connexine 32. Toutes ces études démontrent la complexité de la régulation de la connexine 32, mais également que les processus favorisant le développement de tumeurs hépatiques peuvent inhiber la transcription et le fonctionnement de la connexine 32 de nombreuses façons.

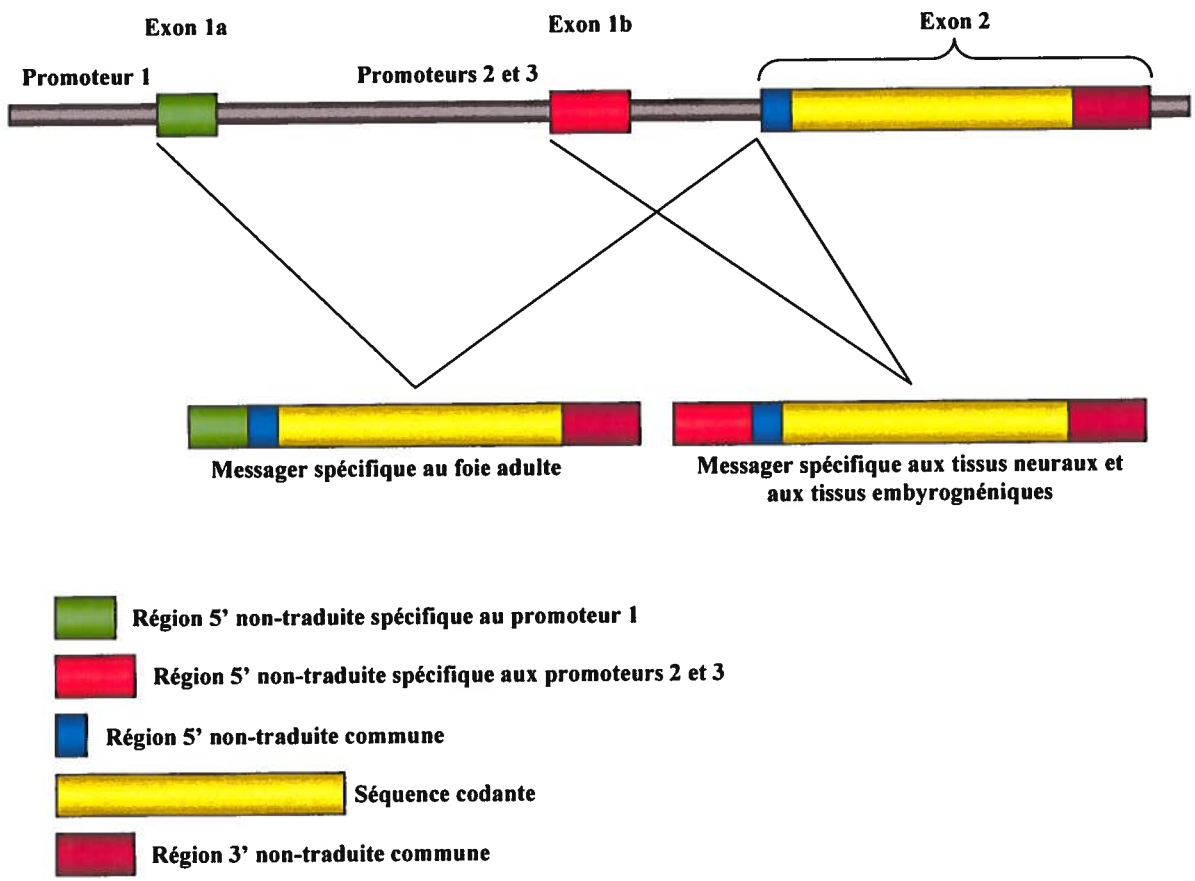


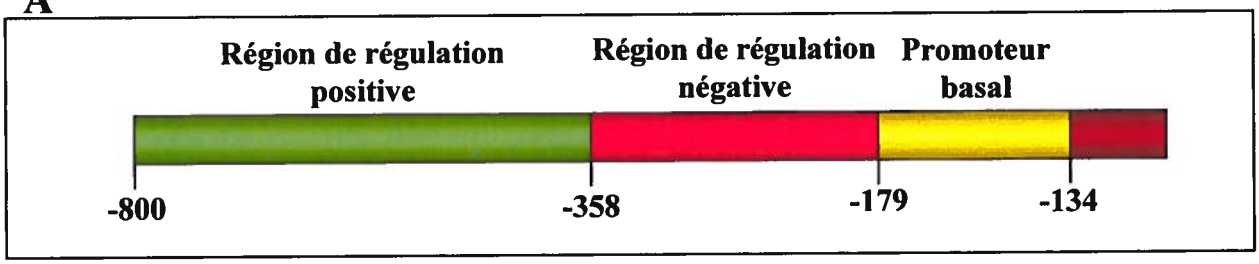
Figure 4: Représentation schématique de la structure du gène de la connexine
L'expression gène de la connexine 32 est sous le contrôle de trois promoteurs, le promoteur 1 est actif dans le foie de rat adulte, alors que les promoteurs 2 et 3 sont actifs dans les tissus neuraux et embryogéniques. Trois exons sont présents et leur épissage différentiel mène à la formation de deux messagers différents, exprimés dans les différents tissus.

1.4.2. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation

Différentes régions ont été identifiées dans la séquence du promoteur de la connexine 32 actif dans le foie (Promoteur 1, figure 4 ; figure 5). Ces études ont majoritairement été réalisées à l'aide de vecteurs d'expression couplés à un gène rapporteur, dans lesquels différentes parties de la région promotrice ont été clonées. Bai et collaborateurs (1993) ont identifié une région promotrice entre -800 et -358, une région inhibitrice entre -358 et -179 et la région du promoteur basal entre -179 et -134 (Figure 5A). Plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription ont également identifiés, notamment des sites Sp1, HNF-1, RXR, YY1 et NF-1 (Figure 5B) (Bai et al., 1993; Bai et al., 1995; Piechocki et al., 1999; Piechocki et al., 2000; Koffler et al., 2002; Field et al., 2003; Morsi et al., 2003). Cependant, la contribution réelle de chacun de ces facteurs de transcription n'est pas claire. Par exemple, il a été démontré que des mutations dans deux des quatre sites Sp1 situés entre -200 et -112 abolissent l'activité du promoteur, alors que des mutations dans les deux autres étaient sans effets (Piechocki et al., 2000). Les résultats étaient semblables lorsque les sites YY1 étaient mutés; certains ont un effet, alors que d'autres non. De plus, il semble y avoir des mécanismes différents contrôlant la régulation de la connexine 32 *in vitro* et *in vivo* (Bai et al., 1995; Morsi et al., 2003). En effet, en utilisant la technique de mobilité électrophorétique (« Electrophoresis Mobility Shift Assay », EMSA), il a été démontré que les complexes formés par la liaison de facteurs de transcription aux différentes portions du promoteur de la connexine 32 peuvent être différents selon les lignées cellulaires utilisées, ou si les extraits proviennent de tissus (Morsi et al., 2003; Piechocki et al., 2000; Bai et al., 1995). Cependant, il est à noter que la lignée d'hépatocytes de rat MH_1C_1 semble être un bon modèle pour l'étude de la régulation du promoteur de la connexine 32 puisqu'il a été démontré que les complexes formés lors d'EMSA sont similaires à ceux formés lors d'analyses utilisant des tissus (Field et al., 2003; Morsi et al., 2003). Finalement, aucune étude ne démontre si certaines régions et certains facteurs de transcription peuvent être impliqués dans la cancérogenèse.

A

Représentation schématique du promoteur de la connexine 32 actif dans le foie



B

-753	CAGATC	CTTCAGTTAA	TGGTTGACAT	TCTGTTTACC	TAAATGATTG
-707	CCAAGAGTTT	CTGCTTACAT	ATGACAGATC	AACTGCCTTA	GCCCTAAGAG
-657	TAGAAGACAT	TTTTTAAGTA	AGTTTTATGA	TTCTGGGATG	TAACTAGAAT
-607	GACTGCGACT	GCAGTCTATC	TCCAGCGATT	AAGTACATGG	GGAAAAAGCA
-557	AATGATAGCC	TGCTATCGCT	ATATAGGTAG	GGAGCAAGAC	CCTCTCCCAT
-507	TTTGACCTCT	GGTGTTTTTG	TCCTCCCAAT	TGTCCATAGT	TTTAGAGCCT
-457	GGGATCTAGA	GGAGATAGCA	TACAGCACCA	GAGTCCTCTA	TGCTGCATGC
-407	CACAAAGTGG	TCTTACTTGA	AGGCCAAGAG	TTGGCATAGC	TGAGATGTGT
-357	TAAGCAGCAA	TTCAGTTAGT	ACCCCCACAT	AGGTCCAATA	TGGCATTTTA
-307	ATGACAAATG	ATGCTTTCTT	CCTCTGGACA	GGGCAAGAAC	TTTAGATCCA
-257	AATCCATTGG	GAACTCAGAG	ATCAATCTTG	TTTAATGATT	GTGTGTGGAA
-207	CGGGGGTGGG	GCTGGTTAAT	GTTTCTCTGC	TTCCTCTTGG	GCTGTGGGCC
-157	ATGTCAAGCT	CCGGTCCTGG	GCTGCTTGTC	CCTCCCCTGG	GCTGGGCTTT
-107	GACAGTACCT	AGTGGCATTG	AACAGACAGA	CACGCCTGCA	TACATTCCCT
-57	GGGAAAAAGC	AGTTGCAACC	AGGTG		

Figure 5: Séquence du promoteur de la connexine 32 actif dans le foie de rat adulte
(A) Représentation schématique des différentes régions promoteur de la connexine 32 actif dans le foie (Figure 4), tel que suggéré par Bai et collaborateurs (1993). (B) Séquence du promoteur de la connexine 32. Les sites de liaison des facteurs de transcription sont indiqués par des boîtes. Un site NF-1 est indiqué par un trait rouge. Trois boîtes CCAAT sont également indiquées par un trait bleu foncé. Les séquences surlignées correspondent aux portions du promoteur impliquées dans la régulation de la connexine 32 dans le foie selon Morsi et collaborateurs (2003) ; (Fr70 ;Fr53 ;Fr110 ;Fr26).

Figure inspirée de Piechocki et al., 2000

1.5. Importance des jonctions lacunaires dans la cancérogenèse

Comme il a été mentionné précédemment, la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires est très importante afin de maintenir l'homéostasie à l'intérieur des tissus. Par leur communication rapide, les jonctions lacunaires permettent le passage de messagers secondaires et de molécules importants pour le contrôle de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Il a été suggéré que lorsqu'une cellule coupe les liens qui l'unissent aux autres cellules du même tissu, plusieurs éléments qui contrôlaient sa coordination avec les autres cellules ne lui sont plus transmis. Elle devient alors en mesure de proliférer sans les contraintes des cellules avoisinantes, ce qui favorise le développement des tumeurs. Cette hypothèse est appuyée par les études de Yamasaki (Yamasaki et al., 1993) qui ont démontré une relation inverse entre les capacités de communication et la prolifération cellulaire.

En 1966, Loewenstein fut le premier à proposer que la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires pouvait être impliquée dans le cancer (Loewenstein, 1966). Depuis, il a été démontré que des agents promoteurs de tumeurs peuvent moduler l'expression des connexines qui les forment, empêcher leur transcription, ou tout simplement inhiber la communication par les jonctions lacunaires (Yamasaki et al., 1999; Trosko et Ruch, 1998). Les agents promoteurs de tumeurs sont des substances qui favorisent le dévelopement clonal des tumeurs cancéreuses (voir section 2.4; Trosko et Ruch, 1998). Plusieurs produits considérés comme des carcinogènes épigénétiques peuvent moduler la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires. Ce mécanisme de promotion de tumeur est associé, entre autre, au TCDD (Wärngärd et al., 1996), au pentachlorophénol (Sai et al., 2000), au 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphényl (Bager et al., 1994), aux biphényls polychlorés (BPC), au clofibrate (Krutovskikh et al., 1995), au DDT (Tateno et al., 1994; Ruch et al., 1994) et au cadmium (Fang et al., 2001).

De nombreuses études *in vitro* ont démontré les caractéristiques tumorales acquises en absence de connexines. Par exemple, il a été démontré que des fibroblastes de rat, des cellules exprimant la connexine 43 peuvent inhiber la croissance de cellules tumorales transformées (Goldberg et al., 1994). Cependant, si l'expression de la

connexine 43 est inhibée dans ces mêmes cellules, elles perdent cette capacité. Dans le même ordre d'idée, l'inhibition de la connexine 43 dans des cellules BALB/c 3T3 amène une perte de la communication par les jonctions lacunaires et une augmentation de la croissance cellulaire (Ruch et al., 1995). Lors de la transfection de dominants-négatifs de connexine 43 dans des cellules de carcinomes de vessie de rat BC31, des canaux se forment, mais leur perméabilité est altérée et la croissance des cellules est augmentée (Krutovskikh et al., 2000). Plus récemment, l'utilisation d'ARN d'interférence (siRNA) et d'ARN en épingle (« short hairpin RNA ») spécifiques à la connexine 43 dans des lignées cancéreuses de sein a inhibé la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires, et a augmenté la croissance cellulaire ainsi que la capacité de migration de ces cellules (Shao et al., 2005).

De plus, plusieurs études *in vitro* ont démontré que les connexines pouvaient être considérées comme des gènes inhibiteurs de tumeurs par leur capacité à renverser le phénotype cancéreux (Trosko et Ruch, 1998). Par exemple, il a été démontré que la connexine 32 peut renverser les capacités métastasiques dans des cellules de carcinomes rénaux, les Caki-1, ainsi que diminuer leur développement en tumeurs lorsque injectées dans des souris immunodéficientes (nude mice) (Fujimoto et al., 2005a; Fujimoto et al., 2005b). Il a été démontré qu'une surexpression de la connexine 32 peut également renverser le phénotype cancéreux dans le cancer du poumon (King et Lampe, 2004b). Il en est de même pour les autres types de connexines. Par exemple, une surexpression de la connexine 26 peut modifier le phénotype cancéreux dans des cellules du sein et de la prostate (Tanaka et Grossman, 2004; Momiyama et al., 2003). Hirschi et al. (1996) ont observé un changement au niveau de la prolifération cellulaire et l'apparition de fonctions de cellules plus différentiées dans des cellules de carcinomes mammaires humains, lorsque celles-ci sont transfectées avec la connexine 26 ou la connexine 43. Zhu et al (1991), ont également démontré que la transfection de connexine 43 dans des cellules de gliomes C6 résulte en une suppression de la croissance cellulaire et de la tumorigénicité. Mesnil et al. (1995) ont obtenu un résultat semblable, soit une baisse du niveau de croissance cellulaire, en transfectant des cellules HeLa avec la connexine 26.

Ces études démontrent bien l'importance des modulations de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires lors de la cancérogenèse. Cependant, il existe

d'autres types de jonctions entre les hépatocytes dans le foie, notamment les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Ces autres jonctions peuvent également être modulées lors de l'hépatocancérogenèse.

1.6. Interactions entre les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes

Il existe différents types de jonctions entre les cellules participant au contrôle de l'homéostasie à l'intérieur des tissus. Outre les jonctions lacunaires, les hépatocytes forment également deux autres types de jonctions, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Ces trois types de jonctions interagissent ensemble afin de permettre une bonne interaction cellule-cellule, ainsi qu'une signalisation et une communication efficace (Li et Herlyn, 2000; Yamamoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). Conséquemment, des modulations des protéines des jonctions serrées et adhérentes ont également été associées à la cancérogenèse (Frixen et al., 1991; Mareel et al., 1994). Dans les tumeurs, les protéines formant ces jonctions sont souvent inhibées ou mal localisées, ce qui empêche le bon fonctionnement de la jonction, et peut également perturber la formation ou l'efficacité des autres jonctions (Conacci-Sorrell et al., 2002; Martin et al., 2004; Itoh et Bissell, 2003; Chunthapong et al., 2004; Howard et al., 2005).

Plus particulièrement, les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes interagissent dans de nombreuses situations. Il a été démontré, par immunoprécipitation dans des hépatocytes de rat, que la connexine 32 est associée avec l'occludine et la claudine 1, des protéines des jonctions serrées, ainsi qu'avec la ZO-1, une protéine présente dans les jonctions adhérentes et serrées (Kojima et al., 2001). Fujimoto et al. (1997) quant à eux, ont démontré une co-localisation entre la cadhérine épithéliale (E-cadhérine) et la connexine 26, ainsi qu'entre l'α-caténine, une protéine de jonctions adhérentes, et la connexine 26 dans le foie de rat.

De plus, il a été suggéré que, dans certains types cellulaires, les jonctions adhérentes doivent être formées pour permettre le rapprochement des membranes des cellules adjacentes et ainsi permettre aux connexons des deux cellules de se lier et d'établir la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires (Giepmans, 2004). Cette hypothèse est soutenue par une étude démontrant que la E-cadhérine et l'α-caténine sont co-localisées avec les jonctions lacunaires nouvellement formées dans des

hépatocytes, ce qui suggère que les jonctions adhérentes favorisent la formation des jonctions lacunaires (Fujimoto et al., 1997). Dans des cellules murines de peau P3/22, modifiées de façon à ce qu'elles expriment la E-cadhérine, l'établissement des jonctions adhérentes permet la formation de câbles d'actine ; ces câbles transportent alors les connexines 43 du cytoplasme vers la membrane, et permettent la commnunication intercellulaire par les jonctions lacunaires entre les cellules (Hernandez-Blazquez et al., 2001). Des résultats similaires ont été obtenus par une autre équipe travaillant également dans des cellules épidermales de souris (Jongen et al., 1991). Dans des cellules de Novikoff, des cellules de foie de rat, l'utilisation d'un anticorps contre la E-cadhérine empêche la formation des jonctions adhérentes, mais amène également une baisse de la formation des jonctions lacunaires et de la communication intercellulaire, tel que démontré par une inhibition du transfert de colorant (Meyer et al., 1992).

Finalement, plusieurs études démontrent une inhibition des protéines des jonctions adhérentes, dont la E-cadhérine, concomitante à une inhibition de la synthèse des connexines ou à une modulation des connexines ou de la communication intercellulaire lors de la cancérogenèse. Pour l'instant, il n'est pas encore déterminé si les deux baisses sont simultanées, si la baisse de E-cadhérine provoque une baisse des connexines, ou vice-versa. Dans une série d'expériences à l'aide de lignées cellulaires de cellules épithéliales de trachée de rat normales et d'autres lignées représentant différents stades d'avancement dans la cancérogenèse, il a été démontré que les cellules normales ou de stades tumorales précoces communiquent par les jonctions lacunaires et expriment la E-cadhérine. Par contre, les populations plus cancéreuses perdent la capacité de communiquer par les jonctions lacunaires, expriment de faibles niveaux de connexines et n'expriment plus la E-cadhérine (Terzaghi-Howe et al., 1997). Dans des cancers de la prostate chez l'humain, il a été démontré que le processus de cancérogenèse est associé avec une perte de la E-cadhérine et un changement dans l'expression des connexines, qui se traduit par une perte de la connexine 32 et une augmentation de la connexine 43 (Habermann et al., 2001). Ces différences dans les niveaux d'expression des connexines et de la E-cadhérine sont induits par une augmentation des niveaux d'estrogènes, tel que démontré par une exposition au benzoate d'oestradiol, et résultent en une perte d'adhésion et de communication intercellulaire (Habermann et al., 2001). Finalement,

dans les mélanomes, il a été démontré qu'il y a un changement au niveau de l'expression des cadhérines : les kératinocytes commencent à exprimer la N-cadhérine au lieu de la E-cadhérine et cessent de communiquer entre eux par les jonctions lacunaires. Cependant, la restauration des niveaux de E-cadhérine par transfert rétroviral du gène rétablit la communication intercellulaire entre les kératinocytes (Hsu et al., 2000). Ces résultats démontrent bien les interrelations existantes entre les protéines des différents types de jonctions. Ils suggèrent également qu'il existe des mécanismes communs pouvant réguler à la fois les protéines des jonctions lacunaires et celles des jonctions adhérentes.

2. Les jonctions adhérentes

2.1. Le rôle et la structure des jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont impliquées dans l'organisation tissulaire, l'adhésion entre les cellules, mais également dans la transduction de signaux au noyau, entre autre par leur implication dans la voie de Wnt (Goodwin et Yap, 2004; Schambony et al., 2004; Nusse, 2005). Elles sont présentes à la membrane de pratiquement tous les types cellulaires et sont composées d'un complexe de protéines cytoplasmiques et membranaires. Parmi celles-ci, les cadhérines sont les protéines qui permettent la liaison aux cellules adjacentes. Plus de 80 membres de cette famille ont été découverts chez les vertébrés et les invertébrés, dont les premières cadhérines découvertes, ou classiques, sont la cadhérine épithéliale, la cadhérine neurale et la cadhérine endothéliale vasculaire (E-cadhérine, N-cadhérine et VE-cadhérine) (Nollet et al., 2000; Goodwin et Yap, 2004). Ce sont des glycoprotéines intégrales et transmembranaires ayant un domaine extracellulaire contenant cinq régions répétées de cent dix acides aminés. Ces régions de liaison permettent aux cadhérines de se lier de façon homotypique.

Les cadhérines sont liées à un complexe de protéines cytoplasmiques par leur domaine intracellulaire (Figure 6). Pour les cadhérines classiques, dont la E-cadhérine présente dans le foie, ce complexe est composé des caténines, aussi connues sous le nom de plakoglobines (Goodwin et Yap, 2004; Knudsen et Wheelock, 2005; Beavon, 2000; Giepmans, 2004). La β-caténine se lie à la fin de la région cytoplasmique de la cadhérine et recrute la ZO-1. L'α-caténine se lie au complexe également via la cadhérine. La ZO-1 et l'α-caténine se lient ensuite directement au cytosquelette d'actine où elles interagissent avec d'autres protéines liées à l'actine. La caténine p120, quant à elle, se lie également à la queue de la cadhérine, mais plus près de la membrane où elle servirait de point d'ancrage. Un bon assemblage de ces protéines est important pour le fonctionnement adéquat des jonctions adhérentes. La E-cadhérine, plus particulièrement, est essentielle et son absence ou encore une mauvaise régulation de cette protéine a été associée à la cancérogenèse.

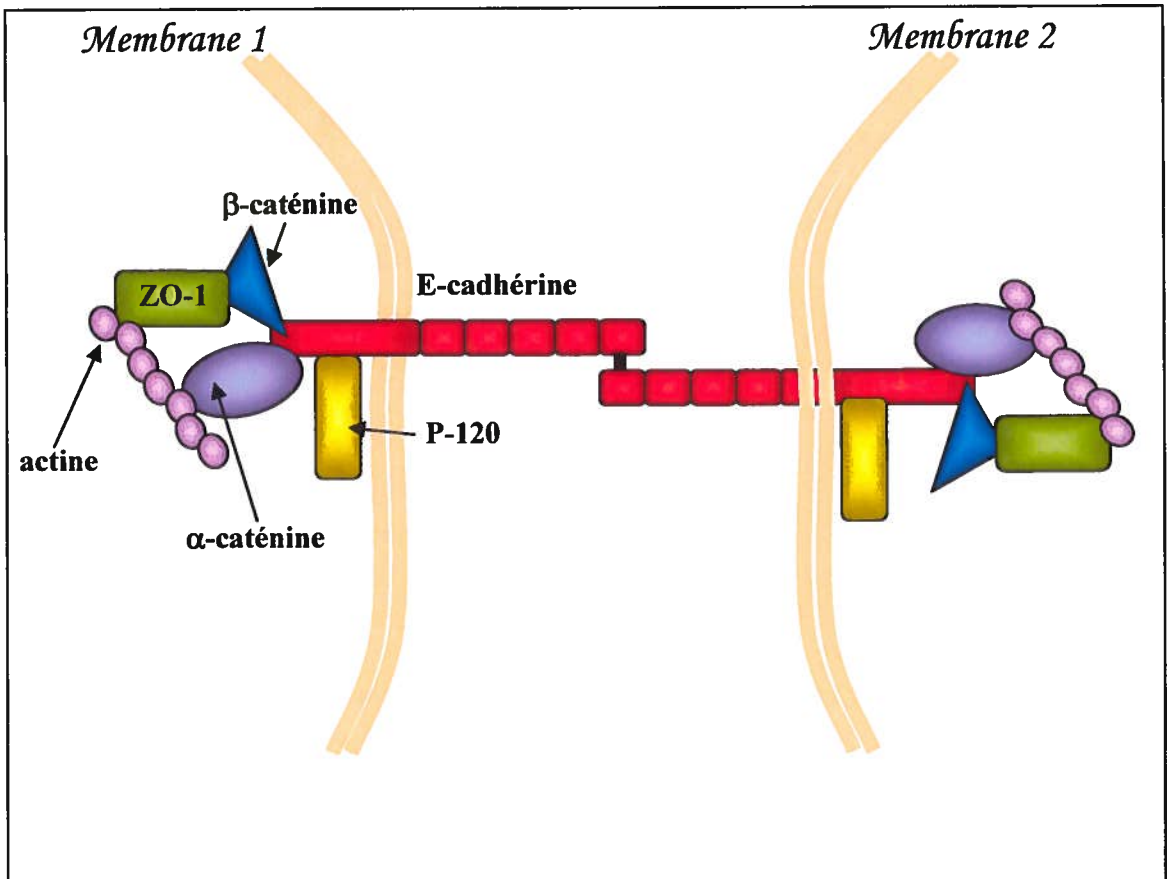


Figure 6: Schéma de la jonction adhérente
La E-cadhérine est une protéine transmembranaire qui se lie de façon homotypique avec une E-cadhérine de la cellule adjacente. La β-caténine se lie à la queue de la E-cadhérine, et recrute la ZO-1. L'α-caténine se lie également à la E-cadhérine. Ces deux dernières protéines se lient au cytosquelette d'acine. La P-120 se lie également à la E-cadhérine, mais plus près de la membrane de la cellule pour y ancrer la jonction.

2.2. Importance des jonctions adhérentes dans la cancérogenèse

Une modulation des jonctions adhérentes a été observée dans des tumeurs provenant de différents types de tissus (Shao et al., 2005; Conacci-Sorrell et al., 2002). Par ceux-ci, un changement de régulation et/ou d'expression de la E-cadhérine a été observé dans le cancer des poumons (Ohira et al., 2003), le cancer du système gastrique (Joo et al., 2000), le cancer de la prostate (Chunthapong et al., 2004), le cancer du sein (Howard et al., 2005; Fearon, 2003; Hajra et al., 2002) et le cancer du foie (Jiao et al., 2002). Une perte d'adhésion a également été associée au caractère métastatique des tumeurs; la perte de la E-cadhérine permettrait à la cellule tumorale de quitter la tumeur vers un site distant (Frixen et al., 1991; Beavon, 2000; Genda et al., 2000; Lu et al., 2003).

Une inhibition de la E-cadhérine a également été associée à la transition épithéliale-mésenchymale (« Epithelial-Mesenchymal Transition », EMT). Ce processus est caractérisé par une perte de la E-cadhérine, une relocalisation de la β-caténine au noyau, l'acquisition d'une forme cellulaire allongée et par l'acquisition de la capacité de migrer à travers la matrice extracellulaire (Kim et al., 2002). Ce processus est très important durant le développement, mais a également été associé à la cancérogenèse, surtout lors de l'acquisition du caractère métastasique (Kang et Massague, 2004). Il a été démontré que la baisse de la E-cadhérine lors de la EMT implique l'activation de la voie de l'ILK (Oloumi et al., 2004).

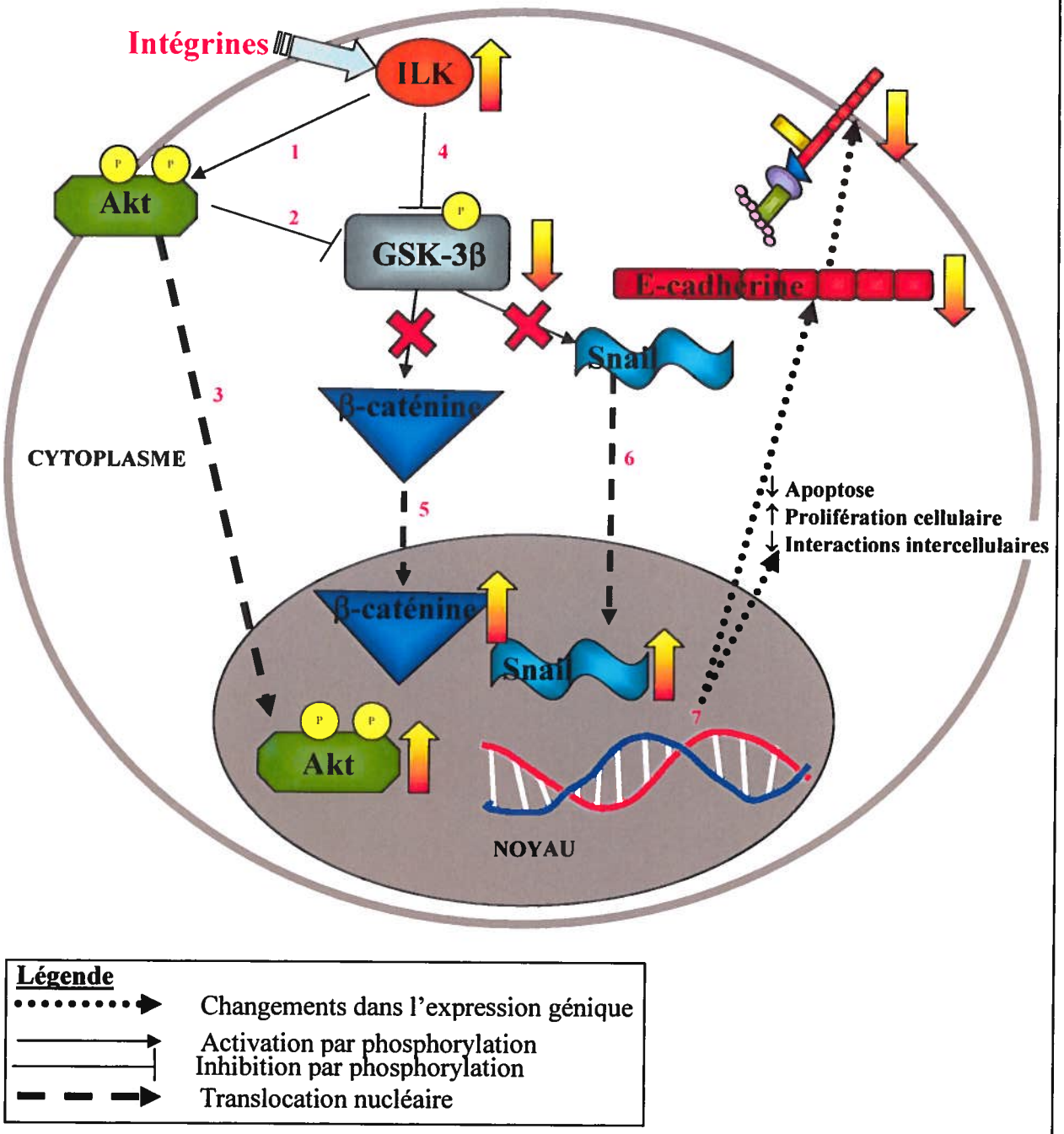
2.3. Implication de la voie de l'ILK dans la régulation de l'expression de E-cadhérine

Les intégrines sont des récepteurs situés à la membrane plasmique des cellules et impliqués dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation intracellulaire (Dedhar, 2000). Ce sont des récepteurs hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Hynes, 2002). L'activation des intégrines par des facteurs de croissance ou par d'autres stimuli provenant de la matrice extracellulaire, induit une cascade de phosphorylation qui débute par une augmentation de l'activité de l'ILK et se terminant par des changements au niveau de la régulation de gènes impliqués dans une stimulation de prolifération cellulaire, dans une inhibition de l'apoptose, de la différenciation et des interactions cellule-cellule (Figure 7) (Hannigan et al., 2005). De nombreuses études ont

démontré que l'activation de la voie de l'ILK mène à une inhibition de la E-cadhérine (Wu et al., 1998; Oloumi et al., 2004; Huang et Wu, 1999; Wu et Dedhar, 2001; Hannigan et al., 2005; Tan et al., 2001). Bien qu'il a longtemps été pensé que cette baisse serait due à la translocation de la β-caténine dans la noyau, qui agirait alors comme co-facteur de transcription pour en inhiber sa transcription, de récentes études ont suggéré que la baisse de l'expression de la E-cadhérine serait plutôt régie par l'activation de Snail, un facteur de transcription de la famille des « zinc fingers » dont l'activité serait elle-même contrôlée par GSK3β (Zhou et al., 2004; Bachelder et al., 2005). Il a été démontré que Snail peut se fixer sur des sites «E-box» situé dans le promoter de E-cadhérine et inhiber sa transciption (Peinado et al., 2004 ; Bachelder et al., 2005). Étant associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et à une inhibition de l'apoptose, une surexpression de la voie de l'ILK a également été associée à la cancérogenèse.

2.3.1. Implication de la voie dans la cancérogenèse

L'ILK est une protéine bien conservée dans les différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés. Elle a été découverte en 1996 et identifiée comme une protéine interagissant avec la sous-unité cytolasmique de l'intégrine β1 (Hannigan et al., 1996). Bien que son activité soit généralement basse dans les tissus normaux, elle peut cependant être stimulée par les interactions cellulaires et les facteurs de croissance (Wu, 2001; Wu et Dedhar, 2001). Des niveaux élevés d'ILK ont été observés dans des tumeurs de différents types cellulaire, notamment dans les cellules gliales, la thyroïde, les poumons, la peau, le colon, la prostate, les ovaires et les seins (Koul et al., 2005 ; Younes et al., 2005 ; Dai et al., 2003 ; Wu et Dedhar, 2001; Persad et Dedhar, 2003; Hannigan et al., 2005). Il a été démontré que l'intensité du marquage immunohistochimique spécifique à l'ILK augmente graduellement avec la progression du stade de la tumeurs dans la cancérogenèse de l'ovaire, ainsi que dans le cancer de la prostate (Ahmed et al., 2003; Graff et al., 2001). Il a également été proposé que l'ILK pourrait être considéré comme un oncogène puisque l'injection de cellules exprimant de haut niveaux de ILK induit la formation de tumeurs chez des souris immunodéficientes (Wu et al., 1998).



Légende

- Changements dans l'expression génique
- Activation par phosphorylation
- Inhibition par phosphorylation
- Translocation nucléaire

Figure 7: Activation de la voie de l'ILK
Lorsque la voie de l'ILK est activée par les intégrines ou par des facteurs de croissance, les niveaux d'ILK augmentent, la Akt est activée et la GSK3β est inactivée par phosphorylation. Akt, β-caténine et Snail transloquent tous trois dans le noyau. On observe alors une baisse de la E-cadhérine.

De plus, lors d'études *in vitro,* l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'ILK diminue la croissance de cellules humaines de carcinome du colon (Hill et Hemmings, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque des cellules de carcinomes de prostate ont été traitées avec des inhibiteurs de l'ILK ou des siRNA spécifiques à l'ILK; la prolifération de ces cellules ralentissaient de façon significative (Tan et al., 2004). Dans cette étude, il a également été démontré que le facteur de croissance épithélial vasculaire (VEGF) active l'ILK, ce qui favorise l'angiogenèse. Finalement, la voie de signalisation de l'ILK est impliquée dans de nombreux processus et comprend de nombreuses ramifications. Entre autre, la voie de l'ILK a été associée à la migration des cellules, la survie et la prolifération cellulaire, la transduction de signaux vers le noyau et l'adhésion focale (Grashoff et al., 2004; Huang et Wu, 1999; Wu, 2001). Ainsi, la cascade présentée dans le cadre de cette thèse n'est pas exclusive et ne traitera pas de toutes les protéines pouvant être activées ou inactivées par l'ILK, mais seulement de quelques cibles importantes et ayant été impliqués dans la régulation de la E-cadhérine.

2.3.2. Description de la voie de signalisation

Une fois activée, l'ILK peut phosphoryler de nombreuses protéines. Une des cibles de ILK est la protéine Akt (Akt/PKB) (Figure 7, étape 1). Sous sa forme active phosphorylée, la protéine Akt peut alors à son tour phosphoryler d'autres kinases, dont la glycogène synthétase kinase-3β (GSK3β) (étape 2), et migrer ensuite dans le noyau où elle module des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'apoptose, de la prolifération cellulaire et dans la différenciation (étape 3) (Brazil et Hemmings, 2001; Pekarsky et al., 2000). L'ILK peut également phosphoryler GSK3β, ce qui la rend inactive (étape 4). La phosphorylation de la GSK3β amène une translocation nucléaire de β-caténine (étape 5) et l'activation de Snail (étape 6). Ces deux facteurs de transcription peuvent modifier l'expression de gènes impliqués, entre autre, dans la prolifération cellulaire et les interactions cellules-cellules (étape 7). En résumé, l'activation de la voie de l'ILK amène l'activation de la protéine Akt et l'inactivation de la GSK3β, ce qui module la transcription génique par l'activation ou l'inhibition de facteurs de

transcription. Les conséquences de la phosphorylation de ces différents membres de la voie de l'ILK sont discutées ci-dessous.

2.3.3. Akt, rôles nucléaire et cytoplasmique

Une fois recrutée à la membrane suite à une stimulation par divers facteurs, la protéine Akt doit être phosphorylée au niveau de la thréonine 308 (Thr308) et de la sérine 473 (Ser473) afin d'être activée (Song et al., 2005; Brazil et Hemmings, 2001). De plus, certaines études récentes suggèrent qu'une troisième phosphorylation sur une tyrosine pourrait également être impliquée dans l'activation complète de la protéine Akt (Conus et al., 2002; Jiang et Qiu, 2003). Il est reconnu depuis longtemps que la phosphorylation sur la Thr308 implique la PDK1. Cependant, la phosphorylation de la Ser473 est plus controversée (Song et al., 2005). Plusieurs candidats pouvant être impliqués dans la phosphorylation de la protéine Akt sur la Ser473 ont été suggéré, dont la protéine Akt elle-même, la kinase MAPKAP, la PDK1, la PDK2 et bien sûr l'ILK (Toker et Newton, 2000; Leslie et al., 2001; Leslie et al., 2001). En 1998, Delcommenne et collaborateurs ont démontré que sous sa forme active, l'ILK peut phosphoryler la protéine Akt sur la Ser473, alors qu'une forme déficiente inactive en est incapable. Par la suite, il a été suggéré que l'ILK agit plutôt par un mécanisme indirect, jouant le rôle de protéine adaptatrice lors de la phosphorylation de la protéine Akt (Lynch et al., 1999). Cependant, cette hypothèse a été démenti deux ans plus tard grâce à des études d'activité kinase en gel (« in-gel kinase assay »), des études de spectroscopie de masse et d'immunoprécipitation qui ont démontré l'action directe de l'ILK sur la protéine Akt (Persad et al., 2001). Finalement, des études plus récentes ont confirmé que l'inactivation de l'ILK réduit de façon significative le niveau de phosphorylation de la protéine Akt sur la Ser473 (Troussard et al., 2003).

Une fois phosphorylée, la protéine Akt devient active et peut alors phosphoryler d'autres protéines à la membrane et dans le cytoplasme afin de les activer ou de les désactiver. La première cible de la protéine Akt a avoir été identifiée a été la GSK3β (Cross et al., 1995). À cette époque, la GSK3β était presque exclusivement associée à la glycogenèse; le premier rôle de la protéine Akt a ainsi été associé au métabolisme du glucose. De nombreuses cibles de la protéine Akt ont par la suite été identifiées,

impliquant la protéine Akt dans la croissance cellulaire, l'angiogenèse, la transcription, la survie cellulaire, l'apoptose et dans la synthèse protéique (Brazil et Hemmings, 2001; Brazil et al., 2004).

Il a été suggéré que la protéine Akt pourrait agir comme facteur de transcription ou moduler l'activité d'autres facteurs de transcription puisqu'elle migre dans le noyau suite à une stimulation des cellules par des facteurs de croissance (Figure 7) (Andjelkovic et al., 1997; Meier et al., 1997; Neri et al., 2002). Cette hypothèse est appuyée par l'identification récente d'un motif d'exportation nucléaire dans la séquence de la protéine Akt ; une mutation dans ce domaine, sans altérer l'activité de la protéine, maintient de la protéine Akt dans le noyau (Saji et al., 2005). De plus, il a été suggéré que la translocation nucléaire de la protéine Akt peut être facilitée par le Tcl1, un oncogène impliqué dans le développement de la leucémie humaine (Pekarsky et al., 2000). Dans le noyau, la protéine Akt peut phosphoryler différentes protéines et ainsi contrôler leur action (Neri et al., 2002). Il a également été suggéré que la localisation nucléaire pourrait être associée à la cancérogenèse puisque que la protéine Akt est localisée dans le noyau dans des tissus cancéreux humains provenant de la thyroïde, et qu'elle permet la migration de cellules de la thyroïde cancéreuses humaines à travers des membranes dans les chambres Boyden *in vitro* (Vasko et al., 2004; Saji et al., 2005). Cette hypothèse est appuyée par une étude récente qui démontre que la quantité nucléaire de la protéine Akt augmente avec la progression des stades de la tumeurs dans des tissus de cancer de la prostate (Van de Sande et al., 2005). Toutes ces études démontrent l'importance de la protéine Akt dans le cancer et elles suggèrent que la localisation nucléaire pourrait être importante pour la régulation de l'expression de gènes importants pour la progression de la cancérogenèse.

2.3.4. Le rôle de la Glycogène Synthétase kinase-3β

L'ILK et la protéine Akt peuvent toutes deux phosphoryler la GSK3β (Cohen et Frame, 2001). Un des rôle de la GSK3β est de contrôler la localisation et la quantité de la β-caténine (Figure 8). Lorsqu'elle est active, la GSK3β se lie à la portion cytoplasmique libre de la β-caténine, c'est-à-dire la portion non liée aux jonctions adhérentes comme il a été vu précédemment, pour la cibler afin d'être dégradée par la voie des protéosomes

(Figure 8) (Cohen et Frame, 2001; Kim et Kimmel, 2000; Frame et Cohen, 2001). Cependant, lorsqu'elle est inactivée par la phosphorylation de l'ILK ou de la protéine Akt lors de l'activation de la voie de l'ILK, la GSK3β ne peut plus se lier à la β-caténine. Cette dernière s'accumule alors dans le cytoplasme, et pourra ensuite migrer dans le noyau où elle agira comme co-facteur de transcription, liée au TCF (Figure 7) (van Noort et al., 2002).

Un autre rôle de la GSK3β est de phosphoryler Snail (Figures 7 et 8). Deux sites consensus de phosphorylation de la GSK3β ont été identifiés sur la séquence de Snail; ces sites contrôlent sa localisation et sa dégradation (Zhou et al., 2004). Il a été démontré que l'inactivation de la GSK3β, par des siRNA ou par des inhibiteurs spécifiques, stimule la transcription de Snail et diminue les niveaux de la E-cadhérine dans les cellules mammaires et épithéliales (Bachelder et al., 2005). Snail peut alors se lier à des sites E-box sur le promoteur de la E-cadhérine et en diminuer la transcription.

Une inactivation de la GSK3β a également été associée à la cancérogenèse (Gotoh et al., 2003; Kim et Kimmel, 2000). Cette section apporte un constat important, à savoir qu'individuellement, tous les membres de la voie de l'ILK ont été associés au cancer et peuvent tous être des impliqués dans différentes étapes de la cancérogenèse.

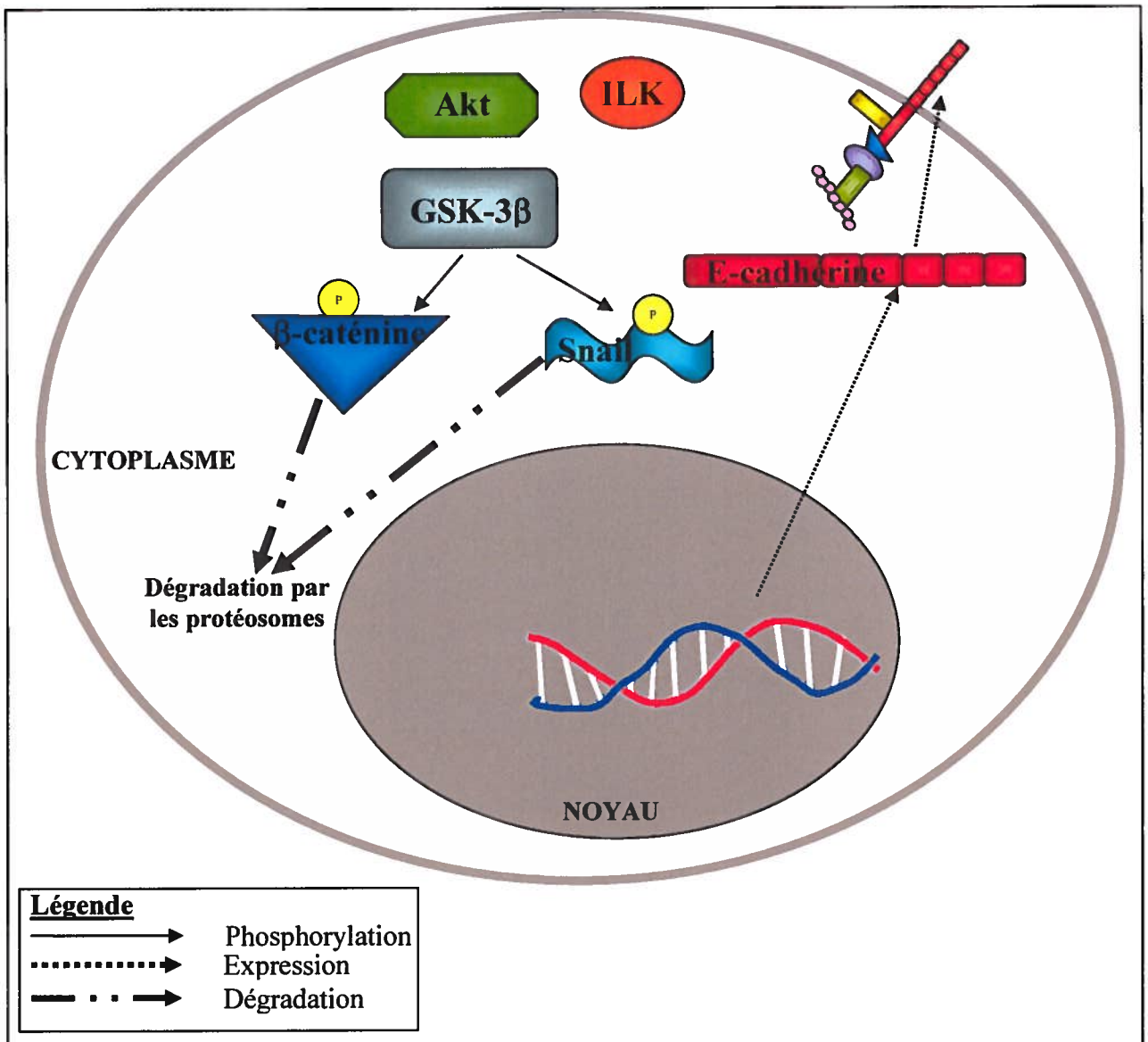


Figure 8: Rôle de la GSK3β lorsque la voie de l'ILK est inactive
Dans la cellule au repos, l'ILK est peu exprimée, la protéine Akt n'est pas active, mais la GSK3β est active. La GSK3β se lie à la β-caténine et à Snail et les cible pour la dégradation, empêchant ainsi leur action comme facteurs de transcription.

2.4. Définition de la cancérogenèse

Il est généralement admis que la cancérogenèse est un processus comportant trois stades : l'initiation, la promotion et la progression (Pitot, 1993). Lors de l'initiation, des cellules acquièrent des mutations (cellules initiées); ces mutations peuvent être héréditaires, spontanées ou induites par une agent chimique ou physique. Ces substances sont appelées «initiateurs de tumeurs», ou cancérigènes génotoxiques. Parmi ces substances, notons le bromure d'éthidium, le diéthylnitrosamine, les radiations ulta-violettes et l'urétane (Beck et al., 2001). Les mutations sont assez fréquentes dans l'organisme; Pitot et al. (1996) ont estimé que près de 1 cellule sur 1000 est altérée dans le foie de rat; Mirsalis et al (1994) ont obtenu des résultats semblables chez les hépatocytes de souris. Ces mutations peuvent être réparées par la cellule, mais peuvent également être fixées lors de la réplication de la cellule et être passées des cellules mères aux cellules filles (Pitot, 1993; Ou et al., 2001).

L'étape de la promotion est définie comme une expansion clonale sélective de cellules initiées vers le stade de foyers (ou foci) de cellules altérées. Les cellules initiées, sous l'influence d'un agent promoteur, se diviseront sans être influencées par les cellules saines environnantes. Les cancérigènes épigénétiques, comme le phénobarbital, le dichlorodiphényltrichloroéthane et les BPC, favorisent généralement cette expansion clonale en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, l'augmentation de la division cellulaire et dans leur contrôle. Trois principales caractéristiques définissent cette étape importante : 1) la promotion est réversible; si l'exposition au promoteur cesse, le nombre et la grosseur des foyers diminuent; 2) l'exposition au promoteur doit se faire de façon continue et/ou dans un laps de temps assez important; 3) il existe un seuil sous lequel aucun effet n'est détectable (Mills et al., 1995; Pitot et al., 1981).

Finalement, la progression est un processus de transformation pendant lequel les foyers de cellules initiées acquièrent de nouvelles caractéristiques permettant une croissance autonome et menant au stade de néoplasme. Ces cellules peuvent, par exemple, acquérir la capacité de se mouvoir, et ainsi de métastaser.

Certains produits chimiques, appelés génotoxiques, peuvent favoriser la cancérogenèse en induisant des mutations sur l'ADN. Ces mutations peuvent ensuite être

fixées et mener à la promotion et à la progression de la tumeur. Cependant, plusieurs produits ne causeront pas de mutations, mais vont plutôt modifier l'expression des gènes et favoriser la phase de la promotion. On appelle ces substances des promoteurs de tumeurs ou cancérigènes épigénétiques. L'hexachlorobenzène fait partie de cette catégorie.

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 3 : L'HEXACHLOROBENZÈNE

3. L'hexachlorobenzène

3.1. Définition et caractéristiques de l'hexachlorobenzène

L'hexachlorobenzène (HCB) est un polluant répandu dans l'environnement. Cet hydrocarbure aromatique polyhalogéné de formule chimique C_6Cl_6 est hautement lipophile et est retrouvé commercialement sous forme de poudre. Dans des conditions environnementales normales, son taux de dégradation est très bas; sa demi-vie a été estimée à 1,9 ans dans l'air et à 6,3 ans dans l'eau et les sédiments (Barber et al., 2005). Au Canada, l'HCB a été introduit commercialement dans les années 40, majoritairement comme fongicide. Entre 1948 et 1972, 17 fongicides différents contenaient jusqu'à 80% d'HCB (Tuttle, 1979). Les producteurs en aspergeaient les grains de blé, d'avoine, d'orge et de seigle pour les protéger de la moisissure lors de l'entreposage et du transport. Il était également utilisé pour la préservation du bois.

3.2. Utilisation, sources d'émission et distribution environnementale

Bien que son utilisation soit interdite de nos jours, l'HCB est encore largement répandu dans l'environnement. En effet, de par ses propriétés lipophiles et sa longue demi-vie, l'HCB est bioaccumulable. De plus, il est également toujours relâché dans l'environnement comme dérivé secondaire dans de nombreux processus industriels (Mumma et Lawless,1975; Barber et al., 2005). Par exemple, l'HCB est utilisé dans l'art pyrotechnique ainsi que dans la fabrication de fusées de détresse. Au niveau industriel, il sert d'agent de contrôle pour les anodes en graphite et dans la synthèse de caoutchouc pour pneus De plus, il est toujours produit lors de la synthèse d'autres pesticides, ou présent dans ceux-ci sous forme de contaminant, lors de la synthèse de solvants chlorés ou encore rejetés dans les déchets des industries. L'incinération de ces déchets peut être une autre source d'émission d'HCB par la combinaison post-combustion de différents produits. Tous ces processus maintiennent des taux importants d'HCB dans l'environnement.

3.3. Dose journalière d'exposition

L'HCB est retrouvé dans tous les niveaux de la chaîne alimentaires, autant que dans l'air, l'eau, le sol et les sédiments (Barber et al., 2005). La dose journalière d'exposition pour un Canadien moyen (70 kg) est estimée à 6,2 ng/kg de poids corporel (Newhook et Meek, 1994). L'HCB s'accumule principalement dans les graisses et peut même être transféré via le lait maternel (Herrero et al., 1999; Brady et Siyali, 1972; Ando et al., 1985; To-Figueras et al., 1997; Barber et al., 2005). Au Canada, bien que les populations nordiques aient les plus grandes concentrations, l'HCB a été détecté dans tous les individus testés de la région des Grands Lacs (Williams et al., 1988). Cette large distribution et les effets nocifs de son exposition ont poussé le Gouvernement Canadien à légiférer son utilisation.

3.4. Politiques gouvernementales concernant l'hexachlorobenzène au Canada

L'utilisation directe de l'HCB a été interdite dans les années 1970 suite à la reconnaissance de plusieurs pays industrialisés des risques qu'il présentait pour la santé humaine. Plusieurs pays et agences l'ont d'ailleurs classé comme possiblement cancérigène pour l'humain, compte tenu de son potentiel cancérigène démontré chez les animaux (Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC), 1987; Conseil canadien du Ministère des ressources et de l'environnement (CCREM), 1987). L'HC 3 a d'ailleurs été classé dans le groupe 1 de la Liste des substances prioritaires pour les évaluations de risques du Canada en 1993 (Gouvernement du Canada, 1993).

3.5. Évidences de la cancérogenèse due à l'hexachlorobenzène

Il a été démontré que l'HCB est un cancérigène épigénétique chez plusieurs espèces (Arnold et al., 1985; Cabral et al., 1979; Smith et al., 1987), c'est-à-dire qu'il ne favorisera pas le développement de tumeurs en causant des mutations sur l'ADN, mais va plutôt modifier l'expression de gènes, créant un microenvironnement favorisant le développement de tumeurs suite à une exposition à un initiateur (Siekel et al., 1991; Gorski et al., 1986). De plus, plusieurs études ont permis de démontrer qu'il existe un dimorphisme sexuel encore inexpliqué dans la réponse à l'HCB, les femelles étant plus susceptibles au développement de tumeurs que les mâles (Smith et Cabral, 1980; Lambrecht et al., 1983; Pereira et al., 1982; Krishnan et al., 1991; Larouche, 1993).

Chez l'humain, il existe peu d'évidence d'hépatocancérogenèse. Une étude chez un seul travailleur a soulevé la possibilité d'un lien entre un exposition à l'HCB et le développement d'une tumeur hépatique (Selden et al., 1989). Cepedans, d'autres causes à cette tumeur n'ont cependant pas été exclues puisque ce travailleur était exposé à un mélange de substances chlorées, contenant majoritairement de l'HCB, dans le cadre de son travail. Comme l'exposition à l'HCB est grande chez l'humain, il est primordial de connaître les mécanismes d'action de l'HCB. Il a été démontré que plusieurs cancérigènes épigénétiques favorisent le développement de tumeurs en modulant les interactions entre les cellules, ce qui favorise le développement clonal des cellules initiées (Trosko et Ruch, 1998).

3.6. Les effets de l'hexachlorobenzène sur les jonctions lacunaires

3.6.1 Le protocole ABC

Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont également démontré qu'une exposition à l'HCB favorise le développement de tumeurs induit par la diéthylnitrosamine (DEN) de façon plus importante chez les femelles rats que chez les mâles (Krishnan et al., 1991; Larouche, 1993). Cette étude a été réalisée à l'aide d'un protocole particulier appelé le protocole ABC (Figure 9). Le protocole ABC comporte trois étapes : les rats sont d'abord exposés à l'HCB, le promoteur de tumeurs, pendant 5 jours consécutifs par gavage (phase A), une période sans traitement de quatre-vingt-quinze jours (phase B) permet ensuite une diminution de l'HCB dans le foie des animaux jusqu'à devenir pratiquement indétectable au niveau hépatique, puis on initie la cancérogenèse au jour cent à l'aide du DEN (phase C). Suite à cette administration, le développement de tumeurs débute dans le foie des femelles (phase C) (Larouche, 1993). Ce protocole diffère des protocoles d'initiation-promotion habituels utilisant d'abord un initiateur de tumeurs afin de favoriser des mutations dans les cellules, puis l'administration subséquente d'un agent promoteur de tumeur afin de favoriser le développement des cellules initiées en foyers. En inversant l'initiateur et le promoteur, ce protocole nous permet de comprendre les effets de l'HCB seulement et de mieux déterminer les mécanismes épigénétiques utilisés par l'HCB pour favoriser le développement de tumeurs. En effet, en étudiant la période comprise entre les jours cinq et cent, soit sans

qu'il n'y ait d'initiation, on isole l'effet de l'HCB et on peut ainsi mieux comprendre ces effets en tant qu'agent favorisant l'hépatocancérogenèse.

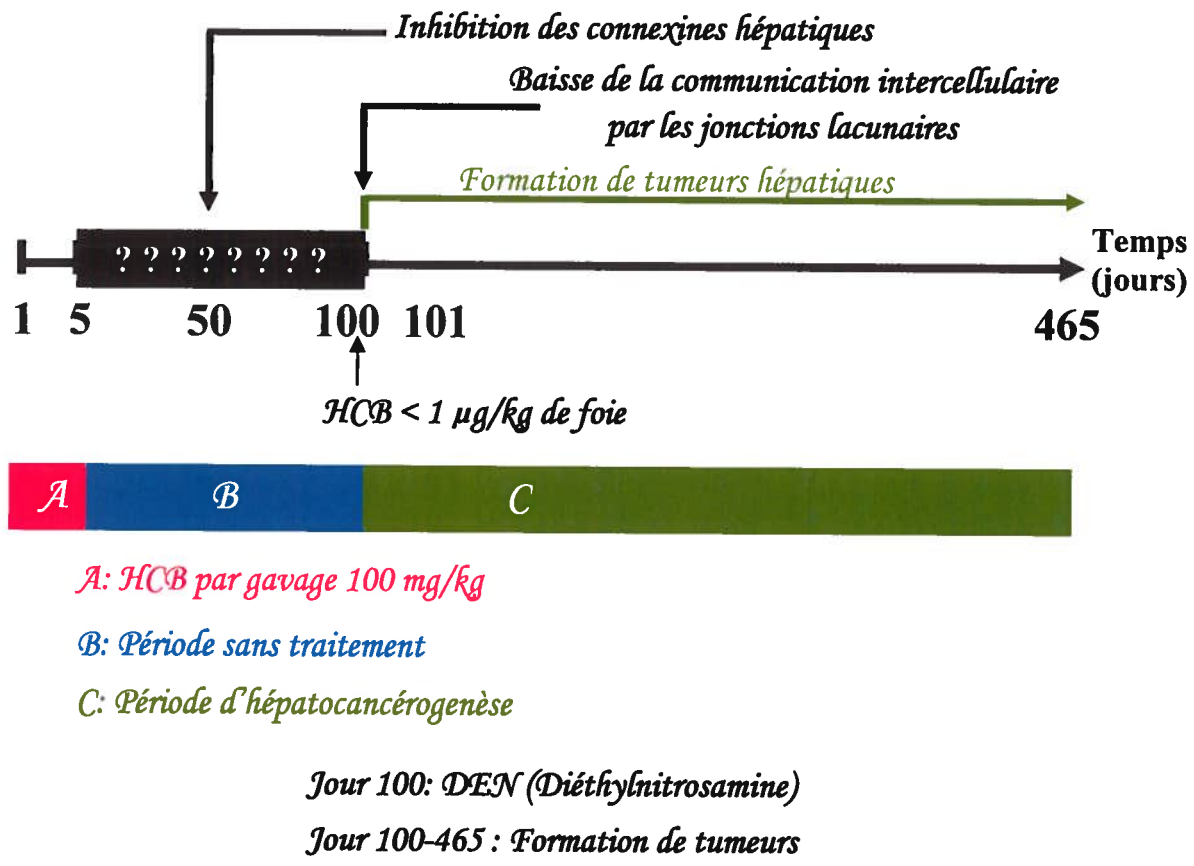


Figure 9: Protocole ABC utilisé pour l'étude des effets de l'hexachlorobenzène sur les jonctions lacunaires et sur l'hépatocancérogenèse
Les rats sont d'abord exposés à l'hexachlorobenzène (HCB) durant cinq jours consécutifs (A). Une période sans traitement (B) permet ensuite l'élimination de l'HCB dans le foie. La période d'hépatocancérogenèse débute (C) suite à l'injection d'un initiateur de tumeur, le diéthylnitrosamine (DEN), au jour 100. Des études antérieures (Plante et al., 2002) ont démontré une baisse de la communication par les jonctions lacunaires au jour 100, précédée d'un inhibition de l'expression des connexines hépatiques au jour 50.

3.6.2. Inhibition des jonctions lacunaires par l'hexachlorobenzène

Les études présentées dans le cadre de cette thèse de doctorat font suite à une série d'expériences effectuées dans le cadre de ma maîtrise et publiées dans le journal Carcinogenesis en 2002 (Plante et al., 2002). Les principaux résultats seront présentés ici afin de mieux expliquer les bases de la thèse de doctorat.

Tout d'abord, des rats mâles et femelles ont été exposés à l'HCB pendant cinq jours consécutifs, conformément au protocole ABC, et sacrifiés au jour 100 afin de juger les effets de l'HCB sur la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires au moment de l'injection du DEN (Figure 9). Des analyses de transfert de colorants ont permis de démontrer une baisse significative de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires chez les femelles traitées par rapport aux femelles témoins. Afin de déterminer si la baisse de la communication était due à un changement préalable de la régulation des connexines, des rats ont par la suite été traités selon le protocole ABC, mais les analyses ont cette fois été faites au jour 50, soit au milieu de la phase B. Des analyses de type Northern blot ont démontré une baisse significative des niveaux des connexines 32 et 26 de 30% et 40% respectivement. De plus, des analyses d'immunobuvardage de type Western on démontré que cette baisse était encore plus importante au niveau des protéines, puisque la baisse était alors de 63% pour la connexine 26 et de 90% pour la connexine 32 (Plante et al., 2002).

Lors de cette étude, il a également été démontré que les connexines hépatiques sont régulées différemment chez les femelles par rapport aux mâles. En effet, il a été démontré que les mâles ont des taux basaux de connexines 32 huit fois plus élevés que les femelles, mais des taux de connexine 26 trois fois plus bas. Ces différences peuvent être abolies en majeure partie lorsque des femelles sont ovariectomisées, puisque les niveaux de transcrits baissent alors de 66% pour la connexine 26, alors que ceux de la connexine 32 deviennent environ six fois plus abondants. Ces résultats suggèrent que les facteurs ovariens sont d'importants régulateurs des connexines hépatiques et que l'HCB pourrait agir via une voie de signalisation régulée par les ovaires. Cependant, des analyses subséquentes ont démontré que l'HCB diminue de façon significative les niveaux de connexines hépatiques des femelles ovariectomisées, réfutant ainsi la possibilité d'un effet de l'HCB sur des facteurs ovariens.

Ces résultats démontraient que les connexines hépatiques, plus particulièrement la connexine 32, étaient très importantes dans le mécanisme de l'hépatocancérogenèse induite par l'HCB dans le foie des rats. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans la régulation transcriptionnelle des connexines demeuraient inconnues. Une meilleure compréhension la régulation de la connexine 32 devenait alors une priorité afin de mieux comprendre comment l'HCB pouvait rendre les rats femelles plus susceptibles au développement de tumeurs hépatiques.

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Plusieurs constatations peuvent être faites suite à la lecture de la revue de la littérature qui précède. Tout d'abord, l'hexachlorobenzène, un polluant environnemental largement répandu dans l'environnement, est un cancérigène épigénétique, favorisant le développement de tumeurs hépatiques de façon plus importante chez les rats femelles que chez les rats mâles. Il a été démontré que chez des rats exposés à l'hexachlorobenzène selon le protocole ABC, la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires est inhibée au jour 100 et que cette diminution provient d'une baisse des connexines 26 et 32 observée au jour 50. Il existe également un dimorphisme sexuel dans la régulation des connexines hépatiques, les mâles et les femelles ayant des niveaux basaux différents de connexines. Cependant, les mécanismes contrôlant l'expression des connexines hépatiques sont peu connus.

Les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes sont étroitement reliées. De plus, dans les tumeurs, les protéines formant ces deux types de jonctions sont souvent inhibées. Ceci suggère l'activation de voies de signalisation communes au deux types de protéines jonctionnelles, soit les connexines et les cadhérines.

La voie de l'ILK est activée lors de la cancérogenèse dans différents tissus. L'expression de cette voie amène des changements dans les interactions cellule-cellule, dont une baisse de l'expression de la E-cadhérine.

Basé sur ces constatations, l'objectif principal de la thèse de doctorat était donc de caractériser la régulation hépatique de la connexine 32 chez les rats, et plus particulièrement chez les femelles. Cet objectif principal se subdivisait en trois sous-objectifs : (1) déterminer si la voie de l'ILK est activée *in vivo* chez les rats femelles exposées à l'HCB ; (2) confirmer l'implication de l'activation de la voie de l'ILK dans l'inhibition de la connexine 32 observée *in vivo*, à l'aide d'un modèle *in vitro* ; et (3) caractériser la régulation transcriptionnelle de la connexine 32 en étudiant les liaisons des facteurs de transcription sur son promoteur lors de l'exposition à l'HCB et dans le cadre du dimorphisme sexuel. Les expériences réalisées afin de répondre à ces sous-objectifs constituent chacun un chapitre dans la deuxième partie de cette thèse et ont été soumis à des revues de littérature sous forme de trois manuscrits différents.

SECONDE PARTIE :

ARTICLES

SECONDE PARTIE, SECTION 1:

INVOLVEMENT OF THE INTEGRIN-LINKED KINASE PATHWAY IN HEXACHLOROBENZENE-INDUCED GENDER-SPECIFIC RAT HEPATOCARCINOGENESIS

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Isabelle Plante, Daniel G.Cyr et Michel Charbonneau

Toxicological Sciences, 88(2), 346-357,2005, doi: 10.1093/toxsci/kfi323

1.1. Résumé français de l'article

L'activation de la voie de la kinase liée aux intégrines (ILK) module les interactions cellule-cellule, un mécanisme épigénétique menant à la transformation des cellules épithéliales. Chez des rats femelles exposés à l'hexachlorobenzène (HCB) pendant cinq jours consécutifs et sacrifiés 45 jours plus tard, la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires est inhibée au niveau hépatique. L'hypothèse de recherche de cette étude est que l'HCB inhibe également l'expression de la E-cadhérine et que cette baisse est causée par l'activation de la voie de signalisation de l'ILK. Les niveaux hépatiques d'ILK étaient élevés chez les femelles traitées à l'HCB. Par contre, les niveaux cytoplasmiques/membranaires de la protéine Akt, une cible de l'ILK, et sa forme active phosphorylée étaient diminués chez les femelles traitées. Des analyses de cytométrie en flux ont démontré une augmentation concomitante des niveaux nucléaires de la protéine Akt; ceci suggère que l'activation de la protéine Akt par l'ILK résulte en la translocation nucléaire de la protéine Akt. L'ILK et la protéine Akt peuvent toutes deux phosphoryler la glycogène synthétase kinase-3(3 (GSK3[3), ce qui l'inactive. Les niveaux hépatiques de phospho-GSK3(3 étaient plus élevés chez les femelles traitées à l'HCB, résultant en une baisse de son activité. Une inactivation de la GSK3[3 amène la translocation nucléaire de la (3-caténine. Des analyses d'immunohistochimie et de cytométrie en flux ont démontré une translocation nucléaire de la [3-caténine chez les femelles traitées à l'HCB. Les niveaux protéiques de la E-cadhérine étaient diminués chez les femelles traitées. Finalement, l'exposition d'une lignée des hépatocytes de rat en culture (MH_1C_1) à des inhibiteurs spécifiques de la GSK3(3 a confirmé que l'activation de la voie de l'ILK est

directement reliée à l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine via l'inactivation de la GSK3p. Cependant, l'expression de la connexine 32 n'est pas modulée par la GSK3p. Finalement, cette étude a permis de démontrer que la voie de signalisation de l'ILK est activée par l'HCB dans le foie des rats femelles, résultant en une inhibition de l'expression de la E-cadhérine. La baisse concomitante de la communication intercellulaire n'est pas reliée ni à la baisse de la E-cadhérine, ni à l'inactivation de la GSK3p.

1.2. **Contribution de l'étudiante**

Toutes les expériences présentées dans cet article ont été réalisées par l'étudiante. Le premier manuscrit de l'article a également été écrit par l'étudiante. Finalement, l'étudiante a participé à la version finale de l'article en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal de publication.

SECONDE PARTIE, SECTION 2:

ACTIVATION OF THE INTEGRIN-LINKED KINASE PATHWAY DOWN-REGULATES HEPATIC CONNEXIN32 VIA NUCLEAR AKT

Isabelle Plante, Michel Charbonneau et Daniel G.Cyr

Accepté pour publication, Carcinogenesis, 2006

2.1. Résumé français de l'article

Les jonctions lacunaires permettent la communication intercellulaire grâce à des canaux composés d'une famille de protéines, appelées connexines. Nous avons démontré précédemment que la connexine 32 est inhibée dans le foie des rats femelles exposés à l'hexachlorobenzène (HCB), un cancérigène épigénétique. Cette baisse est concomitante à une activation de la voie de l'Intégrine-Linked kinase (ILK), menant à l'activation et la translocation nucléaire de la protéine Akt et en l'inactivation de la glycogène synthétase kinase-3β (GSK3β). La E-cadhérine, une protéine des jonctions adhérentes, est également inhibée dans le foie de ces rats femelles, par l'inactivation de la GSK3β. L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle de la voie de l'ILK dans la régulation de la connexine 32, en utilisant un modèle *in vitro*. Afin de mimer l'activation de la voie de l'ILK, des cellules provenant d'une lignée cellulaire d'hépatocytes de rat, les MH_1C_1, ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur d'expression exprimant le gène de l'ILK (cellules ILK+). Les cellules ILK+ avaient des niveaux d'ARNm de connexine 32 significativement plus bas que les cellules transfectées avec le vecteur témoin. Dans les cellules ILK+, la protéine Akt était également activé et transloqué dans le noyau. L'utilisation subséquente d'un vecteur d'expression exprimant le gène de la protéine Akt constitutivement actif a permis de démontrer une baisse de l'expression de la connexine 32, ce qui confirmait le rôle de la protéine Akt dans la régulation de la connexine 32. Finalement, des cellules transfectées avec un vecteur d'expression exprimant le gène de la protéine Akt actif uniquement dans le noyau, ont démontré une diminution des niveaux protéiques de la connexine 32 comparativement aux cellules transfectées avec un vecteur exprimant Akt de type sauvage, ce qui suggère que la forme nucléaire active de la protéine Akt est responsable de la baisse de connexine 32 observée. Ces résultats

démontrent que la connexine 32 est inhibée lors de l'activation de la voie de l'ILK dans les hépatocytes de rats et que cette baisse est due à l'activation et à la translocation nucléaire de la protéine Akt.

2.2. Contribution de l'étudiante

Toutes les expériences présentées dans cet article ont été réalisées par l'étudiante. Le premier manuscrit de l'article a également été écrit par l'étudiante. Finalement, l'étudiante a participé à la version finale de l'article en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal de publication.

Activation of the Integrin-Linked kinase pathway down-regulates hepatic Connexin32 via nuclear Akt

Isabelle Plante, Michel Charbonneau[a] and Daniel G.Cyr[a]

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boulevard, Pointe-Claire, QC, Canada, H9R 1G6

[a] Corresponding authors

Running title: Akt down-regulates Cx32

Keywords: Connexins, Integrin-Linked Kinase, Akt, Akt-NES, hepatocytes, MH_1C_1

Address for correspondence:

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand Frappier
Université du Québec
245 Hymus boulevard
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8833
Fax (514) 630-8850
e-mail: daniel.cyr@iaf.inrs.ca

Dr. Michel Charbonneau
INRS-Institut Armand Frappier
Université du Québec
245 Hymus boulevard
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8831
Fax (514) 630-8850
e-mail: michel.charbonneau@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Gap junctions mediate intercellular communication through channels composed of proteins, termed connexins (Cxs). We have shown that Cx32 is down-regulated in the liver of female rats exposed to hexachlorobenzene (HCB), an epigenetic environmental carcinogen. This is concomitant with the activation of the Integrin-linked kinase (ILK) pathway, leading to the activation and nuclear translocation of Akt and the inactivation of GSK3β. E-cadherin, an adherens junction protein, is also down-regulated in the liver of these female rats, due to the inactivation of GSK3β. Using an *in vitro* model, the aim of this study was to determine the role of the ILK pathway in the regulation of Cx32. In order to mimic the activation of the ILK pathway, a well-differentiated rat hepatoma cell line, MH_1C_1, was transiently transfected with an expression vector for ILK (ILK+ cells). ILK+ cells displayed significantly lower Cx32 mRNA levels and Akt was also activated and translocated into the nucleus. Using a constitutively-active Akt expression vector, we showed that Akt transfected cells had lower Cx32 mRNA levels, indicating a role for Akt in Cx32 regulation. Finally, using an Akt-NES vector, a nuclear-active form of Akt, we showed that Cx32 protein levels were decreased in transfected cells as compared with cells transfected with the wild-type inactive Akt vector suggesting that the nuclear form of Akt is responsible for the down-regulation of Cx32. Overall, these data indicate that Cx32 is down-regulated by the ILK pathway activation in rat hepatocytes and that this is mediated via the activation and nuclear translocation of Akt.

INTRODUCTION

It has been reported that in several types of cancers, a decrease in gap junctional intercellular communication (GJIC) is associated with the development of tumors. Gap junctions are intercellular channels formed by proteins termed connexins (Cxs). Gap junctions allow direct communication between cells by allowing the exchange of small molecules (≤ 1 kD) between neighbouring cells (1). It has been shown that epigenetic carcinogens can promote tumor formation by down-regulating Cxs and consequently GJIC (2). However, the intracellular signaling pathways implicated in the regulation of Cxs are poorly understood.

Adherens junctions are implicated in cell-cell interactions and in intracellular signaling. They are formed primarily by a large family of single-pass calcium-dependent transmembrane proteins termed cadherins (3). It has been suggested that there exists a functional relationship between adherens and gap junctions, and furthermore, that in certain tissues, adherens junctions are necessary to allow binding of adjacent cellular plasma membranes. This subsequently allows the connexons from each cell to bind and form the intercellular pores of the gap junction. In certain cancers, both adherens and gap junctions are down-regulated, suggesting the existence of common pathways controlling the expression of these two types of intercellular junctions (4,5).

The activation of the Integrin-Linked kinase (ILK) pathway has been shown to down-regulate the expression of E-cadherin in intestinal and mammary epithelial cells as well as in human colon carcinoma cell lines (6). The ILK pathway is a phosphorylation signaling cascade leading to the regulation of genes involved in the control of cellular proliferation, differentiation and cell-cell interactions (7). The ILK phosphorylation cascade can

modulate changes in gene expression via the activation of nuclear transcription factors (6,7).

We have demonstrated that exposure to hexachlorobenzene (HCB), an epigenetic environmental carcinogen, resulted in significantly lower levels of both Cx32 and Cx26 as well as GJIC in the livers of female rats sampled 45 days after the administration of HCB (8). However, Cxs and GJIC in males were unaltered. These changes coincided with a down-regulation of E-cadherin induced by the activation of the ILK signaling pathway (5). Using both *in vivo* and *in vitro* approaches we were able to demonstrate that the ILK pathway was activated in the liver of HCB-treated rat females and that this activation decreased the expression of E-cadherin via inactivation of GSK3β, a down-stream target of ILK. However, Cx32 levels were not affected by the inactivation of GSK3β *in vitro*, although Cx32 mRNA levels were decreased by 50% in HCB-treated cells as compared to the untreated control cells. These results suggested that the regulation Cx32 by HCB occurs either downstream of ILK via a second pathway or through another unidentified signaling pathway parallel to ILK (5). In HCB-treated female rats, hepatic nuclear Akt protein levels were increased. It has been shown that once activated by phosphorylation, including ILK-induced phosphorylation, Akt phosphorylates different proteins in the cytoplasm and can then translocate into the nucleus where it phosphorylates transcription factors and modulates gene expression (9,10).

Since HCB exposure down-regulates hepatic Cx expression in rat both *in vivo* and *in vitro*, and since E-cadherin is decreased by HCB-induced ILK pathway activation, it is possible that Cx levels are also modulated by the same pathways, but using an intermediate other than GSK3β. Consequently, the objective of this study was to assess

whether or not the activation of the ILK pathway is implicated in hepatic Cx32 regulation.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture conditions

Rat liver cells line (MH_1C_1) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS at 37°C with 5% CO_2 .

Transfection and vectors

An ILK expression vector pcDNA3.1/V5-his A was generously provided by Dr. S. Dedhar (University of British Columbia). A constitutively active myr-Akt1 expression vector pUSEamp(+) was purchased from UpState Biosciences (Upstate Biosciences, Chicago, IL). The Akt-NES-GFP and Akt-WT-GFP expression vectors pEGFP-C1 were generous gifts from Dr. M.D. Ringel (Ohio State University). Cells (95% confluent) were transiently transfected using 40 μg/ml lipofectamine 2000 (InVitrogen Life Technologies) in DMEM without FBS, according manufacturer's instructions. Cells were lysed 24h later and total protein or total RNA was isolated from the lysate. PCL-neo (Promega, Madison, WI) was used as a control vector, and is represented as control group on the graphs. Table 1 summarizes the different vectors used in this study.

Western blot analysis

Cytoplasm and nuclear/membrane proteins were extracted from MH_1C_1 cells using the NE-PER Cytoplamic and Nuclear Protein extraction kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The purity of the nuclear enrichment fraction was determined using albumin as a marker for the cytoplasmic fraction and the transcription factor Sp1 as a marker for the nuclear fraction (Fig. 1). Overexposed films show less than 6% cross contamination between cytoplasmic and nuclear extracts (data not shown). Protein levels were determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). A 50 μg aliquot of total proteins was subjected to SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on either a 10 or 12% gel and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes containing the transferred proteins were blocked with PBS containing 5% powdered milk and 0.05% Tween and then hybridized overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (rabbit anti-ILK, 1.0-2.0 mg/ml, Upstate, Chicago, IL; goat anti-Akt, 0.4 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; rabbit anti-phospho-Ser^{473}–Akt, 2.5 mg/ml, Biosource International, Camarillo, CA; rabbit anti-Sp1, 0.4 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; rabbit anti-Albumin, 2.8 mg/ml, DakoCytomation, Denmark). Following the hybridization, the membranes were washed in PBS containing 0.05 % Tween and incubated for 1hr at room temperature with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, 0.08-0.2 μg/ml, Santa Cruz Biotechnology; anti-goat, 0.3 μg/ml, Santa Cruz Biotechnology; anti-mouse-IgG, 4.5 μg/ml; Sigma-Aldrich, Toronto, ON, Canada). Signal detection was done by chemiluminescence using a commercial kit (Lumilight, Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada).

Cytoplasmic protein loading was standardized by measuring actin levels, using a murine monoclonal anti-actin antibody (1.0 μg/ml; Sigma-Aldrich). The membranes containing the proteins were washed and subsequently incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (3.6 μg/ml; anti-mouse-IgG conjugated to peroxidase; Sigma-Aldrich). Signal detection was done by chemiluminescence using the Lumilight kit (Roche Diagnostic). Nuclear protein loading was verified using Ponceau red (5% Ponceau red in 5% acetic acid) staining and quantified using Fluor-S™ MultiImager Bio-Scan transilluminator (Bio-Rad laboratories).

Immunoprecipitation

Aliquots (50 μl) of protein G-Agarose (Roche Diagnostic) were incubated overnight at 4°C with 8 μg of murine anti-Cx32 antibody (Sigma-Aldrich). Total proteins (100 μg) for each sample were add and incubated for an additional hour at 4°C. Agarose beads were collected by centrifugation and washed in PBS. The agarose beads were then incubated in Laemmli sample buffer and boiled for 10 min. The resulting proteins were then subjected to SDS-PAGE on a 12% gel and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes containing the transferred proteins were blocked with PBS containing 5% powdered milk and 0.05% Tween and then hybridized overnight at 4°C with anti-mouse Cx32 (Sigma-Aldrich). Following the hybridization, the membranes were washed in PBS containing 0.05 % Tween and incubated for 1 h at room temperature with peroxidase conjugated anti-mouse-IgG (4.5 μg/ml; Sigma-Aldrich). Signal detection was done by chemiluminescence using a commercial kit (Lumilight, Roche Diagnostic).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total cellular RNA was isolated from MH_1C_1 cells using the phenol-chloroform extraction method of Sambrook and Russell (11). The RNA was reverse transcribed using an oligo d(T)16-18 primer (Amersham Pharmacia Biotech) and MMLV reverse transcriptase (Canadian Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The cDNA templates (500 ng) were amplified for Cx32 (reverse primer: CAG GCT GAG CAT CGG TCG CTC TT; forward primer: CTG CTC TAC CCG GGC TAT GC) using 30 cycles of a two-step PCR; denaturation at 94°C for 30 s, annealing and elongation at 69°C for 60 s. ILK was amplified with specific primers (reverse primer: TTG AGC TTT GCC AGG AAG TT; forward primer:ATG TGA TGA ATC GTG GGG AT). RT-PCR products were separated on either a 1 or 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Cx32 mRNA levels were standardized using GAPDH expression as a standard (reverse primer: GCC GGG ACA GGC GGC AGG TTA G; forward primer: GGG TGA GGT GAG CAT GGA GGA CG).

Immunofluorescence Microscopy

MH_1C_1 cells transfected with the Akt-NES-GFP and Akt-WT-GFP expression vector, were fixed 10 min with cold methanol at -20°C and permeabilized with PBS-Triton (0.3%) for 15 min at room temperature. Nuclei were stained using 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and examined under a fluorescent microscope. The localization of Akt was visualized using the ImagePro Plus computer software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Flow Cytometric analyses

MH_1C_1 cells were transfected with the Akt-NES-GFP and Akt-WT-GFP expression vectors. One day (24h) later the cells were fixed for 10 min in cold methanol at -20°C and then permeabilized with PBS-Triton (0.3%) for 15 min at room temperature. Cells were blocked using PBS-BSA (5%) for 30 min at 37°C and then incubated for 90 min at 37°C with a mouse anti-Cx32 antibody (Sigma-Aldrich) diluted in PBS-BSA (5%). The cells were then washed with PBS, and incubated 45 min at room temperature with goat anti-mouse-phycoerythrin labeled antibody (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA). Cx32 expression was quantified using flow cytometry (50 000 events). Only positive events in GFP stained cells were used to analyze Cx32 protein levels using a FACSCalibur system.

Statistics

Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed *a posteriori* by a Turkey test for multiple comparisons between experimental groups. Each experiment was done in triplicate using 3 to 4 independent samples per group (n=12). Significance was established at $p<0.05$. All statistical analyses were done using the SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

RESULTS

In order to determine if HCB-induced down-regulation of Cx32 observed *in vivo* results from the activation of the ILK pathway, MH_1C_1, a well-differentiated rat hepatoma cell line, were transiently transfected with an ILK expression vector in order to overexpress

ILK. Using RT-PCR, we confirmed that the expression of ILK was increased in cells transfected with the ILK expression vector. In these cells (MH_1C_1-ILK+), ILK mRNA levels were two-fold higher than in cells transfected with the negative control vector (Fig 2A), while ILK protein levels were increased 3-fold, as determined by western blot analyse (Fig 2B).

Our previous studies have shown that HCB can stimulate ILK in rat liver and that this is associated with decreased Cx32 levels. In the present study, we observed a 2-fold decrease in Cx32 mRNA levels in MH_1C_1-ILK+ cells relative to controls (Fig 3). This indicates that the activation of the ILK pathway results in a down regulation of Cx32 in rat hepatocytes.

Our previous results showed that Akt, a down-stream target of ILK, was increased in hepatic nuclei of HCB-treated females, suggesting its activation by ILK. Akt can be activated by phosphorylation at the plasma membrane by a variety of kinases, including ILK. Western blot analysis indicated that whereas there was no change in cytoplasmic Akt protein levels in MH_1C_1-ILK+ (Fig 4A), there was a nearly four-fold increase in nuclear/membrane Akt protein levels as compared to untransfected cells (Fig 4B). Using a phospho-specific anti-Akt antibody, we then showed that there was also a nearly 2-fold increase in phospho-Akt cytoplasmic protein levels in MH_1C_1-ILK+ cells as compared to the control (Fig 4C). Furthermore, there was a four-fold increase of phospho-Akt nuclear/membrane protein levels in MH_1C_1-ILK+ cells as compared to the control (Fig 4D). These results indicate that the overexpression of ILK and subsequent activation of the ILK pathway in rat hepatocytes can activate the Akt intracellular pathway via an increase in Akt phosphorylation. As such, this provides a functional experimental tool to assess the role of ILK and Akt on gap junctional proteins. The ILK pathway can activate

either Akt, as described above, or can inactivate GSK3β and promote the nuclear translocation of cytoplasmic β-catenin. Our previous work has also demonstrated that chemical inhibitors of GSK3β failed to alter Cx32 levels in MH_1C_1 cells, suggesting that ILK is acting via another cellular target, such as Akt.

In order to determine if hepatic Cx32 down-regulation occurred via the activation of Akt by ILK, we mimicked ILK-induced Akt activation by transfecting MH_1C_1 cells with an expression vector containing an active mutated form of Akt (MH_1C_1-Akt+). This vector expresses a constituvely active form of Akt due to the presence of 11 N-terminal amino acid residues of avian c-*src* that are required for protein myristoylation at the amino terminus of Akt. This signal sequence allows Akt to be translocated to the plasma membrane where it can be activated by phosphorylation. We first determined the efficiency of the transfection using western blot analysis. In all samples, a band at 60 kDa, corresponding to endogenous Akt, was observed (Fig. 5). A second heavier band was detected (around 64 kDa) in the fractions of MH_1C_1–Akt+ cells, corresponding to the exogenous mutated form of Akt produced by the vector. A marked increase in exogenous Akt was present in the cytoplasmic and membrane fraction of MH_1C_1 cells transfected with the Akt vector (MH_1C_1-Akt+) (Fig 5). In these cells, however, there was also an increase in Akt protein levels in the nuclear/membrane fraction of MH_1C_1-Akt+, suggesting the activation and increased expression of Akt (Fig 5). There was also a substantial increase in active phospho-Akt in both the cytoplasmic and nuclear/membrane fractions of MH_1C_1-Akt+ cells as compared to MH_1C_1 cells, confirming the transfection of the phosphorylated active form of Akt (Fig 5). To determine the role of Akt in Cx32 regulation, we then measured Cx32 mRNA levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-Akt+ cells.

Using semi-quantitative RT-PCR, we observed a 40% decrease in Cx32 mRNA levels (Fig 6). Cx32 protein levels were determined by Western blot analyses following Cx32 immunoprecipitation. Results indicate a 40% decreased in Cx32 protein levels in MH_1C_1-Akt+ cells as compared to MH_1C_1 cells. These results suggest that the activation of Akt results in the down-regulation of Cx32 expression at both the mRNA and protein level.

Akt can act either at the membrane and cytoplasmic levels, where it can phosphorylate effector proteins, or at the nuclear level, where it can act as a transcription factor or phosphorylate other transcription factor(s) (10). In order to determine if the decrease in Cx32 induced by Akt was due to nuclear translocation of Akt, we tested two other vectors coupled to a green-fluorescent protein (GFP) containing either a wild-type inactive Akt (Akt-WT+) or a mutated nuclear-only active form of Akt (Akt-NES+), in which the nuclear-export sequence was modified in order to retain Akt in the nucleus. Using immunofluorescence microscopy, we first demonstrated that in MH_1C_1-Akt-NES+ cells, Akt was present in the nuclei of transfected cells, while in MH_1C_1-Akt-WT+, the GFP was distributed throughout the cytoplasm (Fig 7A). As a result of the low transfection rate observed with the Akt-NES+ vector (approximately 5% of cells), we used flow cytometric approach to analyse the expression of Cx32 only in those cells that expressed the nuclear Akt (Figs 7Bi and 7Bii). While there were no differences in Cx32 levels between untransfected control cells and cells transfected with the WT inactive vector (MH_1C_1-Akt-WT+ cells) (Fig 7Biii), there was a significant 25% decrease in Cx32 protein levels in cells transfected with the nuclear-only active vector (MH_1C_1-Akt-NES+) as compared to either MH_1C_1-Akt-WT+, or untransfected cells (Fig 7Biii). These results suggest that nuclear Akt can regulate, at least in part, hepatic Cx32.

DISCUSSION

We have previously shown that HCB-treatment in female rats decreases hepatic Cx32 and Cx26 levels (8). Furthermore, we have also shown both *in vivo* and *in vitro*, that the hepatic ILK pathway is activated by HCB-treatment in female rats, and that this activation results in a decrease in the expression of E-cadherin (5). This decrease appears to result from the inactivation of GSK3β, a down-stream target of ILK. However, Cx32 levels were not affected by the inactivation of GSK3β *in vitro*, suggesting that HCB-induced Cx32 down-regulation occurs either downstream of ILK via the activation of a second sub-pathway, or by another unidentified parallel signaling pathway (5). Consequently, the objective of this study was to assess whether or not the activation of the ILK pathway is implicated in hepatic Cx32 regulation, and if so, to identify the sub-pathways implicated in this regulation. In the present study, we have demonstrated that the overexpression of ILK in MH_1C_1 results in the activation and nuclear translocation of Akt, and that this activation is associated with a decrease in Cx32 mRNA levels. Combined with our previous results, the present data suggested that the activation of the ILK pathway by HCB results in the down-regulation of both E-cadherin and Cx32, although this appears to be regulated via two different down-stream targets, GSK3β and Akt respectively.

ILK is an evolutionarily conserved protein kinase, implicated in both integrin and growth-factor signaling. ILK basal activity is usually low, but can be stimulated by cell-cell interactions as well as by certain growth factors, including the epidermal growth factor receptor (EGFR) (12,13). Interestingly, it has been shown that HCB can stimulate EGFR (14,15). Stimulation of EGFR can activate the ILK pathway and consequently the

PI3K pathway which is associated with the recruitment of Akt to the plasma membrane (16). Whether or not EGFR or PI3K are implicated in ILK and Akt activation leading to the modulation of cell-cell interaction by HCB in female rats remains to be elucidated.

The role of the ILK pathway in the regulation of Cxs is not well defined. In another study it has been suggested that the loss of beta1 integrin function and inhibition of integrin clustering up-regulates the expression of Cxs in embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes, by beta-catenin/Wnt-dependent pathways (17). Down-regulation of both adherens and gap junctions have been reported in certain malignant tumors, suggesting the existence of common pathways regulating the expression of proteins comprising these intercellular junctions (4,18). This study and our preivous one are the first to demonstrate a pathway by which both gap and adherens junction proteins are down-regulated. Moreover, since both ILK pathway activation and decreased cell-cell interactions are hallmarks of cancer, our results suggest that this mechanism may represent a general mechanism implicated in carcinogenesis.

Little is known about pathways implicated in the regulation of Cxs. Several studies have shown that certain Cxs can be post-trancriptionally regulated by phosphorylation at different steps in the assembly of gap junctions, such as intracellular trafficking, assembly, gating and degradation (19). Various kinases have been implicated in Cx phosphorylation, including the mitogen-activated protein kinase (MAPK) (20). Cx43 has been reported to be regulated by a p38-MAPK in Sertoli cells (21), as well as liver Cx32 following partial hepatectomy in rat (22). Glucocorticoids have also been shown to be important regulators of hepatic GJIC and Cx32 expression (23).

However, while phosphorylation events are important for the post-translational regulation of Cx32, few studies have focused on the involvement of signaling pathways in

the transcriptional regulation of Cx32. In our previous studies, HCB exposure resulted in Cx32 down-regulation and increased Akt translocation into the nucleus, suggesting that nuclear Akt might be important in Cx32 regulation, as well as in carcinogenesis (8) (5). In the present study, ILK overexpression induced the nuclear translocation of Akt and a decrease in Cx32 mRNA levels. In order to determine whether or not Akt was responsible for the lower Cx32 levels, we transfected cells with an Akt expression vector. The resulting decrease in Cx32 mRNA levels indicated that the Akt pathway was at least partly responsible for the lower Cx32 levels. To determine if nuclear Akt was responsible for the lower Cx32 levels, cells were transfected with an expression vector (Akt-NES) that produced a modified active Akt which is specifically targeted to the nucleus. Flow cytometric analysis indicated a decrease in Cx32 expression in MH_1C_1 cells transfected with the nuclear active only Akt-NES, as compared to either inactive Akt-WT transfected or untransfected cells. Whether or not these effects are the result of Akt acting as a transcription factor or via the activation or inactivation of other transcription factors in the nucleus remains to be established.

Interestingly, it has been shown that Akt can phosphorylate Foxa-2 (hepatocyte nuclear factor-3β), a transcription factor from the forkhead family (24). This factor is a member of the same family as HNF-1, which has been associated with Cx32 regulation (25,26). It has also been suggested that Sp1 may play a role in Cx32 regulation, since the Cx32 promoter contains several Sp1 sites and DNA-protein complexes have been identified in shift assays (25,27,28). Sp1 is a member of the Sp family of transcription factor frequently found in promoters lacking a TATA box and in the promoter regions of housekeeping genes (29). Sp1 transcription factors have been associated with the stimulation of the rat Cx32 promoter by acting at several sites along the 5' flanking

region of the gene (27). A recent study has reported that Akt is required for the induction of VEGF, a critical event in carcinogenesis, and that this activation involves the phosphorylation and binding of Sp1 to the VEGF promoter region (30). Whether or not Akt can modulate Cx32 transcriptional regulation by acting on HNF-1 or Sp1 remains to be elucidated.

Recent studies have suggested that the nuclear localization of Akt may be important in the process of carcinogenesis. Indeed, it has been shown that Akt is localized into the nucleus of human thyroid tumors, and allows cell migration in a Boyden chamber *in vitro* (9,31). Furthermore, levels of nuclear Akt increase with stages of tumor progression in prostate cancer (32). Our study suggests a pro carcinogenic role of Akt in modulating a decreased Cx32 expression, an important hallmark of hepatocarcinogenesis. In summary, we have demonstrated that the overexpression of ILK in rat hepatocytes leads to the activation of Akt and its nuclear translocation. Active Akt is implicated in Cx32 down-regulation via its nuclear effects, although we cannot discount the possibility that cytoplasmic Akt also contributes to lowering levels of Cx32. Together with our previous studies, these data suggest that the activation of the ILK pathway decreases cell-cell interactions by decreasing both gap and adherens junctions, via activation of two parallel branches of the same pathway. Since the down-regulation of junctional proteins as well as the overexpression of ILK are hallmarks of carcinogenesis, this suggests that this mechanism can be a widespread event not only in HCB-induced or chemically-induced tumors, but may also be implicated in different types of cancers.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Guylaine Lassonde, Julie Dufresne, Marcel Desrosiers and Mary Gregory for their assistance. Drs. Matthew D. Ringel (Ohio State University) and Shoukat Dedhar (University of British Columbia) are thanked for their gifts of expression vectors. IP is the recipient of NSERC and Fondation Armand-Frappier studentships. This study was supported by a grant from the Canadian Liver Foundation to MC and DGC as well as an NSERC discovery grant to DGC.

REFERENCES

1. Sosinsky, G.E. and Nicholson, B.J. (2005) Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*, **1711**, 99-125.

2. Chipman, J.K., Mally, A., and Edwards, G.O. (2003) Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Sci*, **71**, 146-53.

3. Goodwin, M. and Yap, A.S. (2004) Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol*, **35**, 839-44.

4. Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A., and Shibata, Y. (1997) Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci*, **110 (Pt 3)**, 311-22.

5. Plante, I., Cyr, D.G., and Charbonneau, M. (2005) Involvement of the integrin-

linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci*, **88**, 346-57.

6. Persad, S. and Dedhar, S. (2003) The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, **22**, 375-84.

7. Hannigan, G., Troussard, A.A., and Dedhar, S. (2005) Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*, **5**, 51-63.

8. Plante, I., Charbonneau, M., and Cyr, D.G. (2002) Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis*, **23**, 1243-9.

9. Saji, M., Vasko, V., Kada, F., Allbritton, E.H., Burman, K.D., and Ringel, M.D. (2005) Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 167-73.

10. Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, **9**, 59-71.

11. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

12. Mongroo, P.S., Johnstone, C.N., Naruszewicz, I., Leung-Hagesteijn, C., Sung, R.K.,

Carnio, L., Rustgi, A.K., and Hannigan, G.E. (2004) Beta-parvin inhibits integrin-linked kinase signaling and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*, **23**, 8959-70.

13. Wu, C. and Dedhar, S. (2001) Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol*, **155**, 505-10.

14. Randi, A.S., Sancovich, H.A., Ferramola de Sancovich, A.M., Loaiza, A., Kolliker Frers, R.A., Spinelli, F., and Kleiman de Pisarev, D.L. (2003) Effect of in vivo administered hexachlorobenzene on epidermal growth factor receptor levels, protein tyrosine kinase activity, and phosphotyrosine content in rat liver. *Biochem Pharmacol*, **65**, 1495-506.

15. Randi, A.S., Sancovich, H.A., Ferramola de Sancovich, A.M., Loaiza, A., Krawiec, L., and Kleiman de Pisarev, D.L. (1998) Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function. *Toxicology*, **125**, 83-94.

16. Li, B., Desai, S.A., MacCorkle-Chosnek, R.A., Fan, L., and Spencer, D.M. (2002) A novel conditional Akt 'survival switch' reversibly protects cells from apoptosis. *Gene Ther* , **9**, 233-44.

17. Czyz, J., Guan, K., Zeng, Q., and Wobus, A.M. (2005) Loss of beta 1 integrin function results in upregulation of connexin expression in embryonic stem cell-

derived cardiomyocytes. *Int J Dev Biol*, **49**, 33-41.

18. Hernandez-Blazquez, F.J., Joazeiro, P.P., Omori, Y., and Yamasaki, H. (2001) Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin in murine skin papilloma cells. *Exp Cell Res*, **270**, 235-47.

19. Solan, J.L. and Lampe, P.D. (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1711**, 154-63.

20. Cruciani, V. and Mikalsen, S.O. (2002) Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell*, **94**, 433-43.

21. Aravindakshan, J. and Cyr, D.G. (2005) Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod*, **72**, 1232-40.

22. Yamamoto, T., Kojima, T., Murata, M., Takano, K., Go, M., Hatakeyama, N., Chiba, H., and Sawada, N. (2005) p38 MAP-kinase regulates function of gap and tight junctions during regeneration of rat hepatocytes. *J Hepatol*, **42**, 707-18.

23. Ren, P., de Feijter, A.W., Paul, D.L., and Ruch, R.J. (1994) Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis*, **15**, 1807-13.

24. Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E., and Stoffel, M. (2003) Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11624-9.

25. Piechocki, M.P., Toti, R.M., Fernstrom, M.J., Burk, R.D., and Ruch, R.J. (2000) Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 107-22.

26. Koffler, L.D., Fernstrom, M.J., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., and Ruch, R.J. (2002) Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha. *Arch Biochem Biophys*, **407**, 160-7.

27. Field, J.M., Tate, L.A., Chipman, J.K., and Minchin, S.D. (2003) Identification of functional regulatory regions of the connexin32 gene promoter. *Biochim Biophys Acta*, **1628**, 22-9.

28. Bai, S., Spray, D.C., and Burk, R.D. (1993) Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim Biophys Acta*, **1216**, 197-204.

29. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*, **238**, 291-300.

30. Pore, N., Liu, S., Shu, H.K., Li, B., Haas-Kogan, D., Stokoe, D., Milanini-Mongiat,

J., Pages, G., O'Rourke, D.M., Bernhard, E., and Maity, A. (2004) Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, **15**, 4841-53.

31. Vasko, V., Saji, M., Hardy, E., Kruhlak, M., Larin, A., Savchenko, V., Miyakawa, M., Isozaki, O., Murakami, H., Tsushima, T., Burman, K.D., De Micco, C., and Ringel, M.D. (2004) Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet*, **41**, 161-70.

32. Van de Sande, T., Roskams, T., Lerut, E., Joniau, S., Van Poppel, H., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2005) High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol*, **206**, 214-9.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Determination of cross contamination between nuclear and cytoplasmic fractions. Cytoplasm (C) and nuclear (N) proteins were extracted from MH_1C_1 cells using the NE-PER Cytoplamic and Nuclear Protein extraction kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). An aliquot of proteins (50 μg) from each sample was subjected to Western blot analysis. Nuclear compartment enrichment has been determined using albumin as a cytoplasmic marker and Sp1 transcription factor as a nuclear marker.

Figure 2: ILK mRNA and protein levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-ILK+ cells. MH_1C_1 cells were transiently transfected with either control or ILK expression vectors and lysed 24h later. (A) mRNA was extracted and used for semi-quantitative RT-PCR analysis using ILK-specific primers. Samples were standardized for loading using GAPDH. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 12, from three independent experiments). ** indicates a significant difference from controls ($p<0.01$). (B) Cells were lysed and an aliquot of proteins from each sample was subjected to Western blot analysis using ILK antisera. Amounts of proteins loaded were 50 μg. Data were standardized for loading using an actin antisera. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 12, from three independent experiments). * indicates a significant difference from controls ($p<0.05$).

Figure 3: Connexin32 mRNA levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-ILK+ cells. MH_1C_1 cells were transiently transfected with either control or ILK expression vectors and lysed 24h later. mRNA was extracted using the phenol-chloroform method and then used for RT-PCR analysis using Cx32 specific primers. Data were standardized for loading using

GAPDH mRNA levels. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 12, from three independent experiments). ** indicates a significant difference from controls ($p<0.01$).

Figure 4: Akt and phospho-Akt protein levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-ILK+ cells. MH_1C_1 cells were transiently transfected with either control or ILK expression vectors and lysed 24h later. Cells were lysed using the NE-PER cytoplasmic and nuclear protein extraction kit (Pierce Biotechnology) and an aliquot of protein (50 μg) from each sample was subjected to Western blot analysis using (A,B) Akt antisera or (C,D) phospho-Akt antisera. Data were standardized for loading using an actin antisera for cytoplasmic fractions. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 12, from three independent experiments). *, **, *** indicate a significant difference from controls ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.005$, respectively).

Figure 5: Akt and phospho-Akt protein levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-Akt+ cells. MH_1C_1 cells were transiently transfected with either control or active Akt expression vectors and lysed 24h later. Cells were lysed using NE-PER cytoplasmic and nuclear protein extraction kit (Pierce Biotechnology) and an aliquot of protein (50 μg) from each sample was subjected to Western blot analysis using Akt antisera or phospho-Akt antisera. Data were standardized for loading using an actin antisera for the cytoplasmic fractions.

Figure 6: Connexin32 mRNA and proteins levels in MH_1C_1 and MH_1C_1-Akt+ cells. MH_1C_1 cells were transfected with either control or active Akt expression vectors and

lysed 24h later. (A) mRNA was extracted using the phenol-chloroform method and then used in RT-PCR analysis using Cx32 specific primers. Data were standardized for loading using GAPDH mRNA levels. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 12, from three independent experiments). (B) Proteins were extracted and Cx32 immunoprecipitated (IP) as described in material and methods. The nitrocellulose membrane containing IP Cx32 was subjected to immunoblotting using an anti-Cx32 antisera. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 7) The experiment was repeated once. ** indicates a significant difference from controls ($p<0.01$).

Figure 7: Effect of Akt localization in MH_1C_1, MH_1C_1-Akt-WT+ and MH_1C_1-Akt-NES+ cells on Cx32. (A) MH_1C_1 transfected using cells using Akt-WT-GFP (I) and Akt-NES-GFP (II) expression vectors pEGFP-C1. Nuclei were stained using 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and examined under a fluorescent microscope (III and IV). The localization of Akt was analyzed using the ImagePro Plus computer software (V and VI) (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). (B) MH_1C_1 transfected using cells using Akt-NES-GFP and Akt-WT-GFP expression vectors pEGFP-C1, and incubated with a mouse anti-Cx32 antibody (Sigma-Aldrich) and a goat anti-mouse-phycoerytrin antibody (Jackson Laboratories). Only positive events in GFP staining (red quadrant in "i") were used to analyze Cx32 protein levels (ii). Cx32 expression was quantified by flow cytometry (50 000 events) with a FACSCalibur system (iii). b indicates a significant difference from a ($p<0.05$).

Table 1: List of transfection vectors used in Akt experiments and their activity.

Name of the vector	Term used to designed transfected cells	Transfected Akt status
PCL-neo	MH_1C_1	Not applicable
myr-Akt1	MH_1C_1–Akt+	Active
Akt-WT-GFP	MH_1C_1-Akt-WT+	Inactive
Akt-NES-GFP	MH_1C_1-Akt-NES+	Nuclear only active

Figure 1

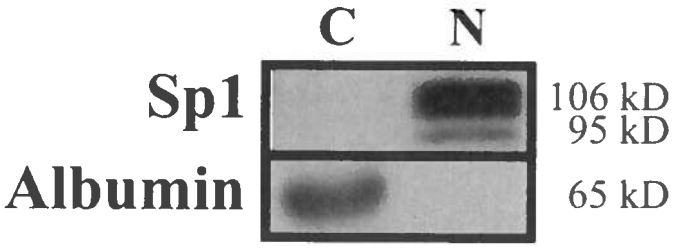


Figure 2

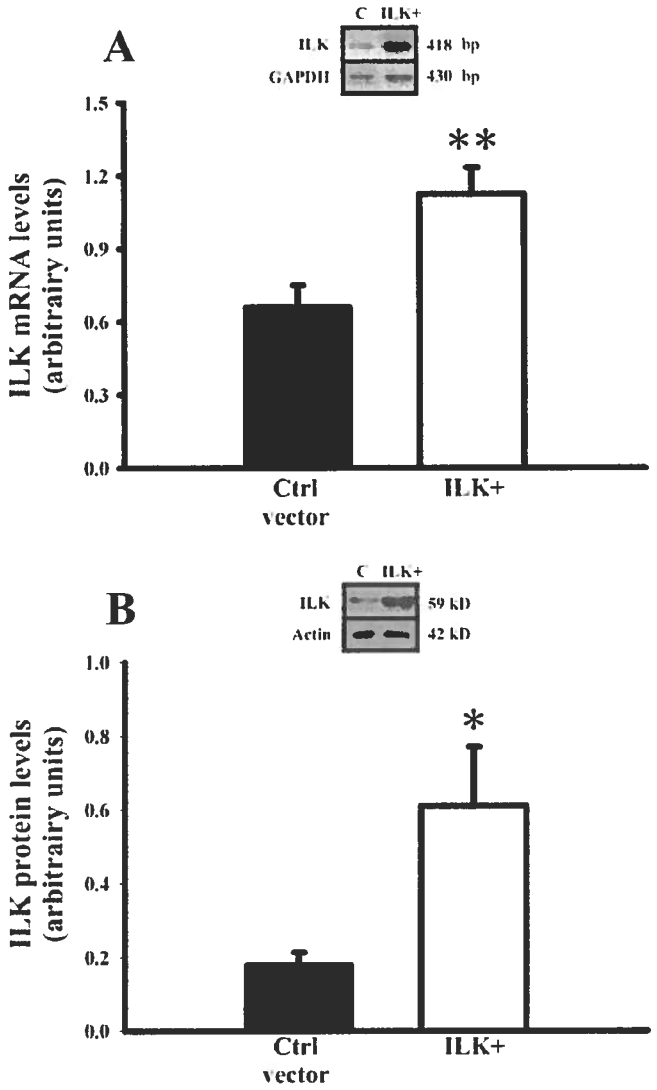

A
C ILK+
ILK
GAPDH
418 bp
430 bp
ILK mRNA levels
(arbitrairy units)
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
**
Ctrl
vector
ILK+
B
C ILK+
ILK
Actin
59 kD
42 kD
ILK protein levels
(arbitrairy units)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Ctrl
vector
ILK+

Figure 3

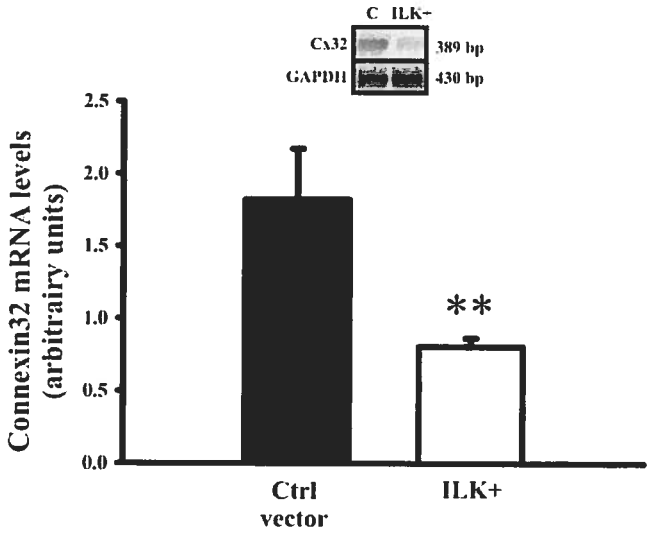

C ILK+
Cx32
GAPDH
389 bp
430 bp
Connexin32 mRNA levels
(arbitrairy units)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Ctrl
vector
ILK+

Figure 4

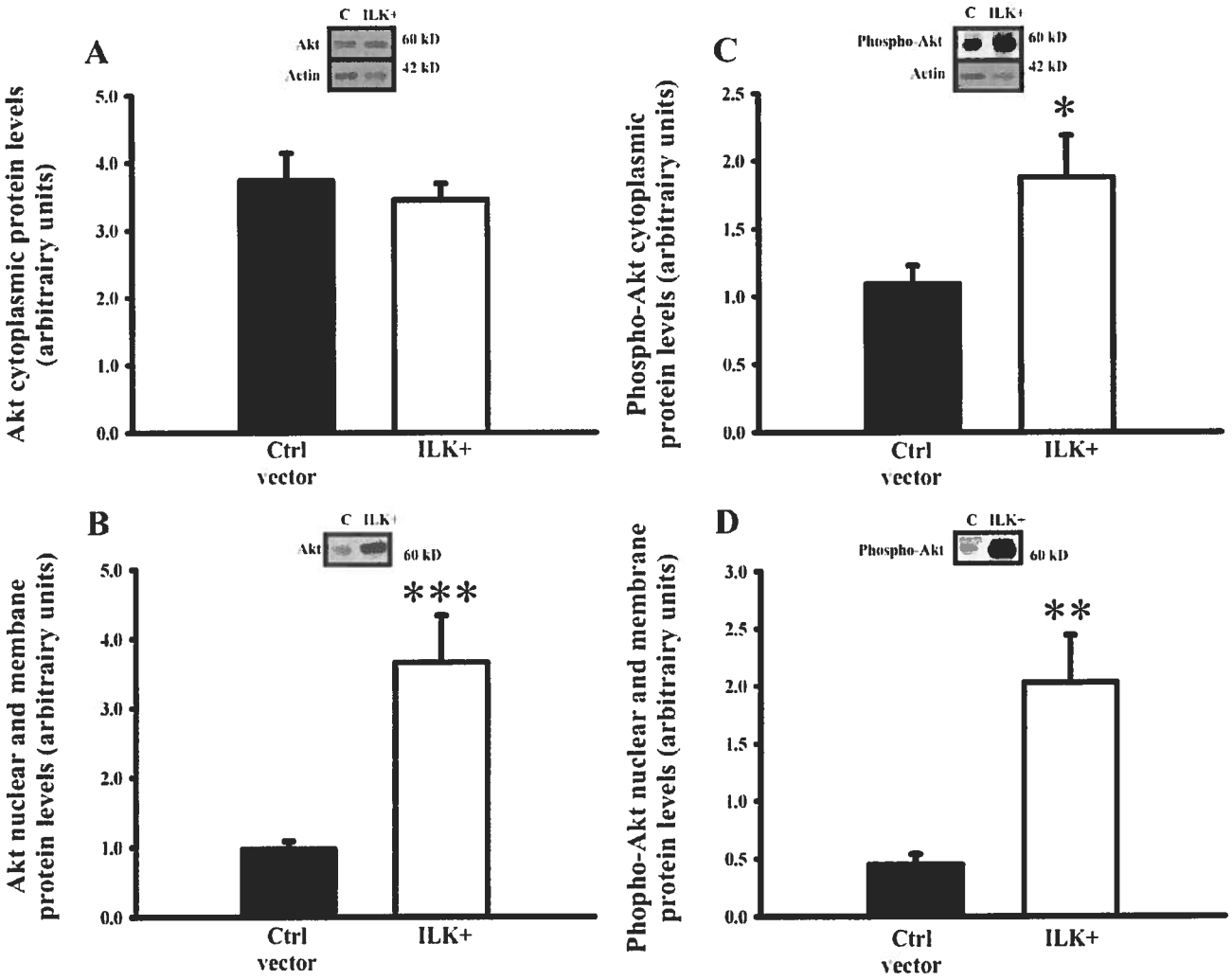

A
C ILK+
Akt
Actin
60 kD
42 kD
Akt cytoplasmic protein levels (arbitrairy units)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Ctrl vector
ILK+
C
C ILK+
Phospho-Akt
Actin
60 kD
42 kD
Phospho-Akt cytoplasmic protein levels (arbitrairy units)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Ctrl vector
ILK+
B
C ILK+
Akt
60 kD
Akt nuclear and membane protein levels (arbitrairy units)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
***
Ctrl vector
ILK+
D
C ILK+
Phospho-Akt
60 kD
Phopho-Akt nuclear and membrane protein levels (arbitrairy units)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Ctrl vector
ILK+

Figure 5

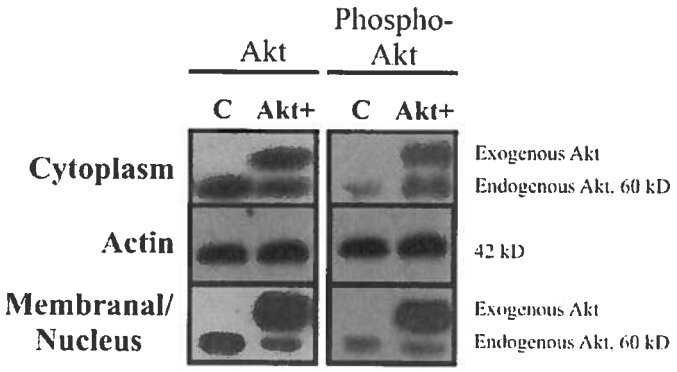

Akt
Phospho-Akt
C
Akt+
C
Akt+
Cytoplasm
Actin
Membranal/ Nucleus
Exogenous Akt
Endogenous Akt, 60 kD
42 kD
Exogenous Akt
Endogenous Akt, 60 kD

Figure 6

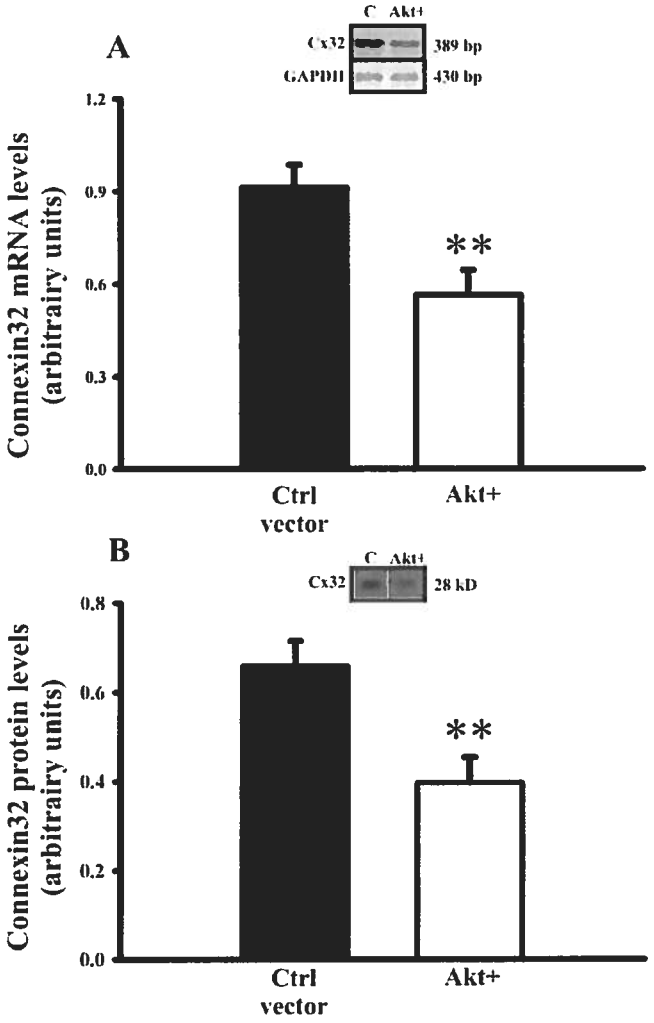
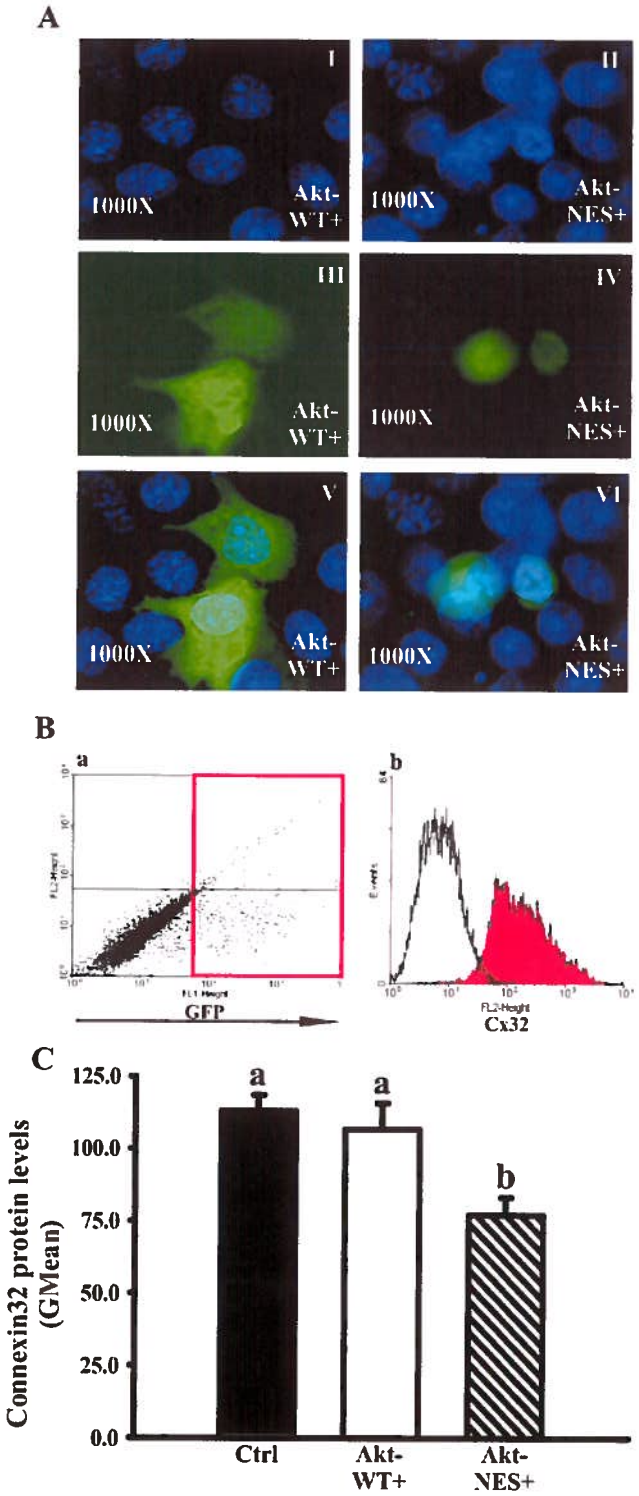

A
C Akt+
Cx32
GAPDH
389 bp
430 bp
Connexin32 mRNA levels
(arbitrairy units)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
**
Ctrl
vector
Akt+
B
C Akt+
Cx32
28 kD
Connexin32 protein levels
(arbitrairy units)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
Ctrl
vector
Akt+

Figure 7


A
I
1000X
Akt-
WT+
II
1000X
Akt-
NES+
III
1000X
Akt-
WT+
IV
1000X
Akt-
NES+
V
1000X
Akt-
WT+
VI
1000X
Akt-
NES+
B
a
GFP
b
Cx32
C
Connexin32 protein levels
(GMean)
125.0
100.0
75.0
50.0
25.0
0.0
a
a
b
Ctrl
Akt-
WT+
Akt-
NES+

SECONDE PARTIE. SECTION 3:

SEXUAL DIMORPHISM IN THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF LIVER CONNEXIN32 IN HEXACHLOROBENZENE-TREATED RATS

Isabelle Plante, Daniel G.Cyr et Michel Charbonneau

Manuscrit en préparation pour soumission

3.1. Résumé français de l'article

L'hexachlorobenzène (HCB), un polluant environnemental, est un cancérigène épigénétique. Il a été démontré qu'une exposition à l'HCB favorise le développement de tumeurs hépatiques de façon plus importante chez les rats femelles que chez les mâles. Cette prédisposition a été associée à une baisse des interactions cellule-cellule. Les femelles exposées à l'HCB démontrent une activation hépatique de la voie de la kinase associée aux intégrines (« Integrin-Linked kinase », ILK), résultant en inhibition de l'expression de la E-cadhérine, une protéine des jonctions adhérentes, et de la connexine 32, une protéine des jonctions lacunaires, via une inhibition de la glycogène synthétase kinase-3β (GSK3β) et une activation de la protéine Akt, respectivement. De plus, un dimorphisme sexuel a été démontré au niveau de l'expression hépatique basale de la connexine 32 ; les mâles ayant environ huit fois plus de connexine 32 que les femelles. Le promoteur de la connexine 32 a été étudié et comporte différentes régions impliquées dans la régulation hépatique. Cependant, l'implication de ces régions promotrices dans l'inhibition de la connexine 32 n'est pas connue. L'objectif de ces études était donc de caractériser la régulation transcriptionnelle de la connexine 32 (1) au niveau du dimorphisme sexuel, ainsi que (2) lors de l'exposition à l'HCB. Des rats mâles et femelles ont été exposés à l'HCB durant cinq jours consécutifs, puis les foies ont été échantillonnés 45 jours plus tard. Des analyses de mobilité électrophorétique (« Electrophoresis Mobility Shift Assay », EMSA) ont permis de démontré qu'une région située dans le promoteur basal du promoteur de la connexine 32 est impliqué dans le dimorphisme sexuel, puisque le complexe formé par un facteur de transcription et un fragment, le Fr26 était moins intense chez les femelles que chez les mâles. La liaison de ce facteur de transcription était également moins importante chez les femelles traitées à

l'HCB par rapport aux femelles témoins. Une autre région du promoteur de la connexine 32, le Fr110 est impliquée dans l'inhibition de l'expression de la connexine 32 puisque le complexe formé par ce fragment et son facteur de transcription était moins intense chez les femelles traitées à l'HCB par rapport aux femelles témoins. La liaison de ce complexe est contrôlée par la voie de l'ILK puisque l'augmentation de l'expression de la protéine Akt dans des hépatocytes de rats (MH_1C_1) en réduit l'intensité. En conclusion, cette étude a permis de démontrer que le dimorphisme sexuel observé dans l'expression hépatique de la connexine 32 est associée à la liaison moins importante d'un facteur de transcription dans la partie basale du promoteur chez les rats femelles. Une exposition à l'HCB amène une baisse encore plus importante de la liaison de ce facteur chez les femelles, ainsi que la baisse de liaison d'un autre facteur de transcription via l'activation de la protéine Akt. Ces résultats suggèrent que la baisse de l'expression de la connexine 32 chez les femelles résulte d'une perte de la liaison de deux facteurs de transcription positifs sur le promoteur.

3.2. Contribution de l'étudiante

Toutes les expériences présentées dans cet article ont été réalisées par l'étudiante. Le premier manuscrit de l'article a également été écrit par l'étudiante. Finalement, l'étudiante participera la version finale de l'article en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal de publication.

Sexual Dimorphism in the Regulation of Liver Connexin32 Transcription in Hexachlorobenzene-Treated Rats

Isabelle Plante, Daniel G. Cyr[1,2] and Michel Charbonneau[1,2]
INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boulevard,
Pointe-Claire, QC, Canada, H9R 1G6

[1] Corresponding author
[2] Both authors contributed equally to all parts of the work.

Running title: HCB regulates Connexin32 in liver

Keywords: Hexachlorobenzene, Connexin32, Gap Junctions, Akt, Integrin-Linked kinase, Promoter, EMSA

Address for correspondence:

Dr. Michel Charbonneau
INRS-Institut Armand Frappier
Université du Québec
245 Hymus boulevard
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8831
Fax (514) 630-8850
e-mail: michel.charbonneau@iaf.inrs.ca

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand Frappier
Université du Québec
245 Hymus boulevard
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8833
Fax (514) 630-8850
e-mail: daniel.cyr@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Hexachlorobenzene (HCB) is an epigenetic carcinogen rendering female rats susceptible to liver tumor formation through down-regulation of Cx32, a gap junction protein. A sexual dimorphism in respect to Cx32 expression has also been shown in rat liver with untreated males having 8-fold more Cx32 mRNA than untreated females. The objectives of this study were to (1) determine if the observed sexual dimorphism in the expression of Cx32 is associated with a gender-specific binding of transcription factors on the Cx32 promoter; (2) identify regions of the Cx32 promoter implicated in the HCB-induced down-regulation of Cx32 in female rat liver; and (3) determine if HCB exposure modulates the binding of transcription factors on the Cx32 promoter through Akt activation, a key down-stream messenger in the Integrin-linked kinase (ILK) pathway, which is activated in HCB-treated females. Male and female rats were exposed to HCB during 5 consecutive days and sampled 45 days later. Liver nuclear proteins were extracted, incubated with specific fragments of the Cx32 promoter and analysed using EMSA. A complex formed by a fragment of the basal promoter (Fr26) and a transcription factor of approximately 60 kDa was less intense in female rats as compared to males; mutation experiments showed that two binding sites are necessary for the binding of this complex. Following HCB exposure, the intensity of two complexes was decreased in females, but not in males (Fr26 and Fr110). Binding of a complex comprised of a 60 kDa and a 110 kDa protein to the 5' region of Fr110 appears to be controlled by the ILK pathway, since overexpression of Akt in rat hepatocytes (MH_1C_1) inhibits its formation. Overall, these results suggest that both the sexual dimorphism and the down-regulation of

Cx32 in HCB-treated female rats are mediated by a reduction in the binding of activating transcription factors on the Cx32 promoter.

INTRODUCTION

Gap junctions are composed of intercellular channels, or connexons, formed by a family of proteins termed connexins [22]. Adult rat hepatocytes express only two connexins: Cx32 and Cx26. These channels permit bidirectional communication between cells by selectively allowing the passage of ions, metabolites and secondary messengers. Gap junctional intercellular communication (GJIC) is essential for the regulation of homeostasis. A down-regulation of Cxs and gap junctional intercellular communication (GJIC) in tumor cells has been well documented [3]. Many epigenetic carcinogens have been shown to promote tumor formation by disturbing gap junctional intercellular communication (GJIC) [20].

Hexachlorobenzene (HCB), a widespread environmental pollutant, is an epigenetic carcinogen. We and others have reported that HCB exposure renders females more susceptible than males to chemically-induced liver carcinogenesis [21] [15] [9] [8] [10]. We have reported that a 5 day exposure to HCB results in a decrease in GJIC in females [17]. Hepatic mRNA and protein levels for Cx32 and Cx26 were also significantly lower at day 50 in livers of HCB-treated females when compared to controls, whereas in males there were no differences between controls and HCB-treated rats. These changes are consistent with the occurrence of sexually dimorphic tumor formation [21] [25] [4]. Our studies have shown that HCB-induced tumor promotion in females is associated with the activation of the Integrin-Linked kinase pathway (ILK) in which Akt, a down-stream target of ILK, regulates Cx32 expression [18];[19]. Furthermore, a marked sexual dimorphism was observed in Cx32 and Cx26 basal mRNA levels, since there were 8-fold lower and 3-fold higher, respectively, in females as compared to males.

Cx32 is expressed at levels that are approximately 10-fold higher than Cx26 in the liver [26]. Cx32 knockout mice are more susceptible to chemically-induced liver tumor formation, suggesting a more important role of Cx32 in carcinogenesis [14] [24] [6]. However, the transcription factors implicated in the decrease of Cx32 during hepatocarcinogenesis are unknown. Three promoters have been identified that are involved in regulating Cx32 expression. The first is located upstream of the first exon, lacks a TATA box, contains a CCAAT box and Sp1 elements which stimulate Cx32 expression in adult rat liver [12] [13] [5]. Two additional promoter regions located within the intron have been shown to regulate Cx32 expression in neural and embryonic tissues, but are inactive in adult rat liver. Several transcriptional factors have been shown to bind to response elements in the Cx32 promoter. These include HNF-1, Sp1, YY1 and NF-1. However, their role in carcinogenesis remain to be determined [2] [1] [16] [11] [5] [7].

The objectives of this study were to (1) determine if the observed sexual dimorphism in the expression of Cx32 is associated with a gender-specific binding of transcription factors on the Cx32 promoter; (2) identify regions of the Cx32 promoter implicated in the HCB-induced down-regulation of Cx32 in female rat liver; and (3) determine if HCB exposure modulates the binding of transcription factors on the Cx32 promoter through Akt activation, a key down-stream messenger in the ILK pathway.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male and female Sprague–Dawley rats (180–200 g) were purchased from Charles River Canada (St. Constant, QC). Rats were maintained under a constant photoperiod of 12 h

light:12 h dark and received food and water *ad libitum*. All animal protocols used in this study were approved by the University Animal Care Committee.

Animal treatments

Rats were administered HCB (100 mg/kg) or vehicle (corn oil, controls) by gavage for 5 consecutive days, and killed 45 days after the last HCB dose. At this time point (day 50), a significant decrease in hepatic Cx32 and Cx26, both at mRNA and protein levels, and an overexpression of the ILK pathway in female rats had been previously observed [17]. HCB administered to rats using this experimental protocol does not cause liver injury as determined by the absence of morphological changes and normal plasma levels of alanine aminotransferase. At the time of sampling, rats were anesthetized by isoflurane inhalation and the liver was removed, frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for subsequent analyses.

Cell Cultures and transfection

MH_1C_1 rat liver cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS at 37°C with 5% CO_2 .

Cells grown at 95% confluence were transiently transfected using 40 μg/ml lipofectamine 2000 (InVitrogen Life Technologies, Invitrogen Canada, Burlington, ON) in DMEM without FBS, according to the manufacturer's instructions. Cells were lysed 24h later for extraction of nuclear proteins. Constitutively active myr-Akt1 expression vector pUSEamp(+) was purchased from UpState Biosciences. PCL-neo (Promega, Madison,

WI) was used as a negative control vector; no differences were observed between PCL-neo transfected cells and untransfected cells. These transfections did not affect cell viability as determined by trypan blue exclusion assays and methylthiazoletetrazolium (MTT) colorimetric analysis.

Nuclear protein extraction

Nuclear proteins from liver and MH_1C_1 rat hepatocytes were extracted using the Nuclear and Cytoplasmic NE-PER protein extraction kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were assessed using Bio-Rad Protein Assay reagents (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Electrophoresis Mobility Shift Assays (EMSA) were done according to Morsi *et al.* (2004). Briefly, Cx32 promoter fragments (10 pmol of sense oligonucleotides) were incubated with T4 Polynucleotide Kinase (InVitrogen Life Technologies) and [γ-^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol), for 30 min at 37°C, and subsequently purified on a NICK™ Sephadex column (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). The labelled DNA probe was then incubated with the corresponding antisense fragment. Radioactive double stranded DNA (20 fmol) were incubated with 4 μg of nuclear protein in EMSA incubation buffer (40 % glycerol, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 μg\ml de poly dI-dC) for 30 min at room temperature. When appropriate, samples were incubated 30 min at room temperature with either antibody or non-radioactive probe prior to incubation with the radioactive probe. Samples were then

separated on a 4% non-denaturating gel, dried and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics, Amersham Biosciences). Fragments (Fr26, Fr53, Fr70, Fr26mA, Fr26mB, Fr110A, Fr110B, Fr110C, Fr110AmA and Fr110AmB) used for EMSA were synthesized by InVitrogen (InVitrogen Life Technologies). The sequence Fr110 was obtained by cutting the full-length promoter of Cx32 with restriction enzymes. The promoter was generously donated by Dr S. Minchin from The University of Birmingham, UK. Briefly, the promoter was sequentially cut in appropriate buffer with Alu 1 for 1 hour and Mbo I for another hour. The fragments were separated on a 2% agarose gel and the Fr110 fragment was extracted from the gel using QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The sequence of each fragment is indicated in Table 1.

Southwestern blot

Southwestern blots were done according to Bai *et al.* (1995), with few modifications. Briefly, nuclear proteins were processed on a 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked 1 hr at room temperature in blocking buffer (5% dry milk, 4% glycerol, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.05% Tween) and then incubated 2 hr at room temperature in blocking solution containing 7.5 X 10^6 CPM of radioactive double stranded DNA (Fr26 and Fr110A probes). After hybridization, membranes were washed twice (15 min each) in blocking solution and rinsed in washing buffer (100 nM NaCl, 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA), then analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics).

Statistical analysis

Statistical differences between groups, i.e. control vs HCB-treated groups or between MH_1C_1 vs MH_1C_1-Akt+, were determined using either a Student-t test when there were only two experimental groups or an ANOVA followed *a posteriori* by a Tukey test for multiple comparisons between multiple experimental groups. Each experiment was repeated three times using 3 or 4 independent samples per group. Significance was set at $p<0.05$. All statistical analyses were done using the SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

RESULTS

The sexual dimorphism in Cx32 expression

The first objective was to determine if the sexual dimorphism observed previously for hepatic Cx32 expression was due to differential transcription factor binding to the promoter. In these experiments, we used four different fragments of the Cx32 promoter to conduct EMSA analyses (Table 1, Fr26, Fr53, Fr70 and Fr110). These fragments represent critical regions implicated in the down-regulation of Cx32 in primary cultures of hepatocytes: Fr26 is located in the basal promoter, Fr53 are both located in positive regulatory regions and Fr110 partlially located in a negative regulatory region and partlially in a positive region [11]. The gender-specific Cx32 regulation in rat liver was assessed using EMSA by looking at the formation of complexes between these fragments and nuclear protein extracts from male and female rats.

Using Fr26, only one specific protein-DNA complex was formed when incubated with liver nuclear protein. In male rats, the Fr26 complex was two-fold more abundant then in female liver extracts (Figure 1A). Using Fr53, two specific complexes were

formed; neither of them showed significant differences between males and females (Figure 1B). For Fr110, only one complex was formed, and it did not differ between the two groups (Figure 1C). For Fr70, no specific complexes were formed when incubated with hepatic samples (data not shown). These results suggest that the sex-specific regulation of Cx32 is under the control of a transcription factor binding to the Cx32 promoter between mp -153 to mp -127.

Modulation of transcription factors on Cx32 promoter by HCB

In previous studies, we have shown that Cx32 expression was decreased in the livers of HCB-treated female rats as compared to controls, while there were no differences between HCB-treated and control males [17]. Changes in binding complexes formed between nuclear proteins and the different fragments of the Cx32 promoter were assessed in control and HCB-treated animals of both sexes. For Fr26, the binding complex formed with liver nuclear proteins showed a significant 5-fold decrease in HCB-treated female livers as compared to controls (Figure 2A). In males, there were no differences between HCB-treated and control animals (Figure 2B). For fragment Fr53, two different binding complexes were formed. For this fragment, there were no differences between the control and HCB-treated groups for either male or female rat livers (Figures 3A and 3B). Finally, using Fr110 we observed the formation of a single binding complex. This complex was decreased 3-fold in HCB-treated females as compared to controls (Figure 4A). In males, there were no differences between the control and HCB-treated groups (Figure 4B). Taken together, these EMSA analyses indicate that HCB exposure resulted in a decrease in two binding complexes in female rat livers in Fr26 and Fr110 regions of the Cx32 promoter. This suggests that the decrease in Cx32 expression previously observed may

have resulted from a decrease in the binding of activating transcription factors. Moreover, consistent with the gender-specific effect of HCB, these changes were not observed in male rat livers.

Modulation of transcription factor binding to Cx32 promoter by Akt

We have previously shown that HCB exposure leads to the activation of the ILK pathway in female rat livers, and that the decreased Cx32 expression appears to result from the activation of Akt [18] [19]. In order to assess the similarity between the effects of HCB and of Akt activation on complexes binding to the Cx32 promoter, nuclear proteins were extracted from MH_1C_1 cells transfected with a constitutively active Akt vector (MH_1C_1-Akt+ cells) as described in a previous paper [19] and were used for EMSA with Fr110 and Fr26. For both MH_1C_1 and MH_1C_1-Akt+, the complexes formed (Figure 5) were similar to those observed using rat liver extracts (Figure 1). No differences were observed between MH_1C_1 and MH_1C_1-Akt+ cells for Fr26, suggesting that the Akt-driven down-regulation of Cx32 is not exerted via transcription factors binding to this region of the promoter (Figure 5A). However, a significant 20% decrease was observed in complex formation resulting from binding to Fr110 (Figure 5B). Extrapolation of this *in vitro* data suggests that one of the two transcription factors implicated in the HCB-induced Cx32 decrease in rat liver is modulated via ILK pathway activation, namely through Akt.

Identification of transcription factors in Fr26 and Fr110 complexes

The Fr26 fragment contains various consensus binding sequences, including an Sp site and a site similar to the androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER) binding sites. In order to determine if these sites were important for Fr26 complex formation, two

different mutated fragments were synthesized: Fr26 mA contains a mutation in the Sp site and Fr26 mB contains a mutation in the AR/ER site (Table 1). Surprisingly, both unlabelled mutated probes failed to compete with the Fr26 complex (Figure 6A, lanes 4 to 7), suggesting that both mutations aborted the binding of protein to the Cx32 promoter. In order to confirm these results, mutated probes were labeled and incubated with nuclear extracts. No specific complexes were observed with either probe, confirming the necessity of both intact sites for proper Fr26 complex formation (Figure 6A, lanes 8 to 11). In order to determine if the complex observed was the result of a member of the Sp family binding to this site, Sp1 or Sp3 antibodies were incubated with nuclear proteins prior to Fr26 fragment analysis. Supershift analysis suggested, however, that the complex formed between Fr26 and nuclear extracts does not involve Sp1 or Sp3 (Figure 6B, lanes 1 to 6). Surprisingly, ERα, ERβ and AR antibodies also failed to supershift the Fr26 complex (Figure 6B, lanes 7 to 15).

Fr110 fragment is a 110 pb fragment and contains various binding sites. Thus, in order to restrain the number of possibilities, the Fr110 fragment was cut into three overlapping fragments (Fr110A, Fr110B and Fr110C) to determine which particular region is involved in Fr110 complex formation (Table 1). Only EMSA using the Fr110A radiolabeled probe resulted in the formation of a specific complex (Fr110A), suggesting that Fr110/Fr110A complex is formed on DNA between mp –373 to –335 (Figure 7A). Fr110A contains a hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) site and a Myb site. In order to determine the implication of these binding sites in Fr110/Fr110A complex formation, two mutated probes were synthesized: Fr110A mA contains a mutation in HNF-1 site and Fr110A mB contains a mutation in Myb site (Table 1). While competition assays using

Fr110A mA unlabeled probe abolished the formation of Fr110/Fr110A complex (Figure 7B, lanes 4 and 5), Fr110A mB failed to compete with the Fr110/Fr110A complex formation (Figure 7B, lanes 6 and 7). These results were confirmed with radiolabeled Fr110 mA and Fr110 mB: a Fr110/Fr110A complex is formed even if the HNF-1 site is mutated (Figure 7B, lanes 8 and 9), while mutation in the Myb site inhibits Fr110/Fr110A complex formation (Figure 7B, lanes 10 and 11). Together, these results suggest that an HNF-1 intact site is not required for Fr110/Fr110A complex formation, while the Myb site must to be intact. Supershift analysis suggested, however, that the complex formed between Fr110/Fr110A and nuclear extracts do not involve B-myb (Figure 7C, lanes 3 to 5). Since the B-myb site is similar to the glucocorticoid receptor (GR) binding site, supershift assays using a GR antibody were done; GR antibody also failed to supershift the Fr110/Fr110A complex (Figure 7C, lanes 6 to 8).

In order to better characterize proteins implicated in both Fr26 and Fr110/Fr110A complexes, Southwestern blots were performed. Using Fr26 radiolabeled probe, a single band was observed, around 60 kDa (Figure 8A). Using Fr110A as a probe, two bands were observed, one around 60 kDa, and one around 110 kDa (Figure 8B).

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that HCB-induced down-regulation of Cx32 results from a decrease in the binding of transcription factors to the Cx32 promoter, one of these (Fr26) also being implicated in the sex-specific regulation of Cx32. *In vitro* experiments suggested that HCB-induced Cx32 down-regulation results, at least in part, from an Akt-induced decrease in the binding of a transcription factor to the Cx32 promoter (Fr110). Data suggested that these two factors are activating factors since a

decrease in their binding is associated with down-regulation of Cx32 expression at the same time point.

Various transcription factors have been associated with Cx32 regulation. In the liver, few studies have looked at the promoter of Cx32, and studies suggest that different transcription factors may be implicated in Cx32 regulation *in vivo* and *in vitro*. A 760 bp sequence upstream of the first exon was first identified as the promoter region due to its ability to induce a strong luciferase activity in reporter gene assays [2]; this study also identified an activating regulatory region between mp -800 and mp -358, a negative regulatory region between mp -358 and mp -179, and a basal promoter region between mp -179 and mp -134. This basal promoter region contains two Sp1 sites, but no TATA and CAT box elements.

In our study, the Fr26 fragment (mp -152 to mp -127), located in the basal promoter region, forms a single binding complex when incubated with rat hepatic nuclear extracts. Southwestern analysis suggested that the transcription factor involved in the formation of that complex is a protein of about 60 kDa. This is in agreement with a report by Bai and co-workers; using a fragment comprising most of the basal promoter region (mp -177 to mp -106) they reported three binding complexes for the HuH7 human hepatoma cell line and the FAO-1 rat hepatoma cell line [1]. However, using rat liver tissue, only one complex was formed, located between mp -152 and mp -127, and which involved the binding of a 60 kDa protein. This suggests that only this region of the basal promoter is important for the *in vivo* regulation of Cx32. In contrast, using the same experimental conditions for the EMSA, three binding complexes with Fr26 have been shown in liver nuclear extracts from male Wistar rats [11]. Whether or not a strain-specific difference in binding is responsible for this discrepancy is not clear.

The regulation of Cx32 appears to differ from *in vivo* to *in vitro* systems and to depend on cell lines used. Using hepatocytes in primary culture, in which Cx32 expression is decreased as compared to liver extracts, three or five complexes were formed with the Fr26 fragment, depending upon the condition of the cells [11]. As previously described, three binding complexes were formed using either the HuH7 human hepatoma cell line or the FAO-1 rat hepatoma cell line [1]. However, only one complex was observed for MH_1C_1 nuclear extracts, which is similar to whole rat liver. MH_1C_1 is a differentiated rat hepatoma cell line that expresses Cx32. These results suggest that in the more differentiated MH_1C_1 cell line, Cx32 regulation appears similar to the *in vivo* situation.

Results suggest that the Fr26 fragment is associated with an activating transcription factor, since the intensity of the binding complex is decreased in female rats as compared to males, and it is further reduced by HCB in females, correlating with Cx32 mRNA levels observed [17]. The sexual dimorphism suggests that this may be regulated in part by ovarian factors and, interestingly, the Fr26 complex is situated in the basal promoter region. Results also suggest that two binding sites are important for the formation of the complex: an Sp site, located around mp -139, and an ER/AR site, located around -147. Indeed, mutations on either site abrogate the formation of the complex. The Fr26 complex was not the result of Sp1 or Sp3 binding, as shown by the absence of a supershift when liver nuclear proteins were preincubated with an antibody against Sp1 or Sp3. Using a longer sequence (mp -179 to mp -33) than our Fr26 (mp -152 to mp -127), Piechocki and co-workers [16] found three binding complexes were formed using MH_1C_1, all of which competed with unlabeled oligonucleotides for Sp1. These results are consistent with our results and suggest that the transcription factor binding to the basal

promoter binds to the Sp DNA binding site; however the binding protein is not Sp1 or Sp3. Other members of the Sp family have also been shown to bind to this site [23]; whether or not the Fr26 complex is formed by the binding of another member of this family to this promoter region remains to be elucidated.

Results suggest that another binding site is also important for the formation of the Fr26 complex, since mutations in the ER/AR binding site inhibit the formation of the complex. However, neither ER nor AR seem to be binding to this site, as shown by the absence of supershift using either ERα, ERβ or AR specific antibodies. Interestingly, both Sp and ER/AR sites have to be intact to allow the formation of the Fr26 complex. Consequently, data suggest that this complex is formed by either a single transcription factor binding simultaneously to both sites, or by multiple transcription factors.

Results obtained for the Fr53 (mp -687 to mp -635) and Fr70 (mp -757 to mp -688) probes differed from previously reported observations. Using Fr70, we observed a band at the bottom of the gel; however, this band seemed to be non-specific, since it was not competed by unlabelled probe. The use of Fr53 resulted in the formation of two complexes rather than for the single complex observed by Morsi and co-workers in the liver [11]. Here again, a strain-specific difference may explain this discrepancy. Since no variation between males and females and no HCB-induced effects were observed for these binding complexes using the Fr53 fragments, it suggests that transcription factors binding to this region are not implicated in the decrease of Cx32 mRNA levels following HCB exposure, nor in the sex-specific regulation of Cx32.

Another protein-DNA complex was decreased in HCB-treated females as compared to controls, in a region that is not well-characterized, but appears to be

important in chemical-induced Cx32 down-regulation. Interestingly, the binding complex formed between liver nuclear proteins and Fr110 also occurred in MH_1C_1 cells. There was a 20% decrease in the intensity of this Fr110 complex in MH_1C_1-Akt+ cells as compared to wild type MH_1C_1 cells, suggesting that HCB-induced Akt activation is involved in the decrease of Fr110 complex. Using overlapping shorter sequences, we demonstrated that the Fr110 complex is formed between mp -373 and -335 (Fr110A). Moreover, using mutation assays, we showed that a Myb binding site located around mp -347 has to be intact to allow formation of the complex, whereas a mutation in the HNF-1 site located at -356 had no effect. However, preincubation of the complex using either B-Myb or GR specific antibodies failed to supershift the complex. Southwestern analyses using Fr110A probe demonstrated that the Fr110 complex was formed either by two different transcription factors, one of approximately kDa and one of approximately 110 kDa, or by a single transcription factor of approximately 60 kDa which can dimerize, resulting in a 110 kDa complex.

In this study, we have shown that the sexual dimorphism observed in Cx32 mRNA levels in female rats as compared to males, resulted from decreased binding of a transcription factor in the basal promoter region of Cx32. Moreover, we have shown that the decreased binding of transcription factors was also implicated in the female specific HCB-induced decrease of Cx32. Results suggest that HCB exposure decreases Cx32 levels by inhibiting the binding of at least two transcription factors on the Cx32 promoter, including one which seems to be regulated by Akt. Together, our results suggest that HCB renders females more susceptible to hepatocarcinogenesis by decreasing the binding of transcription factors implicated in the expression of Cx32.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Steven Minchin is thanked for the generous gift of the Cx32 promoter expression vector. IP is the recipient of NSERC and Fondation Armand-Frappier studentships. This study was supported by grants from the Canadian Liver Foundation, and the Toxic Substances Research Initiative (Health Canada) to MC and DGC as well as an NSERC discovery grant to DGC.

REFERENCES

1. Bai, S., Schoenfeld, A., Pietrangelo, A., and Burk, R.D. (1995) Basal promoter of the rat connexin 32 gene: identification and characterization of an essential element and its DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*, **15** , 1439-45.

2. Bai, S., Spray, D.C., and Burk, R.D. (1993) Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim Biophys Acta*, **1216**, 197-204.

3. Cottrell, G.T. and Burt, J.M. (2005) Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1711**, 126-41.

4. Erturk, E., Lambrecht, R.W., Peters, H.A., Cripps, D.J., Gocmen, A., Morris, C.R., and Bryan, G.T. (1986) Oncogenicity of hexachlorobenzene. *IARC Sci Publ*,417-23.

5. Field, J.M., Tate, L.A., Chipman, J.K., and Minchin, S.D. (2003) Identification of functional regulatory regions of the connexin32 gene promoter. *Biochim Biophys Acta*, **1628**, 22-9.

6. King, T.J. and Lampe, P.D. (2004) Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis*, **25**, 669-80.

7. Koffler, L.D., Fernstrom, M.J., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., and Ruch, R.J. (2002) Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha. *Arch Biochem Biophys*, **407**, 160-7.

8. Krishnan, Kannan, Brodeur, Jules, and Charbonneau, Michel. Developmental of an Experimental Model for the Study of Hexachlorobenzene-Induced Hepatic Porphyria in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 17, 433-441. 91.

9. Lambrecht, R.W., Ertürk, E., Grunden, E.E., Headley, D.B., Peters, H.A., Morris, C.R., and Bryan, B.T. (1983) Renal toxicity and tumorogenicity of hexachlorobenzene (HCB) in Syrian golden hamsters (H) after subchronic administration. *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **42**, 786.

10.Larouche, L. (1993) *Relaton entre la porphyrie hépatique induite par l'hexachlorobenzene et l'hépatocancérogenese chez le rat*. Université de Montreal, Montreal, Québec, Canada.

11. Morsi, A.S., Godfrey, R.E., Chipman, J.K., and Minchin, S.D. (2003) Characterisation of the connexin32 promoter and changes in response element complexes in rat liver and hepatocytes during culture associated with oxidative stress. *Toxicol In Vitro*, **17**, 191-9.

12. Neuhaus, I.M., Bone, L., Wang, S., Ionasescu, V., and Werner, R. (1996) The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. *Biosci Rep*, **16**, 239-48.

13. Neuhaus, I.M., Dahl, G., and Werner, R. (1995) Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene*, **158**, 257-62.

14. Omori, Y., Zaidan Dagli, M.L., Yamakage, K., and Yamasaki, H. (2001) Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. *Mutat Res*, **477**, 191-6.

15. Pereira, M.A., Herren, S.L., Britt, A.L., and Khoury, M.M. (1982) Sex difference in enhancement of GGTase-positive foci by hexachlorobenzene and lindane in rat liver. *Cancer Lett*, **15**, 95-101.

16. Piechocki, M.P., Toti, R.M., Fernstrom, M.J., Burk, R.D., and Ruch, R.J. (2000) Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 107-22.

17. Plante, I., Charbonneau, M., and Cyr, D.G. (2002) Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis*, **23**, 1243-9.

18. Plante, I., Cyr, D.G., and Charbonneau, M. (2005) Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci*, **88**, 346-57.

19. Plante, I., Charbinneau, M. and Cyr, D.G. (2006) Activation of the Integrin-Linked kinase pathway down-regulates hepatic Connexin32 via nuclear Akt. In press.

20. Ruch, R.J. and Trosko, J.E. (2001) Gap-junction communication in chemical carcinogenesis. *Drug Metab Rev*, **33**, 117-24.

21. Smith, A.G., Francis, J.E., Dinsdale, D., Manson, M.M., and Cabral, J.R. (1985) Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria. *Carcinogenesis*, **6**, 631-6.

22. Sosinsky, G.E. and Nicholson, B.J. (2005) Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*, **1711**, 99-125.

23. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*, **238**, 291-300.

24. Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K. (1997) High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol*, **7**, 713-6.

25. Wainstok de Calmanovici, R., Cochon, A.C., Zenklusen, J.C., Aldonatti, C., Cabral, J.R., and San Martin de Viale, L.C. (1991) Influence of hepatic tumors caused by diethylnitrosamine on hexachlorobenzene-induced porphyria in rats. *Cancer Lett*, **58**, 225-32.

26. Zhang, Jian-Ting and Nicholson, Bruce J. Sequence and Tissus Distribution of a Second Protein of Hepatic Gap Junctions, Cx26, As Deduced from its cDNA. The Journal of Cell Biology 109(6:2), 3391-3401. 89.

Table 1: Sequences of the fragments of the promoter used as probes for EMSA.

Name of the fragment and mapping point	Sequence
Fr26 (mp –152 to –127)	5'-AAG CTC CGG TCC TGG GCT GCT TGT CC-3'
Fr53 (mp –687 to -635)	5'-GAT CAA CTG CCT TAG CCC TAA GAG TAG AAG ACA TTT TTT AAG TAA GTT TTA TG-3'
Fr70 (mp –757 to –688)	5'-GAT CCT TCA GTT AAT GGT TGA CAT TCT GTT TAC CTA AAT GAT TGC CAA GAG TTT CTG CTT ACA TAT GAC A-3'
Fr110 (mp –373 to –264)	5'-CTG AGA TGT GTT AAG CAG CCA AAT CCA GTT CAG TAC CCC CAC ATA GGT CCA ATA TGG CAT TTT AAT GAC AAA TGA TGC TTT TCT TCC TCT GGG ACA GGG CAA GAA CTT TAG A-3'
Fr110A (mp –373 to –335)	5'-CTG AGA TGT GTT AAG CAG CCA AAT CCA GTT CAG TAC CCC-3'
Fr110B (mp –340 to –299)	5'-TAC CCC CAC ATA GGT CCA ATA TGG CAT TTT AAT GAC AAA TGA-3'
Fr110C (mp –304 to –264)	5'-AAA TGA TGC TTT TCT TCC TCT GGG ACA GGG CAA GAA CTT TAG A-3'
Fr26 mA (mp –152 to –127)	5'-AAG CTC CGG TCC TG**A** **AA**T GCT TGTCC-3'
Fr26 mB (mp –152 to –127)	5'-AAG CTC C**TT** TCC TGG GCT GCT TGT CC-3'
Fr110A mA (mp –373 to –335)	5'-CTG AGA TGT GTT AAG CAG **TTG** AAT CCA GTT CAG TAC CCC-3'
Fr110A mB (mp –373 to –335)	5'-CTG AGA TGT GTT AAG CAG CCA AAT CCA **AGG** CAG TAC CCC-3'

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Gender-specific binding of transcription factors from liver nuclear extracts on rat Cx32 promoter fragments in female and male rats.

Radiolabelled promoter fragments Fr26 (A), Fr53 (B) and Fr110 (C) were incubated with nuclear protein extract, resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics). For every panel, lane 1 represents unspecific binding and lane 10 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled probe. Lanes 2 to 5, represent nuclear extracts from females and lanes 6 to 9, represent nuclear extracts from males. * indicates a significant difference from females ($p<0.05$).

Figure 2: Effect of hexachlorobenzene on complexes formed from rat Cx32 promoter fragment Fr26 (mp -152 to mp -127) and liver nuclear extracts from control and HCB-treated animals.

Radiolabelled promoter fragment Fr26 was incubated with nuclear protein extract, resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics). For both panels, lane 1 represents unspecific binding and lane 10 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled probe. Lanes 2 to 5, represent nuclear extracts from control animals and lanes 6 to 9, represent nuclear extracts from HCB-treated animals. * indicates a significant difference from controls ($p<0.05$).

Figure 3: Effect of hexachlorobenzene on complexes formed from rat Cx32 promoter fragment Fr53 (mp -687 to mp -635) and liver nuclear extracts from control and HCB-treated animals.

Radiolabelled promoter fragment Fr53 was incubated with nuclear protein extract, resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI^{TM} Molecular Dynamics). For both panels, lane 1 represents unspecific binding and lane 10 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled probe. Lanes 2 to 5, represent nuclear extracts from control animals and lanes 6 to 9, represent nuclear extracts from HCB-treated animals.

Figure 4: Effect of hexachlorobenzene on complexes formed from rat Cx32 promoter fragment Fr110 (mp -373 to mp -264) and liver nuclear extracts from control and HCB-treated animals.

Radiolabelled promoter fragment Fr110 was incubated with nuclear protein extract, resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI^{TM} Molecular Dynamics). For both panels, lane 1 represents unspecific binding and lane 10 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled probe. Lanes 2 to 5, represent nuclear extracts from control animals and lines 6 to 9, represent nuclear extracts from HCB-treated animals.

Figure 5: Effect of hexachlorobenzene on complexes formed from rat Cx32 promoter fragments and nuclear extracts from MH_1C_1 and MH_1C_1–Akt$^+$ cells.

Radiolabelled promoter fragments were incubated with nuclear protein extract, resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics

Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics). For both panels, lane 1 represents unspecific binding. (A) Lines 2 to 4, represent nuclear extracts from MH_1C_1 and lanes 5 to 7, represent nuclear extracts from MH_1C_1 overexpressing Akt (MH_1C_1-Akt^+) cells. (B) Lanes 2 to 4, represent nuclear extracts from MH_1C_1 and lanes 5 to 7, represent nuclear extracts from MH_1C_1 overexpressing Akt (MH_1C_1-Akt^+) cells.** indicates a significant difference from controls ($p<0.01$).

Figure 6: Analyses of binding sites on fragment Fr26 (mp -152 to mp -127).

Radiolabelled promoter fragments were incubated with nuclear protein extract and resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics). (A) Effects of mutation in two different binding sites on the formation of Fr26 complex. Lane 1 represents unspecific binding, lane 2 liver nuclear extract with labeled Fr26 probe and lane 3 the competition assay using 100-fold excess of molar unlabelled probe. Lanes 4 and 5 (Fr26 mA) and lanes 6 and 7 (Fr26 mB) represent competition assays using either 100- or 200-fold molar excess of unlabelled mutated probes. Lanes 8 and 10 represents liver nuclear extracts with the labeled mutated probes and lanes 9 and 11 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled mutated probes. (B) Antibodies were pre-incubated with nuclear protein extract for 30 minutes. Radiolabelled fragment Fr26 was then incubated with nuclear protein extract and resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel.

Figure 7: Analyses of binding sites on fragment Fr110 (mp -373 to mp -264).

Radiolabelled promoter fragments were incubated with nuclear protein extract and resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics). The Fr110 was divided into three overlapping probes (Fr110A, Fr110B and Fr110C). (A) Lanes 1, 4 and 7 represent unspecific binding, lanes 2, 5 and 8 liver nuclear extract with the labeled probes and lanes 3, 6 and 9 the competition assay using 100-fold molar excess of unlabelled probes. (B) Effects of mutations into two different binding sites on the formation of Fr110/Fr110A complex. Lane 1 represents unspecific binding, lane 2 nuclear extract with the labeled Fr110A probe and lane 3 competition assay using 100-fold molar excess of unlabelled probe. Lanes 4 to 7 represent competition assays using either 100- or 200-fold molar excess of unlabelled mutated probes (Fr110A mA and Fr110A mB respectively). Lanes 8 and 10 represent liver nuclear extracts with the labeled mutated probes and lanes 9 and 11 competition assays using 100-fold molar excess of unlabelled mutated probes. (C) Antibodies were pre-incubated with nuclear protein extract for 30 min. Radiolabelled fragment Fr110A was then incubated with nuclear protein extract and resolved on a 4% non-denaturating polyacrylamide gel.

Figure 8: Characterization of Fr26 and Fr110/Fr110A complexes using Southwestern and LC-MS.

Nuclear protein extracts were resolved on 12% SDS-PAGE polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated 2 hr at room temperature with 7.5 X 10^6 CPM of radiolabelled Fr26 (A) or Fr110A (B) fragments and analysed using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager

SI™ Molecular Dynamics. For both panels, lane 1 represents molecular weight markers and lane 2 nuclear liver samples.

Figure 1

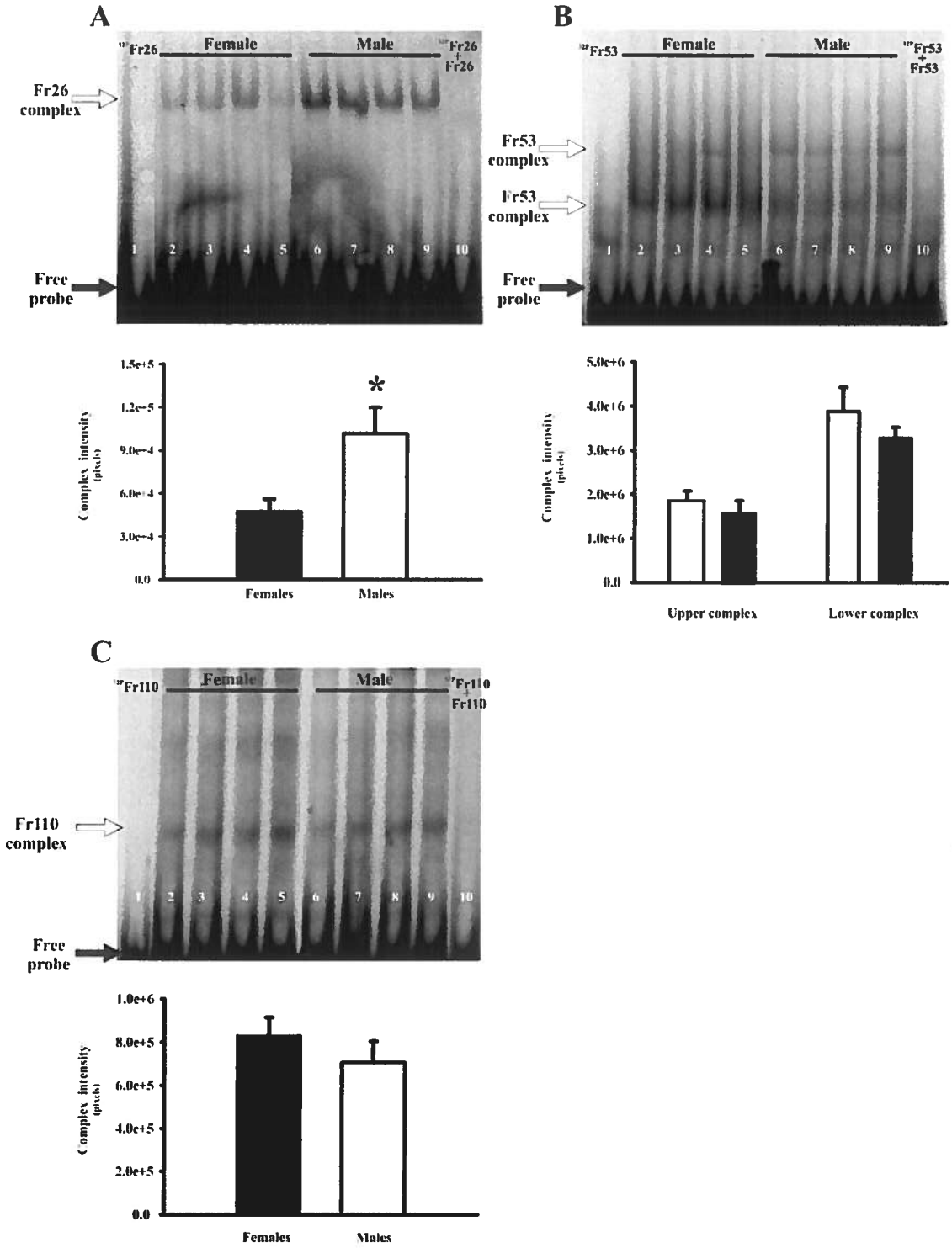

A
Fr26
Female
Male
Fr26 + Fr26
Fr26 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
1.5e+5
1.2e+5
9.0e+4
6.0e+4
3.0e+4
0.0
*
Females
Males
B
Fr53
Female
Male
Fr53 + Fr53
Fr53 complex
Fr53 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
5.0e+6
4.0e+6
3.0e+6
2.0e+6
1.0e+6
0.0
Upper complex
Lower complex
C
Fr110
Female
Male
Fr110 + Fr110
Fr110 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
1.0e+6
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0
Females
Males

Figure 2

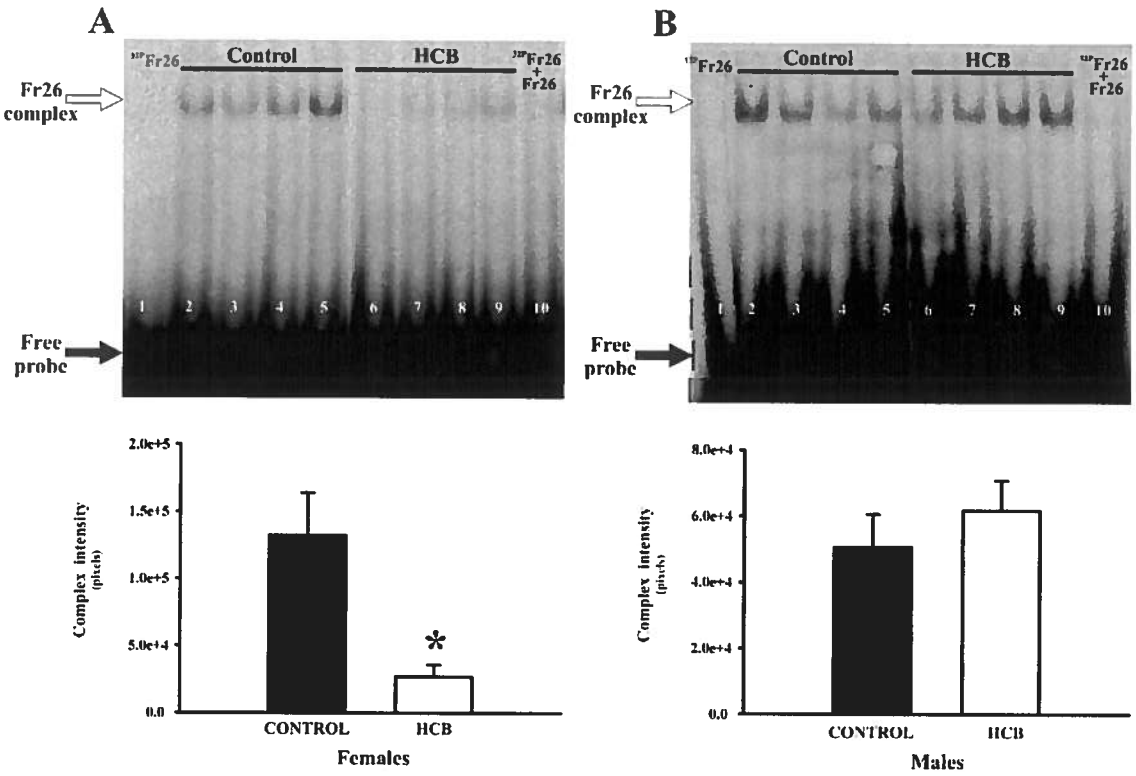

A
B
Control
HCB
Fr26 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
2.0e+5
1.5e+5
1.0e+5
5.0e+4
0.0
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
CONTROL
HCB
Females
Males

Figure 3

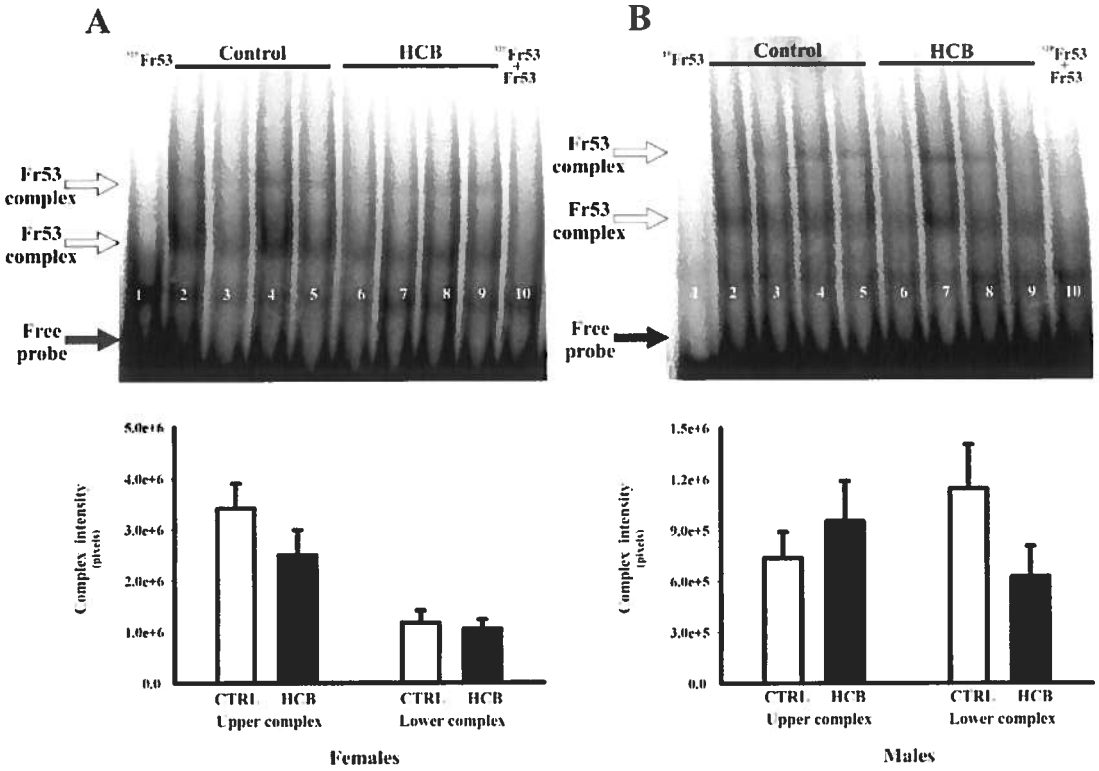

A
B
Control
HCB
Fr53
Fr53 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
CTRL
HCB
Upper complex
Lower complex
Females
Males

Figure 4

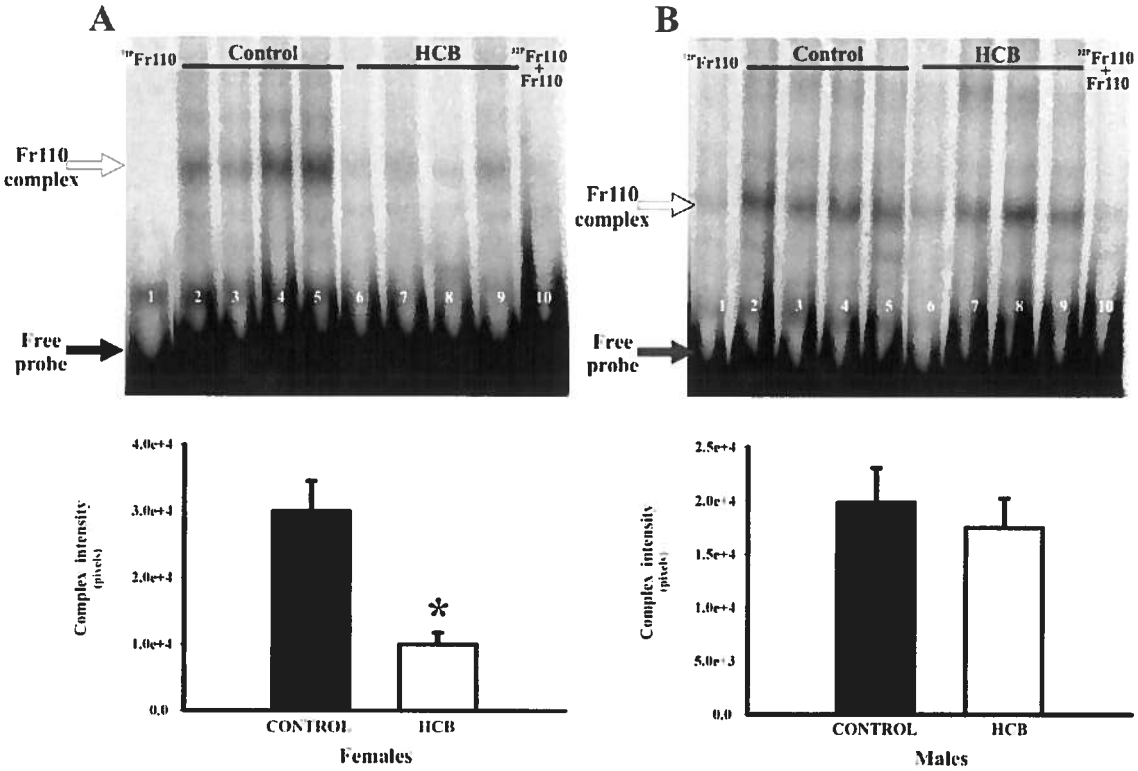

A
B
Control
HCB
Fr110
Fr110 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Complex intensity (pixels)
4.0e+4
3.0e+4
2.0e+4
1.0e+4
0.0
2.5e+4
1.5e+4
5.0e+3
*
CONTROL
HCB
Females
Males

Figure 5

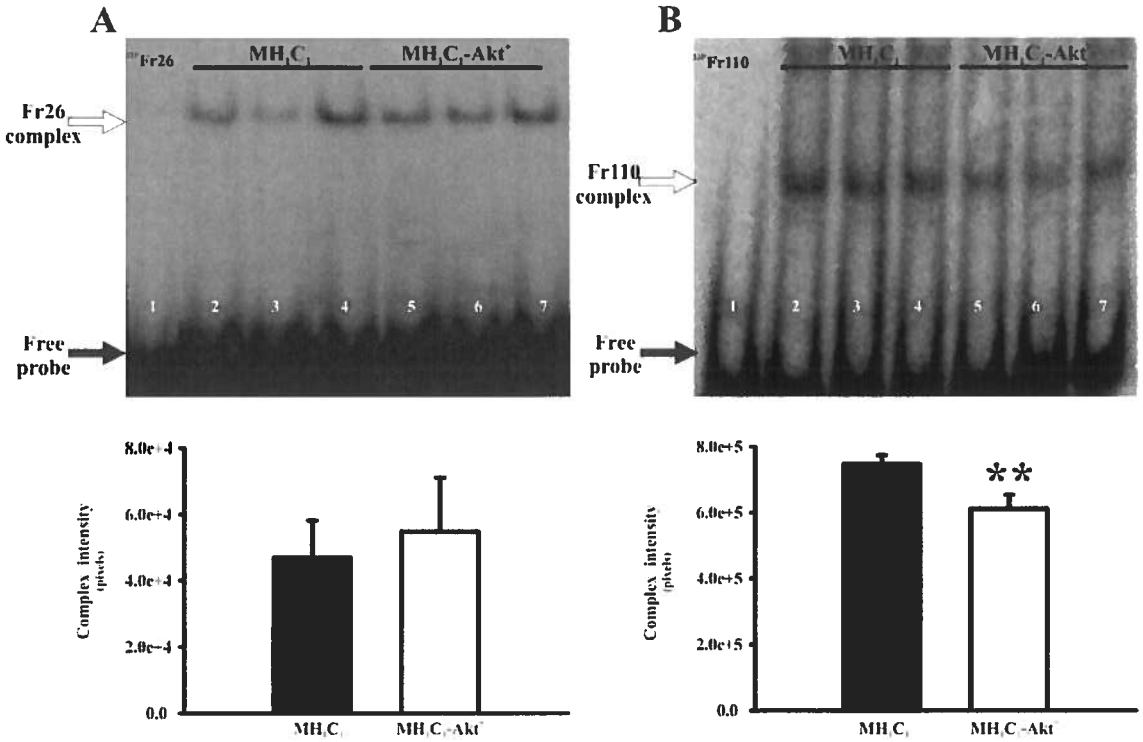

A
Fr26
MH1C1
MH1C1-Akt+
Fr26 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7
B
Fr110
MH1C1
MH1C1-Akt+
Fr110 complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7
Complex intensity (pixels)
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
MH1C1
MH1C1-Akt+
Complex intensity (pixels)
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0
**
MH1C1
MH1C1-Akt+

Figure 6

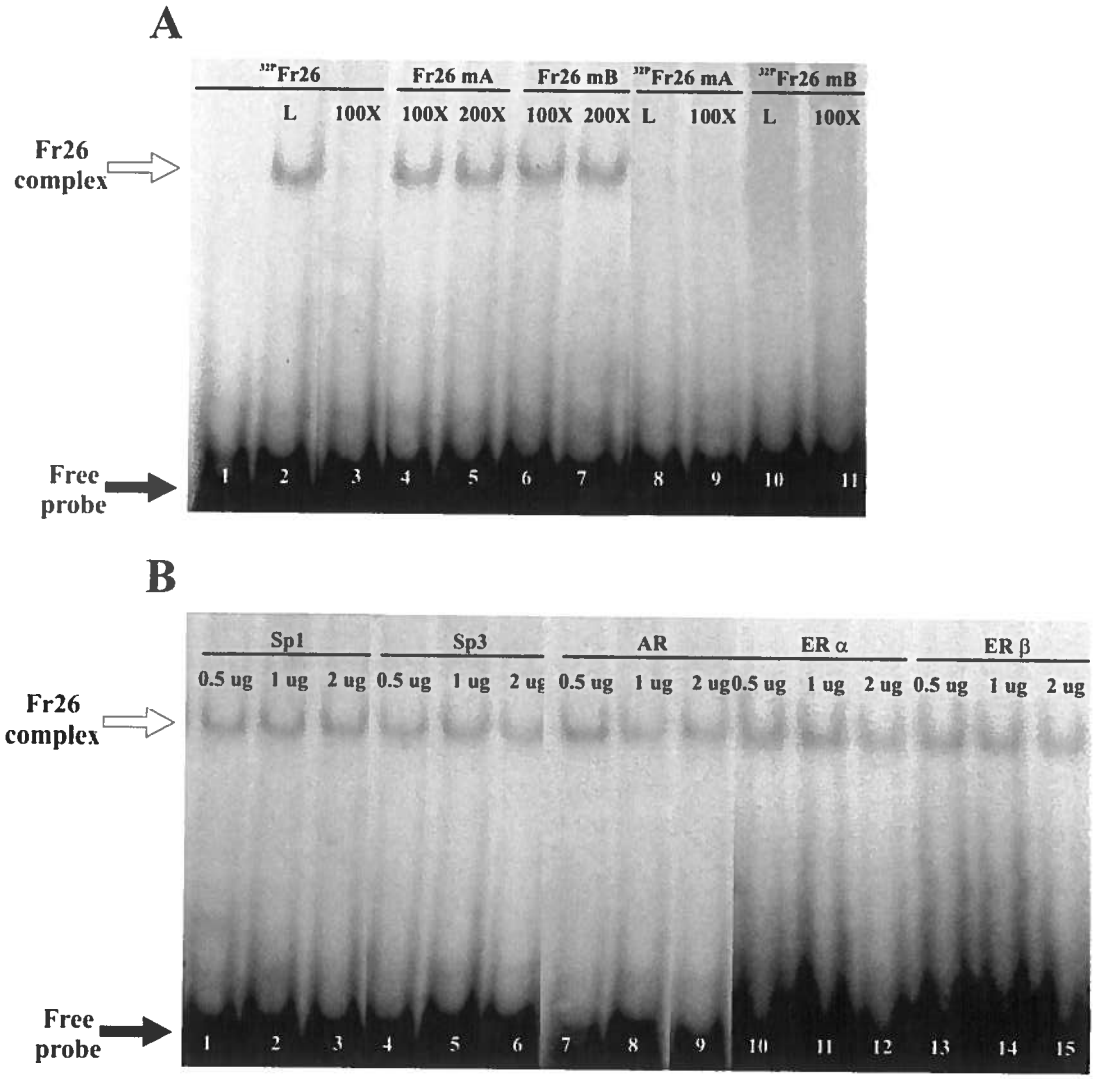

A
32P Fr26
Fr26 mA
Fr26 mB
32P Fr26 mA
32P Fr26 mB
L
100X
100X
200X
100X
200X
L
100X
L
100X
Fr26 complex
Free probe
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
B
Sp1
Sp3
AR
ER α
ER β
0.5 ug
1 ug
2 ug
0.5 ug
1 ug
2 ug
0.5 ug
1 ug
2 ug
0.5 ug
1 ug
2 ug
0.5 ug
1 ug
2 ug
Fr26 complex
Free probe
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Figure 7

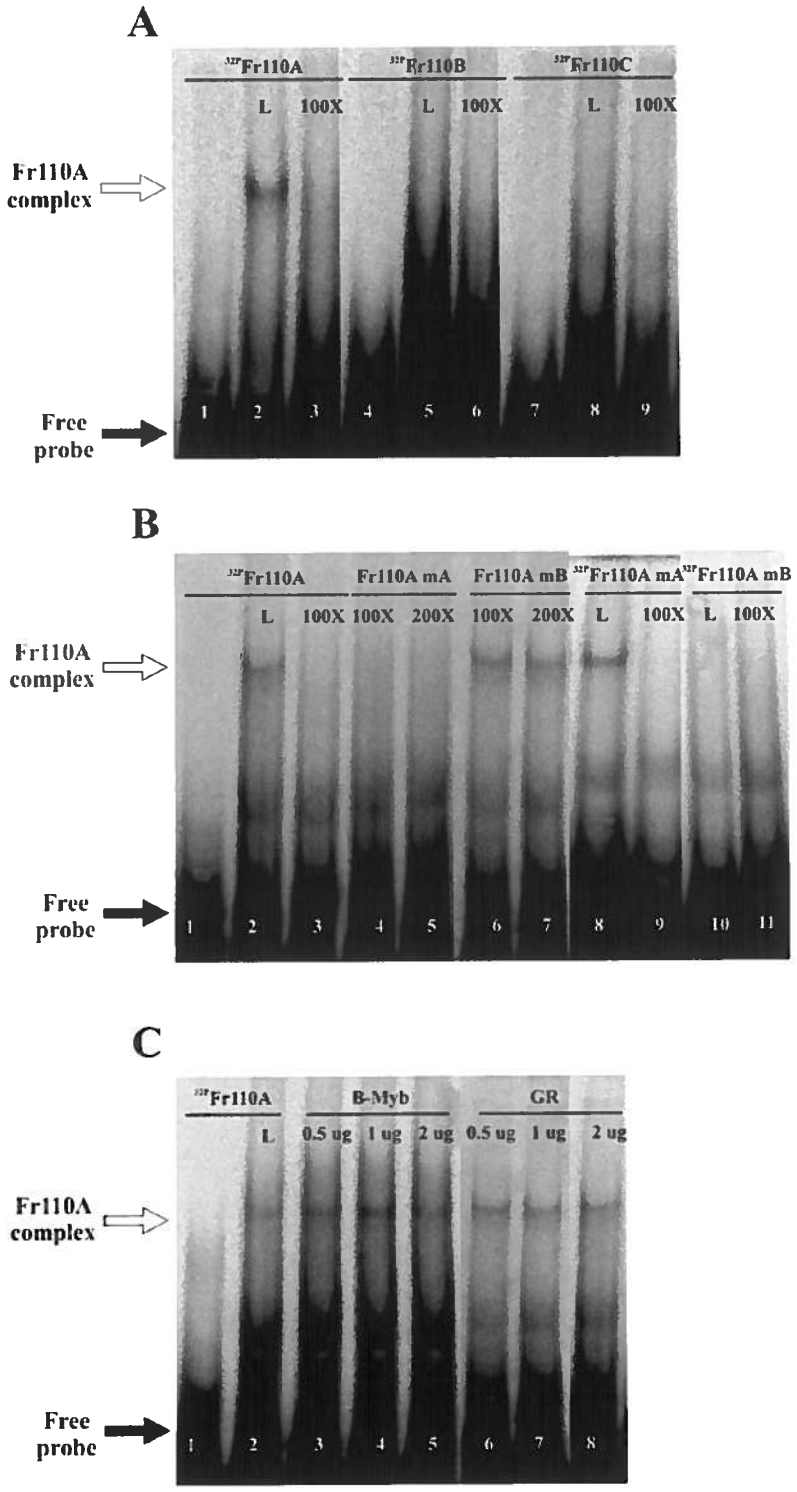
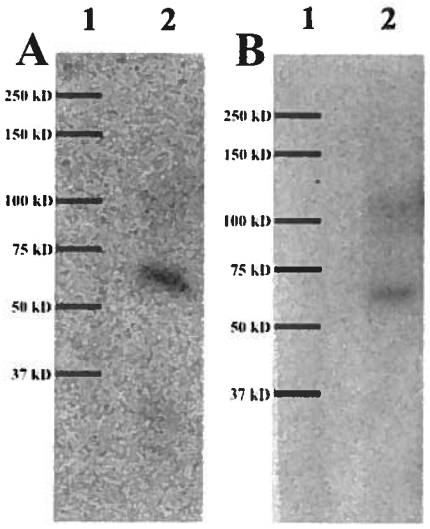

A
32P Fr110A
32P Fr110B
32P Fr110C
L
100X
Fr110A complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9
B
32P Fr110A
Fr110A mA
Fr110A mB
32P Fr110A mA
32P Fr110A mB
L
100X
100X
200X
100X
200X
L
100X
L
100X
Fr110A complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
C
32P Fr110A
B-Myb
GR
L
0.5 ug
1 ug
2 ug
0.5 ug
1 ug
2 ug
Fr110A complex
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8

Figure 8


A
1
2
250 kD
150 kD
100 kD
75 kD
50 kD
37 kD
B
1
2
250 kD
150 kD
100 kD
75 kD
50 kD
37 kD

TROISIÈME PARTIE:

DISCUSSION ET CONLUSIONS

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos travaux antérieurs ont démontré que l'HCB est un cancérigène épigénétique environnemental qui favorise le développement de tumeurs hépatiques chez les rats femelles en inhibant la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires. Cette baisse de communication est engendrée par une diminution de l'expression des connexines qui composent les jonctions lacunaires entre les hépatocytes, soit la connexine 26 et la connexine 32. De plus, il existe un dimorphisme sexuel dans la régulation hépatique des connexines : au niveau basal, les femelles ont beaucoup moins de connexine 32 que les mâles, mais plus de connexine 26. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation des protéines des jonctions lacunaires sont peu connus, tant au niveau de leur régulation « normale » que lors d'une baisse engendrée par des perturbateurs. Le principal objectif de cette étude était de mieux comprendre la régulation hépatique de la connexine 32, la connexine la plus importante dans les hépatocytes, en identifiant une voie de signalisation activée par l'HCB dans le foie des rats femelles et en étudiant la régulation transcriptionnelle de cette protéine.

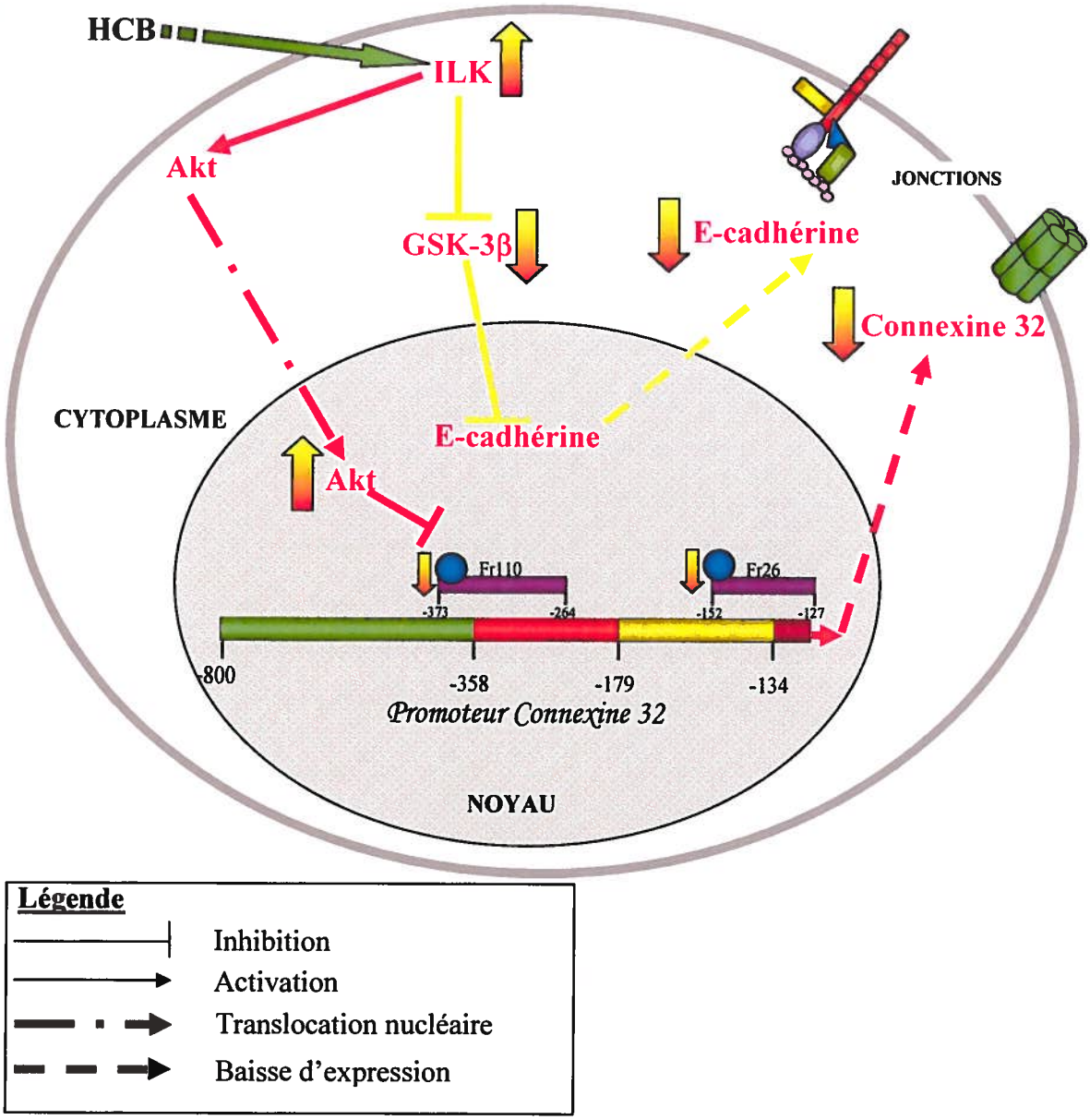
Les trois articles présentés dans le cadre de cette thèse amènent individuellement différents éléments de réponses à cette grande question. Puisque les résultats et les conclusions de ces articles ont déjà été discutés dans la deuxième partie de cette thèse, ces éléments ne seront pas repris. Cependant, ensembles, ces trois articles amènent de nouvelles connaissances dans trois domaines scientifiques, soit la régulation des protéines jonctionnelles, la cancérogenèse et la toxicité de l'HCB. Ce sont ces contributions communes et globales à la science qui seront discutées dans cette troisième partie.

Mécanisme de l'hépatocancérogenèse induite par l'HCB chez les rats femelles

Tout d'abord, les résultats combinés des expériences réalisées dans le cadre de ce projet de doctorat nous permettent de proposer un mécanisme d'action de l'HCB dans le foie des rats femelles (Figure 10). Lors d'une exposition à l'HCB, la voie de l'ILK est activée uniquement chez les rats femelles ; cette activation se traduit par une augmentation du niveau de l'ILK. L'ILK phosphoryle alors la protéine Akt, ce qui l'active. Une fois activée, la protéine Akt transloque dans le noyau des hépatocytes, où elle peut soit former un complexe avec un facteur de transcription ou le phosphoryler, ce qui en empêche la

liaison au promoteur de la connexine 32 (Fr110). Il est à noter qu'un autre facteur de transcription se liant à une partie basale du promoteur (Fr26) est également inhibé lors de l'exposition à l'HCB, mais par un mécanisme indépendant de la protéine Akt. La perte de la liaison de ces facteurs inhibe la transcription de la connexine 32 et diminue les niveaux d'ARNm et de protéine dans la cellule. Cette inhibition est d'autant plus importante puisque chez les femelles, les niveaux de connexine 32 sont déjà plus bas que chez les mâles, suite à une liaison moins importante du facteur de transcription au niveau du promoteur basal (Fr26). L'exposition à l'HCB provoque donc un « knockdown » chimique de la connexine 32 chez le rat femelle. Parallèlement, l'activation de la voie de l'ILK par l'HCB résulte en l'inactivation de la GSK3β par phosphorylation. Cette inhibition de la GSK3β amène une baisse de l'expression de la E-cadhérine. Une telle baisse de la E-cadhérine a été associée à une inhibition des jonctions adhérentes et favorise le développement de tumeurs.

Ainsi, deux effecteurs parallèles de la même voie de signalisation, la protéine Akt et la GSK3β, provoquent l'inhibition de deux types de jonctions impliqués dans les interactions cellulaires (Figure 10). Bien que l'implication de la voie de l'ILK dans la régulation des cadhérines soit bien déterminée, son rôle dans la régulation des jonctions lacunaires est peu connu. Une seule autre étude a été publiée lors de la réalisation des expériences présentées dans le premier article et rapporte des résultats similaires (Czyz et al., 2005). Cette étude démontre qu'une perte de fonction de l'intégrine β1 affecte l'expression des connexines dans des cardiomyocytes dérivés de cellules souches, par des voies de signalisation dépendantes de la Wnt et la β-caténine. Ces résultats suggèrent que l'expression des connexines cardiaques, tout comme celles du foie, est inhibée par des mécanismes dépendants des intégrines et appuient nos travaux de recherche. La baisse de l'interaction entre les cellules démontrée par nos travaux favoriserait le développement de la cancérogenèse en inhibant le contrôle des cellules environnantes sur la différentiation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Globalement, les résultats présentés identifient une voie de signalisation impliquée dans la baisse des interactions cellule-cellule, un mécanisme de cancérogenèse fréquent dans différents types de tumeurs.



Légende

- Inhibition
- Activation
- Translocation nucléaire
- Baisse d'expression

Figure 10: Mécanisme d'action de l'hexachlorobenzène dans le foie des rats femelles
L'hexachlorobenzène active la voie de l'ILK. Cette activation se traduit par une augmentation des niveaux d'ILK. L'ILK phosphoryle la Akt, ce qui l'active et permet sa transclocation nucléaire. La présence de la protéine Akt dans le noyau résulte en une baisse de la liaison d'un facteur de transcription sur une portion (Fr110) du promoteur de la connexine 32. La liaison d'un autre facteur dans la portion du promoteur basal (Fr26) est aussi inhibée par l'HCB, mais par des mécanismes inconnus, indépendants de l'action de la protéine Akt. L'inhibition de ces deux facteurs résulte en une baisse de la transcription de la connexine 32 au jour 50 et en une perte subséquente de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires. L'activation de la voie de l'ILK résulte également en une inhibition de la GSK3β. Cette inhibition amène une baisse de transcription de la E-cadhérine au jour 50, perturbant ainsi les jonctions adhérentes.

La voie de l'ILK et la cancérogenèse

Une activation de la voie de l'ILK a été associée à la cancérogenèse, puisque (1) des niveaux élevés de l'ILK ont été observés dans des tumeurs de plusieurs tissus, (2) l'activation de la protéine Akt ainsi que sa translocation nucléaire résultent en une inhibition de l'apoptose, une augmentation de la prolifération cellulaire et favorisent l'angiogenèse, (3) une inactivation de la GSK3β mène à une activation de facteurs de transcription, ce qui module l'expression de certains gènes et (4) une baisse de la E-cadhérine permet aux cellules tumorales d'échapper au contrôle des cellules saines environnantes et favorise le caractère métastasique des cellules (Persad et Dedhar, 2003; Hannigan et al., 2005). Plusieurs expériences *in vitro* impliquant la surexpression ou l'inhibition des différents membres de cette voie de signalisation ont confirmé ces rôles (Oloumi et al., 2004; Troussard et al., 2003; Hannigan et al., 2005).

Nos résultats expérimentaux ont permis de démontrer que la voie de l'ILK est activée par une exposition à l'HCB et ce, uniquement chez les femelles, pas chez les mâles. Puisque les femelles sont plus susceptibles que les mâles au développement de tumeurs suite à une exposition à l'HCB, ces données suggèrent une grande importance de ce mécanisme dans l'hépatocancérogenèse. Cependant, des résultats supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer le rôle de ce mécanisme dans la formation de tumeurs. En effet, puisque les expériences ont été réalisées au jour 50, soit avant la formation des tumeurs, il serait intéressant de vérifier si une surexpression de la voie de l'ILK ou la translocation d'Akt provoquent la formation de tumeurs hépatiques suite à l'injection de DEN. De plus, nos résultats précédents (Plante et al., 2002) démontrent que la baisse de la communication intercellulaire est présente au jour 100, alors que l'HCB a presqu'été complètment éliminé du foie (Larouche, 1993 ; Krishnan et al., 1991) ; ces résultats suggèrent que les changements moléculaires induits par l'HCB peuvent perdurer plusieurs jours après l'exposition à l'HCB. Il est à noter que nos travaux sont les premiers à démontrer l'activation de la voie de l'ILK par un polluant environnemental. Conséquemment, deux questions découlent de ces observations : (1) est-ce que l'activation de la voie de l'ILK est impliquée dans la baisse des connexines dans d'autres tissus que le foie ? ; (2) est-ce qu'il s'agit d'un mécanisme unique à l'HCB, ou si d'autres cancérigènes épigénétiques utilisent le même mécanisme ?

Tel qu'il a été mentionné précédemment, des niveaux élevés d'ILK ont été observés dans des tumeurs de différents types cellulaires, notamment la prostate, les ovaires et les seins (Wu et Dedhar, 2001; Persad et Dedhar, 2003; Hannigan et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'une inhibition des connexines a été observée dans les tumeurs de tous ces tissus : une baisse des connexines 32 et 43 a été observée dans le cancer de la prostate (Habermann et al., 2002; Hossain et al., 1999), une baisse de la connexine 43 dans celui des seins (Shao et al., 2005; Laird et al., 1999) et des ovaires (Umhauer et al., 2000). Ces études suggèrent donc qu'une activation de la voie de l'ILK pourrait être associée à une baisse des connexines dans ces tissus, ce qui en ferait un mécanisme fréquent. Tel qu'il a été mentionné précédemment, une autre étude appuie cette hypothèse, puisque l'expression des connexines cardiaques est aussi inhibée par des mécanismes dépendants des intégrines (Czyz et al., 2005). D'autres travaux sont nécessaires afin de confirmer l'hypothèse d'un mécanisme « universel » impliquant la voie de l'ILK dans la baisse des connexines.

De plus, étant donné la grande quantité de polluants environnementaux ayant des propriétés semblables de promotion de la cancérogenèse, il est probable que la voie de l'ILK soit activée par d'autres cancérigènes épigénétiques. Il a été démontré que certains composés chimiques ayant une structure ou des propriétés chimiques similaires à l'HCB peuvent inhiber la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires ou modifier l'expression des connexines (Ruch et Trosko, 2001; Trosko et Ruch, 1998). C'est le cas, entre autre, des biphényls polychlorés (BPC) (Bager et al., 1994; Kolaja et al., 2000; Wärngärd et al., 1996; Sai et al., 2000). S'il s'avère que ces cancérigènes épigénétiques peuvent inhiber les jonctions lacunaires en activant la voie de l'ILK, la connaissance de ce mécanisme pourrait aider à une meilleure législation et une meilleure prévention des effets néfastes de ces cancérigènes épigénétiques.

Importance du mécanisme présenté dans la législation concernant l'HCB

La dose journalière tolérée (TDI, Tolerable Daily Intake, ou ADI, « Acceptable Daily Intake ») est la quantité maximale d'une substance à laquelle un être humain moyen peut être exposée chaque jour la vie durant, sans qu'il n'y ait de conséquences pour sa santé (Hayes, 2001). Dans le cas d'un cancérigène épigénétique, la valeur de la TDI est

calculée à partir d'un critère mécanistique avec seuil relatif à la promotion (Beck et al., 1996). Le(s) mécanisme(s) de l'hépatocancérogenèse suite à une exposition à l'HCB étai(en)t, jusqu'ici, inconnu. Conséquemment, le risque de cancérogenèse a été calculé à partir d'une approche utilisée pour les composés génotoxiques, soit une régression de l'incidence des tumeurs par rapport à la dose d'exposition chez les rats (Gouvernement du Canada, 1993). Règle générale, la TDI pour la formation de cancers est supérieure si elle repose sur une approche épigénétique, plutôt que sur une approche génotoxique. Nos travaux suggèrent que la législation présente concernant l'HCB est inappropriée puisque la dose acceptable est possiblement trop sévère (TDI plus petite que celle d'une évaluation qui serait basée sur la baisse de connexine 32).

Le mécanisme présenté dans le cadre de la cette thèse offre une opportunité d'effectuer une évaluation épigénétique. En effet, il serait possible de calculer une TDI plus appropriée en exposant des rats à des doses croissantes d'HCB et en utilisant soit la baisse de connexine 32, soit la translocation nucléaire de la protéine Akt ou encore l'augmentation des niveaux d'ILK comme événement épigénétique. D'autre part puisque nous avons démontré que la voie de l'ILK est activée par l'HCB dans les hépatocytes de rat en culture (MH_1C_1), il serait également possible d'utiliser une approche *in vitro* pour évaluer ces paramètres. Si des hépatocytes humains en culture répondent de la même façon, ce modèle permettrait alors une bonne évaluation du potentiel cancérogenèse de l'HCB chez l'humain. Si l'activation de la voie de l'ILK ou la baisse des connexines se révèle un mécanisme de cancérogenèse épigénétique présent dans divers tissus et activé par plusieurs substances, l'utilisation de ces paramètres pourrait amener une réévaluation des TDI et une meilleure légalisation de l'utilisation de ces substances.

Avenues thérapeutiques impliquant la voie de l'ILK

Le mécanisme de cancérogenèse présenté dans le cadre de cette thèse pourrait également mener à de nouvelles stratégies pour des traitements contre le cancer. Tout d'abord, tel qu'il a été mentionné précédemment, les connexines sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs. Il a été démontré que la présence des connexines et que la restauration de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires diminuent le phénotype cancéreux dans de nombreux modèles (Hirschi et al., 1996; Fujimoto et al.,

2005b; King et Lampe, 2004b; Tanaka et Grossman, 2004). Ainsi, des molécules chimiques pouvant rétablir la communication par les jonctions lacunaires pourraient aider à ralentir le processus de cancérogenèse. Cette avenue a été envisagée au cours des dernières années. Il a été démontré que le Resveratrol, un polyphénol présent dans le vin, les raisins et différents fruits et légumes peut rétablir la communication par les jonctions lacunaires dans des cellules épithéliales de foie de rat traitées avec des agents cancéreux (Nielsen et al., 2000). De même, deux études différentes ont démontré des effets semblables pour des molécules présentes dans le thé vert (Kang et al., 2000; Sai et al., 2000). Ces études suggèrent que l'utilisation de molécules naturelles ou de molécules synthétiques dérivées de ces substances pourrait ralentir la progression des tumeurs en rétablissant la communication entre les cellules. Cependant, le mécanisme de cancérogenèse présenté dans le cadre de cette étude suggère qu'il serait possible, et probablement plus simple d'un point de vue pharmaceutique, d'obtenir les mêmes résultats en inhibant la voie de l'ILK, ou des certains de ces effecteurs.

Tout d'abord, il a été suggéré que des inhibiteurs de la voie de l'ILK pourraient être utilisés dans une thérapie contre le cancer (Hannigan et al., 2005; Yoganathan et al., 2002). Peu d'inhibiteurs spécifiques d'ILK ont été identifiés jusqu'à maintenant. Cependant, il a été démontré qu'une exposition à une classe de molécules (KP-SD-1 et KP-392) peut inhiber spécifiquement l'activité de l'ILK, ce qui résulte en une baisse de la croissance de cellules cancéreuses en culture et lors de xénogreffes dans des souris immunodéficientes (Tan et al., 2004; Tan et al., 2001; Persad et al., 2001). Ces études ont démontré qu'une exposition à ces substances résulte en une inhibition de la cycline D1 et de la prolifération cellulaire, ainsi qu'en une inhibition de la capacité métastatique des cellules. De plus, il a été démontré que l'inactivation d'ILK par des inhibiteurs spécifiques amène une inhibition de l'activation de la protéine Akt et de ses effets sur la survie cellulaire et sur l'angiogenèse.

L'inactivation de la protéine Akt a aussi été envisagée dans la lutte contre le cancer (Hanada et al., 2004; Luo et al., 2005). Cependant, jusqu'à récemment, aucun inhibiteur spécifique de la protéine Akt n'était identifié. Des inhibiteurs de la PI3K tel que la Wortmannine et le LY-294002 résultent en une inhibition de l'activation de la protéine Akt et en une augmentation de l'apoptose, mais ces molécules agissent

également sur d'autres kinases qui sont également contrôlées par la voie PI3K, tel que la PKC ou la SGK («serum- and glucocorticoid-induced kinase») (Cheng et al., 2005; Brognard et al., 2001). Plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont lancées dans la course pour développer une molécule pouvant être utilisée dans des recherches cliniques, et récemment, des inhibiteurs spécifiques de la protéine Akt ont été découverts et se sont révélés efficaces pour rétablir l'apoptose dans différents types cellulaires (Kumar et Madison, 2005; Lindsley et al., 2005). Cependant, aucun essai clinique n'a encore été rapporté, ni d'essais *in vivo* sur des animaux.

Le rôle de la protéine Akt dans la cancérogenèse est de plus en plus reconnu. Récemment, il a été suggéré que sa translocation nucléaire est plus particulièrement importante dans le cancer (Vasko et al., 2004; Saji et al., 2005; Van de Sande et al., 2005). Il est à noter que les résultats présentés dans le cadre de notre étude sont les premiers à démontrer un rôle de la protéine Akt nucléaire dans la régulation transcriptionnelle d'une protéine. De plus, lors de l'exposition à l'HCB, les niveaux nucléaire de la protéine Akt étaient augmentés, ce qui supporte un rôle potentiel de la translocation nucléaire dans la cancérogenèse (Plante et al., 2005).

La baisse de la connexine 32, la translocation nucléaire de la protéine Akt ou encore l'augmentation du niveau de l'ILK pourraient servir de marqueurs précoces de l'hépatocancérogenèse. En effet, puisque que nos expériences ont été réalisées avant l'injection de l'initiateur de tumeurs, selon le modèle ABC, et donc avant la formation de tumeurs (Larouche,1993; Krishnan et al., 1991), les résultats suggèrent que l'activation de voies de signalisation inhibant l'expression des connexines et de la E-cadhérine hépatiques est un événement précoce lors de la cancérogenèse (Larouche, 1993; Krishnan et al., 1991; Plante et al., 2002). Ces études démontrent bien que l'utilisation d'inhibiteurs de la protéine Akt ou de l'ILK est une avenue prometteuse dans le traitement du cancer.

Perspectives d'études découlant de ces résultats

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse identifie une voie de signalisation impliquée dans la cancérogenèse hépatique, allant des effets dans le cytoplasme jusqu'au niveau de la liaison de facteurs de transcription sur la promoteur d'une protéine cible.

Cependant, ils soulèvent également quelques questions qui pourraient être étudiée ultérieurement.

Les récepteurs impliqués dans l'activation de la voie de l'ILK par l'HCB

La voie de l'ILK peut être activée par différents récepteurs membranaires. Par exemple, lors de sa découverte, l'ILK a été identifiée comme une kinase interagissant avec la sous-unité cytoplasmique de l'intégrine β1 (Hannigan et al., 1996). Tel qu'il a été mentionné précédemment, les intégrines forment une famille de récepteurs hétérodimériques à la surface des cellules répondant aux molécules de la matrice extracellulaire (Hynes, 2002). Environ huit sous-unités β et dix-huit sous-unités α ont été identifiés jusqu'à maintenant, formant vingt-quatre intégrines distinctes (Taddei et al., 2003). Chacune des sous-unités est composée d'un large domaine extracellulaire, d'un segment transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique court (sauf la β4 qui possède un long domaine cytoplasmique) (Hynes, 2002). Dans le foie, les intégrines β1α1, β1α2 et β1α5 ont été identifiées (vom Dahl et al., 2003; Yuan et al., 2000; Pinkse et al., 2004). Il serait donc opportun de vérifier si l'HCB active les intégrines directement.

Il a été démontré que les intégrines peuvent interagir avec le récepteur du facteur de croissance épithéliale (EGFR) dans les processus de prolifération et de survie cellulaire. En effet, l'inhibition soit du EGFR ou de l'intégrine β1, dans des cellules de tumeur en croissance sur du Matrigel, résulte en une cessation de la prolifération cellulaire et en la restauration d'une morphogenèse normale (Wang et al., 1998; Wang et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus en inhibant les MAPK ou la PI3K, pouvant toutes être activées par l'un ou l'autre de ces récepteurs. Plus encore, une inhibition de la sous-unité β1 résulte en une baisse des niveaux du EGFR (Reginato et al., 2003). De même, un blocage de la sous-unité β1 empêche l'activation de la p38 MAPK par le facteur de croissance de transformation-β (TGF-β) (Bhowmick et al., 2001). Une surexpression de l'intégrine α5β1 résulte également en une augmentation de l'expression du récepteur au TGF-β de type II (Wang et al., 1999). Il a finalement été suggéré qu'une stimulation par l'EGF peut activer l'ILK via le EGFR (Mongroo et al., 2004). Ces résultats suggèrent un rôle important du EGFR dans l'activation de l'ILK, et en fait également une cible potentielle expliquant les effets de l'HCB.

Il a été démontré qu'une exposition à l'HCB diminue la liaison de l'EGF à son récepteur, diminue les niveaux du EGFR à la membrane plasmique des hépatocytes, mais augmente les niveaux dans les microsomes, et provoque une augmentation dose-dépendante de l'activité de la tyrosine kinase liée au EGRF (Randi et al., 1998; Randi et al., 2003). Ces résultats suggèrent que l'HCB active le EGFR, provoquant ainsi son internalisation. Des études plus récentes réalisées par cette même équipe démontrent que l'HCB peut également stimuler les récepteurs de l'insuline et du récepteur au facteurs de croissance similaires à l'insuline de type I (« inslulin-like growth factor », IGF-IR) dans les glandes mammaires de rats (Randi et al., 2006). Finalement, des résultats réalisés dans notre laboratoire démontrent que l'HCB peut stimuler le récepteur de l'EGF dans les cellules mammaires ce qui résulte en une augmentation de l'expression de l'ILK et une baisse de E-cadhérine (Girard, 2003). Tous ces résultats appuient l'implication possible du EGFR dans l'activation de la voie de l'ILK par l'HCB dans les hépatocytes de rats.

Le rôle de Snail dans l'inhibition de la E-cadhérine

Lorsque notre étude a débuté, il était admis que l'inactivation de la GSK3β lors de l'activation de la voie de l'ILK résultait en une baisse de la transcription de la E-cadhérine par la liaison du complexe β-caténine/TCF sur son promoteur (Novak et al., 1998). Cependant, des études récentes ont suggéré que l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine serait plutôt due à l'activation du facteur de transcription Snail engendrée par l'inactivation de la GSK3β dans des cellules épithéliales mammaires et de peau normales, et dans des cellules embryonnaires de rein (Zhou et al., 2004; Bachelder et al., 2005). Nos résultats expérimentaux ont démontré que, bien que les niveaux de la E-cadhérine soit plus bas chez les femelles traitées à l'HCB (Figure 6, article 1), ni la protéine ni le transcrit de Snail ne sont présents dans le foie des femelles témoins ou traitées à l'HCB (Figure 5, article 1). Ces résultats soulèvent deux hypothèses : l'inhibition de la E-cadhérine se fait soit (1) par un autre membre de la famille de Snail dans le foie, soit (2) par un autre effecteur contrôlé par la GSK3β. Le rôle de Snail dans la régulation de la E-cadhérine n'a jamais été démontré dans le foie ; il est possible que la régulation de E-cadhérine soit différente selon les tissus. Il a été démontré que la protéine Slug, un autre membre de la famille de Snail, peut inhiber l'expression de la E-cadhérine dans l'ovaire

et les cellules mammaires (Kurrey et al., 2005; Hajra et al., 2002). Cependant, l'implication de la GSK3β dans le contrôle de Slug demeure inconnue.

Il est également possible que l'inhibition de la E-cadhérine hépatique soit indépendante des membres de la famille de Snail. Les résultats *in vitro* obtenus dans le cadre de ce projet confirment que l'inhibition de la GSK3β est impliquée dans la baisse d'expression de la E-cadhérine dans le foie (Figure 11, article 1). Conséquemment, l'implication du complexe β-caténine/TCF dans la régulation de la E-cadhérine ne peut pas être réfutée dans le cadre de nos travaux. Le facteur de transcription modulé par l'inactivation de la GSK3β et impliqué dans la régulation hépatique de la E-cadhérine reste encore à déterminer.

Identification des facteurs de transcription

Les analyses transcriptionnelles réalisées dans le cadre de ces travaux de doctorat ont été basées majoritairement sur les travaux de l'équipe de Stephen D. Minchin. Les membres de ce laboratoire ont identifié dans le promoteur de la connexine 32 des régions importantes pour sa transcription dans le foie de rat (Morsi et al., 2003; Field et al., 2003). Nos analyses EMSA ont été réalisées à l'aide des quatre différentes parties du promoteur identifiées par cette équipe (Fr26, Fr53, Fr70 et Fr110). Il est à noter que les essais impliquant le fragment Fr70 n'ont pas permis d'identifier de liaison spécifique entre les protéines nucléaires et cette portion du promoteur. Il est peu probable que cette différence provienne d'un aspect technique EMSA puisque le protocole utilisé est identique à celui de l'équipe de Minchin. Les extraits nucléaires provenaient cependant de lignées différentes de rats (Sprague-Dawley pour nos expériences, et Wistar dans le cas de Minchin). L'écart entre nos résultats et ceux de l'équipe de Minchin pour le Fr70 ne peut donc pas être expliqué.

Les EMSA permettent de déterminer si des facteurs de transcription, compris dans l'extrait de protéines nucléaires, se lient à différentes portions du promoteur. Toutefois, elles ne permettent pas d'identifier ces facteurs ; d'autres analyses, soit des « supershifts » ou des analyses à l'aide de sondes mutées sont nécessaires pour identifier ces facteurs. Lors de nos analyses, deux facteurs de transcription ont varié avec les traitements (dont un est partiellement régulé par la protéine Akt, et l'autre est impliqué dans le

dimorphisme sexuel). L'identité de ces facteurs de transcription demeure inconnue pour l'instant. En effet, bien qu'un site YY1 a été identifié dans la région Fr110 du promoteur et un site Sp1 dans la région Fr26, l'utilisation d'anticorps spécifiques à ces protéines n'a pas mené à la formation de complexes comprenant la sonde marquée liée au facteur de liaison et à l'anticorps (« supershift ») (article 3). Deux raisons principales peuvent expliquer cette absence de formation de complexe.

Tout d'abord, il est possible que la liaison de l'anticorps sur le facteur de transcription empêche sa liaison à l'ADN. En effet, dans certaines situations, la liaison de l'anticorps peut : (1) modifier la structure tridimensionnelle de la protéine et changer ainsi le site de liaison à l'ADN ; (2) bloquer le site de liaison de la protéine à l'ADN ; ou encore (3) créer un encombrement et nuire à la liaison à l'ADN (Sambrook et Russell, 2001). Toutes ces situations vont modifier la liaison du facteur de transcription à l'ADN, et empêcher la formation du complexe. Cependant, dans la plupart des cas, ces situations vont provoquer la disparition de la bande, ou du moins une baisse de son intensité, phénomène que nous n'avons pas observé.

L'autre raison pouvant expliquer l'absence de complexe est que le facteur de transcription lié à la sonde marquée soit un autre facteur que celui visé par l'anticorps. Cette deuxième hypothèse est la plus probable. Étant donné la longueur des sondes utilisées (26 et 110 paires de bases), plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription connus sont présents. Par exemple, pour le fragment 110, des sites pour les facteurs c-myb, NF-1 (« nuclear factor-1 »), HNF-1 (« hepatocyte nuclear factor-1 ») et Sp1 ont été identifiés et pourraient être impliqués dans la régulation de la connexine 32. Il est intéressant de noter que la régulation de deux de ces facteurs, c-myb et Sp1, a été associée à une activation de la protéine Akt (Pore et al., 2004; Lauder et al., 2001; Tanno et al., 2002). De plus, le facteur HNF-1 fait partie de la famille des facteurs de transcription « forkhead » (Piechocki et al., 2000). Il a été démontré que la protéine Akt peut phosphoryler Foxa-2, aussi connu sous le nom de HNF-3β (« hepatocyte nuclear factor-3β »), un autre membre de la famille des « forkhead » (Wolfrum et al., 2003).

Dans le cas du fragment Fr26, bien que cette séquence soit plus courte, il comporte également plusieurs autres sites de liaison possible pour des facteurs de transcription connus. Nos résultats antérieurs ont démontré que les mâles ont plus de

connexine 32 que les femelles. Conséquemment, il est intéressant de noter que l'un des sites identifiés sur le Fr26 correspond à SRY, un facteur relié à la régulation de gènes chez le mâle. Bien que son implication semble être importante lors de la différentiation sexuelle, il est possible que ce facteur puisse être responsable de la différence d'expression de la connexine 32. Par ailleurs, lorsque les femelles étaient ovariectomisées, les niveaux de connexine 32 devenaient alors presque similaires à ceux des mâles, ce qui suggère plutôt un mécanisme impliquant les hormones femelles (Plante et al., 2002). Ces observations suggèrent qu'une hormone sexuelle est impliquée dans la régulation de la connexine 32, mais son identité demeure inconnue.

D'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer que l'un ou l'autre de ces facteurs se lie dans les portions Fr26 et Fr110 du promoteur de la connexine 32. Cependant, l'identification de ces facteurs permettrait de mieux comprendre le rôle de la protéine Akt dans l'inhibition de l'expression de la connexine 32, ainsi que le dimorphisme sexuel observé.

L'implication de la connexine 26

Tel qu'il est mentionné dans l'introduction, deux connexines forment les jonctions lacunaires dans les hépatocytes de rat, la connexine 32 et la connexine 26. Cette thèse porte uniquement sur la connexine 32, puisque plusieurs études démontrent son importance dans l'hépatocancérogenèse (voir section 1.3). Cependant, nos résultats antérieurs démontrent que l'HCB inhibe également l'expression de la connexine 26 dans le foie des femelles. Un autre point soulevé par ces travaux de recherche est l'implication et la régulation de l'autre connexine hépatique, la connexine 26. Bien que son implication semble moins importante dans la cancérogenèse hépatique, l'inhibition de la connexine 26 par l'HCB peut également favoriser le développement de tumeurs hépatiques chez les rats femelles et être influencée par l'activation de la voie de l'ILK (Plante et al., 2002). Tel qu'il a été mentionné dans la première partie de cette thèse, les souris déficientes en connexine 26 meurent au stade embryonnaire, ce qui empêche l'étude de l'hépatocancérogenèse chez ces animaux (Willecke et al., 2002). Les souris Cx32 KO, quant à elles, démontrent également des niveaux plus bas de connexine 26, ce qui suggèrent que la connexine 32 influence l'expression de la connexine 26 dans le foie

(Temme et al., 2000). Ainsi, il est possible que la baisse d'expression de la connexine 26 observée chez les femelles traitées à l'HCB soit due : (1) à la perte de la connexine 32, (2) à l'activation de la voie de l'ILK, ou (3) à une autre voie de signalisation activée (ou inactivée) parallèlement par l'HCB. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour discriminer entre ces différentes possibilités.

Conclusion générale

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont permis de démontrer qu'une exposition à l'HCB active la voie de signalisation de l'ILK uniquement chez les rats femelles. Cette voie de signalisation résulte en l'inhibition de deux types de jonctions intercellulaires, soit les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes, via deux effecteurs parallèles différents. La baisse d'expression de la connexine 32 est engendrée par une liaison moins importante de deux facteurs de transcription sur son promoteur, dont un est contrôlé par la translocation nucléaire de la protéine Akt. L'autre facteur de transcription est également impliqué dans le dimorphisme sexuel observé au niveau basal dans le foie des rats. Ces travaux présentent donc un nouveau mécanisme pouvant expliquer à la fois une baisse de la connexine 32 et de la E-cadhérine lors de la cancérogenèse. De plus, comme cette baisse des protéines jonctionnelles et que l'activation de la voie de l'ILK ont souvent été observées dans des tumeurs de nombreux tissus, ces résultats suggèrent que ce mécanisme pourrait être présent lors de la cancérogenèse dans des tissus autre que le foie. Finalement, les résultats présentés proposent une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans la lutte contre le cancer.

CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les travaux présentés dans le cadre de ce projet de doctorat contribuent à l'avancement des connaissances à plusieurs niveaux. Tout d'abord, dans le domaine des interactions cellulaires, ils ont permis l'identification d'une voie de signalisation permettant d'expliquer la baisse concomitante des connexines et de la E-cadhérine dans de nombreux processus. Ils supportent également la thèse de l'interaction entre les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes dans le foie. Deuxièmement, ils ont permis de mieux comprendre la régulation de la connexine 32 en identifiant à la fois l'implication nouvelle de la voie de l'ILK dans sa régulation, et plus particulièrement de la protéine Akt, mais également en identifiant la région du promoteur impliquée cette régulation. Un mécanisme de régulation a ainsi été identifié, allant d'effecteurs cytoplasmiques jusqu'à un facteur de transcription impliqué dans la baisse de l'expression de la protéine. Finalement, l'étude transcriptionnelle a permis de déterminer que le dimorphisme sexuel observé au niveau hépatique est influencé par la liaison d'un facteur de transcription dans la partie basale du promoteur de la connexine 32.

Une importante contribution est aussi faite dans le domaine de la cancérogenèse, plus particulièrement celle induite par l'HCB. Les résultats permettent de mieux comprendre l'effet hépatique de l'HCB et d'identifier un mécanisme d'action prédisposant les rats femelles à la cancérogenèse. Ils proposent également une voie de signalisation pouvant être importante dans d'autres tissus et/ou par d'autres polluants, puisqu'une activation de la voie de l'ILK est présente dans différents tissus, de même que l'inhibition des interactions cellulaires. Finalement, ils identifient deux régions du promoteur de la connexine 32 susceptibles d'être impliquées dans l'hépatocancérogenèse induite par d'autres stimuli.

De façon plus générale, les travaux de recherche ont permis la mise au point d'une nouvelle méthode pour quantifier la translocation nucléaire de protéines par cytométrie en flux. Ils apportent également un nouveau rôle nucléaire pour la protéine Akt et appuient la théorie récente du rôle de sa localisation cellulaire dans la cancérogenèse. En conclusion, en utilisant une grande variété de techniques de biologie moléculaire, les travaux ont permis de comprendre par des approches *in vitro* les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse hépatique induite par l'HCB *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMS, C. K., S. Oh, Y. Ri et T. A. Bargiello. 2000. "Mutations in connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X- linked form of Charcot-Marie-Tooth disease". Brain Research. Brain Research Reviews, vol. 32, p. 203-14.

AHMED, N., C. Riley, K. Oliva, E. Stutt, G. E Rice et M. A Quinn. 2003. "Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid". Journal of Pathology, vol. 201, p. 229-37.

ANDJELKOVIC, M., D. R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N. J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J. M. Lucocq et B. A. Hemmings. 1997. "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 31515-24.

ANDO, M., S. Hirano et Y. Itoh. 1985. "Transfert of Hexachlorobenzene (HCB) from Mother to New-born Baby through Placenta and Milk". Archives of Toxicology, vol. 56, p. 195-200.

ARAVINDAKSHAN, J. et D. G. Cyr. 2005. "Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway". Biology of Reproduction, vol. 72, p. 1232-40.

ARNOLD, D. L., C. A. Moodie, S. M. Charbonneau, H. C. Grice, P. F. McGuire, F. R. Bryce, B. T. Collins, Z. Z. Zawidzka, D. R. Krewski, E. A. Nera et a. l. et. 1985. "Long-term toxicity of hexachlorobenzene in the rat and the effect of dietary vitamin A". Food and Chemical Toxicology, vol. 23, p. 779-93.

BACHELDER, R. E., S. O. Yoon, C. Franci, A. G. de Herreros et A. M. Mercurio. 2005. "Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition". Journal of Cell Biology, vol. 168, p. 29-33.

BAGER, Y., K. Kenne, V. Krutovskikh, M. Mesnil, O. Traub et L. Wärngard. 1994. "Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3'4'-pentachlorobiphenyl". Carcinogenesis, vol. 15, p. 2439-2443.

BAI, S., A. Schoenfeld, A. Pietrangelo et R. D. Burk. 1995. "Basal promoter of the rat connexin 32 gene: identification and characterization of an essential element and its DNA-binding protein". Molecular and Cellular Biology, vol. 15, p. 1439-45.

BAI, S., D. C. Spray et R. D. Burk. 1993. "Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1216, p. 197-204.

BARBER, J. L., A. J. Sweetman, D. van Wijk et K. C. Jones. 2005. "Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes". Science of the Total Environment, vol. 349, p. 1-44.

BEAVON, I. R. 2000. "The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation". European Journal of Cancer, vol. 36, p. 1607-20.

BECK, B. D., T.M. Slayton, E.J. Calabrese, L. Baldwin, et R. Rudel. 2001. Principles and Mehtods of Toxicology. The Use of Toxicology in the Regulatory Process. A. Wallace Hayes, Boston, Massachussetts, Taylor & Francis.

BECKER, D. L., J. E. Cook, C. S. Davies, W. H. Evans et R. G. Gourdie. 1998. "Expression of major gap junction connexin types in the working myocardium of eight chordates". Cell Biology International, vol. 22, p. 527-43.

BELLUARDO, N., A. Trovato-Salinaro, G. Mudo, Y. L. Hurd et D. F. Condorelli. 1999. "Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene". Journal of Neuroscience Research, vol. 57, p. 740-52.

BHOWMICK, N. A., R. Zent, M. Ghiassi, M. McDonnell et H. L. Moses. 2001. "Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 46707-13.

BRADY, M. N. et D. S. Siyali. 1972. "Hexachlorobenzene in human body fat". Medical Journal of Australia, vol. 1, p. 158-61.

BRAZIL, D. P. et B. A. Hemmings. 2001. "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow". Trends in Biochemical Sciences, vol. 26, p. 657-64.

BRAZIL, D. P., Z. Z. Yang et B. A. Hemmings. 2004. "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts". Trends in Biochemical Sciences, vol. 29, p. 233-42.

BROGNARD, J., A. S. Clark, Y. Ni et P. A. Dennis. 2001. "Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation". Cancer Research, vol. 61, p. 3986-97.

BUDUNOVA, I. V., S. Carbajal et T. J. Slaga. 1996. "Effect of diverse tumor promoters on the expression of gap-junctional proteins connexin (Cx)26, Cx31.1, and Cx43 in SENCAR mouse epidermis". Molecular Carcinogenesis, vol. 15, p. 202-14.

BUTTERWECK, A., C. Elfgang, K. Willecke et O. Traub. 1994. "Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin". European Journal of Cell Biology, vol. 65, p. 152-63.

CABRAL, J. R., T. Mollner, F. Raitano et P. Shubik. 1979. "Carcinogenesis of hexachlorobenzene in mice". International Journal of Cancer, vol. 23, p. 47-51.

CCREM (CANADIAN COUNCIL OF RESOURCE AND ENVIRONMENTAL MINISTERS).1987. Canadian Water Quality Guidelines of the Canadian Council of Resource and Environement Minister. Ottawa, Ontario, Environmnent Ministers.

CEDAR, H. 1988. "DNA methylation and gene activity". Cell, vol. 53, p. 3-4.

CHANG, M., R. Werner et G. Dahl. 1996. "A role for an inhibitory connexin in testis?". Developmental Biology, vol. 175, p. 50-6.

CHENG, J. Q., C. W. Lindsley, G. Z. Cheng, H. Yang et S. V. Nicosia. 2005. "The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery". Oncogene, vol. 24, p. 7482-92.

CHIPMAN, J. K., A. Mally et G. O. Edwards. 2003. "Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity". Toxicological Sciences, vol. 71, p. 146-53.

CHUNTHAPONG, J., E. A. Seftor, Z. Khalkhali-Ellis, R. E. Seftor, S. Amir, D. M. Lubaroff, P. M. Heidger Jr et M. J. Hendrix. 2004. "Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 91, p. 649-61.

COHEN, P. et S. Frame. 2001. "The renaissance of GSK3". Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 2, p. 769-76.

CONACCI-SORRELL, M., J. Zhurinsky et A. Ben-Ze'ev. 2002. "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer". Journal of Clinical Investigation, vol. 109, p. 987-91.

CONUS, N. M., K. M. Hannan, B. E. Cristiano, B. A. Hemmings et R. B. Pearson. 2002. "Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 38021-8.

COTTRELL, G. T. et J. M. Burt. 2005. "Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1711, p. 126-41.

CROSS, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich et B. A. Hemmings. 1995. "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B". Nature, vol. 378, p. 785-9.

CRUCIANI, V. et S. O. Mikalsen. 2002. "Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases". Biologie Cellulaire, vol. 94, p. 433-43.

CRUCIANI, V. et S. O. Mikalsen. 2006. "The vertebrate connexin family". Cellular and Molecular Life Sciences, vol.

CYR, D. G., L. Hermo et D. W. Laird. 1996. "Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis". Endocrinology, vol. 137, p. 1474-84.

CZYZ, J., K. Guan, Q. Zeng et A. M. Wobus. 2005. "Loss of beta 1 integrin function results in upregulation of connexin expression in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes". International Journal of Developmental Biology, vol. 49, p. 33-41.

DAHL, E., D. Manthey, Y. Chen, H. J. Schwarz, Y. S. Chang, P. A. Lalley, B. J. Nicholson et K. Willecke. 1996. "Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30,a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 17903-10.

DAI, D. L., N. Makretsov, E. I. Campos, C. Huang, Y. Zhou, D. Huntsman, M. Martinka et G. Li. 2003. "Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival". Clinical Cancer Research, vol. 9, p. 4409-14.

DAVIS, L. M., M. E. Rodefeld, K. Green, E. C. Beyer et J. E. Saffitz. 1995. "Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system". Journal of Cardiovascular Electrophysiology, vol. 6, p. 813-22.

DAVIS, L. M., M. E. Rodefeld, K. Green, E. C. Beyer et J. E. Saffitz. 1995. "Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system". Journal of Cardiovascular Electrophysiology, vol. 6, p. 813-22.

DEDHAR, S. 2000. "Cell-substrate interactions and signaling through ILK". Current Opinion in Cell Biology , vol. 12, p. 250-6.

DELCOMMENNE, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett et S. Dedhar. 1998. "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 11211-6.

DIEZ, J. A., M. Elvira et A. Villalobo. 1998. "The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylates connexin32". Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 187, p. 201-10.

DUFRESNE, J., K. W. Finnson, M. Gregory et D. G. Cyr. 2003. "Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication". Am J Physiol Cell Physiol, vol. 284, p. C33-43.

EIBERGER, J., M. Kibschull, N. Strenzke, A. Schober, H. Bussow, C. Wessig, S. Djahed, H. Reucher, D. A. Koch, J. Lautermann, T. Moser, E. Winterhager et K. Willecke. 2006. "Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice". Glia, vol. 53, p. 601-11.

ELVIRA, M., J. A. Diez, K. K. Wang et A. Villalobo. 1993. "Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by mu-calpain and m-calpain". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 14294-300.

EVERT, M., T. Ott, A. Temme, K. Willecke et F. Dombrowski. 2002. "Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice". Carcinogenesis, vol. 23, p. 697-703.

FALK, M. M. et U. Lauf. 2001. "High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells". Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 251-62.

FANG, M. Z., W. C. Mar et M. H. Cho. 2001. "Cadmium-induced alterations of connexin expression in the promotion stage of in vitro two-stage transformation". Toxicology, vol. 161, p. 117-27.

FEARON, E. R. 2003. "Connecting estrogen receptor function, transcriptional repression, and E-cadherin expression in breast cancer". Cancer Cell, vol. 3, p. 307-10.

FIELD, J. M., L. A. Tate, J. K. Chipman et S. D. Minchin. 2003. "Identification of functional regulatory regions of the connexin32 gene promoter". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1628, p. 22-9.

FRAME, S. et P. Cohen. 2001. "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery". Biochemical Journal, vol. 359, p. 1-16.

FRIXEN, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Löchner et W. Birchmeier. 1991. "E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human carcinoma Cells". The Journal of Cell Biology, vol. 113, p. 173-185.

FUJIMOTO, E., H. Sato, Y. Nagashima, E. Negishi, S. Shirai, K. Fukumoto, H. Hagiwara, K. Hagiwara, K. Ueno et T. Yano. 2005. "A Src family inhibitor (PP1) potentiates tumor-suppressive effect of connexin 32 gene in renal cancer cells". Life Sciences, vol. 76, p. 2711-20.

FUJIMOTO, E., H. Sato, S. Shirai, Y. Nagashima, K. Fukumoto, H. Hagiwara, E. Negishi, K. Ueno, Y. Omori, H. Yamasaki, K. Hagiwara et T. Yano. 2005. "Connexin32 as a tumor suppressor gene in a metastatic renal cell carcinoma cell line". Oncogene, vol. 24, p. 3684-90.

FUJIMOTO, K., A. Nagafuchi, S. Tsukita, A. Kuraoka, A. Ohokuma et Y. Shibata. 1997. "Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation". Journal of Cell Science, vol. 110 (Pt 3), p. 311-22.

GENDA, T., M. Sakamoto, T. Ichida, H. Asakura et S. Hirohashi. 2000. "Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell- substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells". Laboratory Investigation, vol. 80, p. 387-94.

GIEPMANS, B. N. 2004. "Gap junctions and connexin-interacting proteins". Cardiovascular Research, vol. 62, p. 233-45.

GIRARD, S. 2003. Organochlorés et cancer du sein: Modulation de la signalisation cellulaire des cellules épithéliales mammaires humaines. Québec, Canada. Mémoire, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.

GOLDBERG, G. S., K. D. Martyn et A. F. Lau. 1994. "A connexin 43 antisense vector reduces the ability of normal cells to inhibit the foci formation of transformed cells". Molecular Carcinogenesis, vol. 11, p. 106-14.

GOLDBERG, G. S., A. P. Moreno et P. D. Lampe. 2002. "Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 36725-30.

GOLDBERG, G. S., V. Valiunas et P. R. Brink. 2004. "Selective permeability of gap junction channels". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1662, p. 96-101.

GOLIGER, J. A. et D. L. Paul. 1994. "Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis". Developmental Dynamics, vol. 200, p. 1-13.

GOLIGER, J. A. et D. L. Paul. 1994. "Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis". Developmental Dynamics, vol. 200, p. 1-13.

GOODWIN, M. et A. S. Yap. 2004. "Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton". J Mol Histol, vol. 35, p. 839-44.

GORSKI, T., E. Gorska, D. Gorecka et M. Sikora. 1986. "Hexachlorobenzene is non-genotoxic in short-term tests". IARC Scientific Publications, vol. 399-401.

GOTOH, J., M. Obata, M. Yoshie, S. Kasai et K. Ogawa. 2003. "Cyclin D1 over-expression correlates with beta-catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3 beta and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis". Carcinogenesis, vol. 24, p. 435-42.

GOUVERNEMENT DU CANADA.1993. Canadian Environmental Protection, Act Priority Substances List, Supporting Document: Hexachlorobenzene. Ottawa. National Health and Welfare/ Department of the Environment.

GRAFF, J. R., J. A. Deddens, B. W. Konicek, B. M. Colligan, B. M. Hurst, H. W. Carter et J. H. Carter. 2001. "Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade". Clinical Cancer Research, vol. 7, p. 1987-91.

GRASHOFF, C., I. Thievessen, K. Lorenz, S. Ussar et R. Fassler. 2004. "Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner". Current Opinion in Cell Biology, vol. 16, p. 565-71.

GREEN, L. M., M. LaBue, J. P. Lazarus et J. C. Jennings. 1996. "Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease". Endocrinology, vol. 137, p. 2823-32.

GROENEWEGEN, W. A., T. A. van Veen, H. M. van der Velden et H. J. Jongsma. 1998. "Genomic organization of the rat connexin40 gene: identical transcription start sites in heart and lung". Cardiovascular Research, vol. 38, p. 463-71.

HABERMANN, H., W. Y. Chang, L. Birch, P. Mehta et G. S. Prins. 2001. "Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate". Endocrinology, vol. 142, p. 359-69.

HABERMANN, H., V. Ray, W. Habermann et G. S. Prins. 2002. "Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer". Journal of Urology , vol. 167, p. 655-60.

HAEFLIGER, J. A., R. Polikar, G. Schnyder, M. Burdet, E. Sutter, T. Pexieder, P. Nicod et P. Meda. 2000. "Connexin37 in normal and pathological development of mouse heart and great arteries". Developmental Dynamics, vol. 218, p. 331-44.

HAJRA, K. M., D. Y. Chen et E. R. Fearon. 2002. "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer". Cancer Research, vol. 62, p. 1613-8.

HANADA, M., J. Feng et B. A. Hemmings. 2004. "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1697, p. 3-16.

HANNIGAN, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell et S. Dedhar. 1996. "Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase". Nature, vol. 379, p. 91-6.

HENNEMANN, H., E. Dahl, J. B. White, H. J. Schwarz, P. A. Lalley, S. Chang, B. J. Nicholson et K. Willecke. 1992. "Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 17225-33.

HENNEMANN, H., G. Kozjek, E. Dahl, B. Nicholson et K. Willecke. 1992. "Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes". European Journal of Cell Biology, vol. 58, p. 81-9.

HERRERO, C., D. Ozalla, M. Sala, R. Otero, M. Santiago-Silva, M. Lecha, J. To-Figueras, R. Deulofeu, J. M. Mascaro, J. Grimalt et J. Sunyer. 1999. "Urinary Porphyrin Excretion in a Human Population Highly Exposed to Hexachlorobenzene". Archives in Dermatology, vol. 135, p. 400-404.

HILL, M. M. et B. A. Hemmings. 2002. "Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy". Pharmacology and Therapeutics, vol. 93, p. 243-51.

HIRSCHI, K. K., C. E. Xu, T. Tsukamoto et R. Sager. 1996. "Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential". Cell Growth and Differentiation, vol. 7, p. 861-70.

HOPPERSTAD, M. G., M. Srinivas et D. C. Spray. 2000. "Properties of gap junction channels formed by Cx46 alone and in combination with Cx50". Biophysical Journal, vol. 79, p. 1954-66.

HOSSAIN, M. Z., A. B. Jagdale, P. Ao, C. LeCiel, R. P. Huang et A. L. Boynton. 1999. "Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells". Prostate, vol. 38, p. 55-9.

HOWARD, E. M., S. K. Lau, R. H. Lyles, G. G. Birdsong, J. N. Umbreit et R. Kochhar. 2005. "Expression of e-cadherin in high-risk breast cancer". Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, vol. 131, p. 14-8.

HSU, M., T. Andl, G. Li, J. L. Meinkoth et M. Herlyn. 2000. "Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression". Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 9), p. 1535-42.

HUANG, Y. et C. Wu. 1999. "Integrin-linked kinase and associated proteins (review)". International Journal of Molecular Medicine, vol. 3, p. 563-72.

HYNES, R. O. 2002. "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines". Cell, vol. 110, p. 673-87.

IARC. 1987. IARC Monographies, Hexachlorobenzene. vol. Suppl. 7, p.219-220.

ITOH, M. et M. J. Bissell. 2003. "The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis". Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, vol. 8, p. 449-62.

JIANG, T. et Y. Qiu. 2003. "Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 15789-93.

JIAO, W., K. Miyazaki et Y. Kitajima. 2002. "Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo". British Journal of Cancer, vol. 86, p. 98-101.

JINN, Y., M. Ichioka et F. Marumo. 1998. "Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer". Cancer Letters, vol. 127, p. 161-9.

JONES, P. A. et S. B. Baylin. 2002. "The fundamental role of epigenetic events in cancer". Nat Rev Genet, vol. 3, p. 415-28.

JONGEN, W. M. F., D. J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T. J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi et K. Yamasaki. 1991. "Regulation of Connexin 43-Mediated Gap Junctionnal Intercellular Communication by Ca2+ in Mouse Epidermal Cells Is Controlled by E-Cadherin". The Journal of Cell Biology, vol. 115, p. 545-555.

JOO, Y. E., C. S. Park, H. S. Kim, S. K. Choi, J. S. Rew et S. J. Kim. 2000. "Prognostic significance of E-cadherin/catenin complex expression in gastric cancer". Journal of Korean Medical Science, vol. 15, p. 655-66.

KANG, K. S., B. C. Kang, B. J. Lee, J. H. Che, G. X. Li, J. E. Trosko et Y. S. Lee. 2000. "Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H(2)O(2)". Cancer Letters, vol. 152, p. 97-106.

KANG, Y. et J. Massague. 2004. "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis". Cell, vol. 118, p. 277-9.

KANNO, Y. et W. R. Loewenstein. 1964. "Intercellular diffusion". Science, vol. 143, p. 959-60.

KIM, K., Z. Lu et E. D. Hay. 2002. "Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT". Cell Biology International, vol. 26, p. 463-76.

KIM, L. et A. R. Kimmel. 2000. "GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis". Current Opinion in Genetics and Development, vol. 10, p. 508-14.

KING, T. J. et P. D. Lampe. 2004. "The gap junction protein connexin32 is a mouse lung tumor suppressor". Cancer Research, vol. 64, p. 7191-6.

KING, T. J. et P. D. Lampe. 2004. "Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation". Carcinogenesis, vol. 25, p. 669-80.

KLEOPA, K. A., J. L. Orthmann, A. Enriquez, D. L. Paul et S. S. Scherer. 2004. "Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes". Glia, vol. 47, p. 346-57.

KNUDSEN, K. A. et M. J. Wheelock. 2005. "Cadherins and the mammary gland". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 95, p. 488-96.

KOFFLER, L., S. Roshong, I. Kyu Park, K. Cesen-Cummings, D. C. Thompson, L. D. Dwyer-Nield, P. Rice, C. Mamay, A. M. Malkinson et R. J. Ruch. 2000. "Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1)after forced

connexin expression in lung and liver carcinoma cells". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 79, p. 347-54.

KOFFLER, L. D., M. J. Fernstrom, T. E. Akiyama, F. J. Gonzalez et R. J. Ruch. 2002. "Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 407, p. 160-7.

KOJIMA, T., Y. Kokai, H. Chiba, M. Yamamoto, Y. Mochizuki et N. Sawada. 2001. "Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes". Experimental Cell Research, vol. 263, p. 193-201.

KOLAJA, K. L., D. T. Engelken et C. D. Klaassen. 2000. "Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens". Toxicology, vol. 146, p. 15-22.

KOUL, D., R. Shen, S. Bergh, Y. Lu, J. F. de Groot, T. J. Liu, G. B. Mills et W. K. Yung. 2005. "Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma". Mol Cancer Ther, vol. 4, p. 1681-8.

KRISHNAN, K., J. Brodeur et M. Charbonneau. 1991. "Developmental of an Experimental Model for the Study of Hexachlorobenzene-Induced Hepatic Porphyria in the Rat". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 17, p. 433-441.

KRUTOVSKIKH, V. et H. yamasaki. 1997. "The Role of Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC) Disorders in Experimental and Human Carcinogenesis". Histology and Histopathology, vol. 12, p. 761-768.

KRUTOVSKIKH, V. A., M. Mesnil, G. Mazzoleni et H. Yamasaki. 1995. "Inhibitionof rat Liver Gap Junction Intercellular Communication by Tumor-promoting Agents In Vivo Association with Aberrant Localization of Connexin Proteins". Laboratory Investigation, vol. 72, p. 571-577.

KRUTOVSKIKH, V. A., S. M. Troyanovsky, C. Piccoli, H. Tsuda, M. Asamoto et H. Yamasaki. 2000. "Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo". Oncogene, vol. 19, p. 505-13.

KUMAR, C. C. et V. Madison. 2005. "AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors". Oncogene, vol. 24, p. 7493-501.

KUMAR, N. M. et N. B. Gilula. 1986. "Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein". Journal of Cell Biology, vol. 103, p. 767-76.

KURAOKA, A., H. Iida, T. Hatae, Y. Shibata, M. Itoh et T. Kurita. 1993. "Localization of gap junction proteins, connexins 32 and 26, in rat and guinea pig liver as revealed by quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 41, p. 971-80.

KURAOKA, A., H. Iida, T. Hatae, Y. Shibata, M. Itoh et T. Kurita. 1993. "Localization of gap junction proteins, connexins 32 and 26, in rat and guinea pig liver as revealed by quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 41, p. 971-80.

KURREY, N. K., A. K et S. A. Bapat. 2005. "Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level". Gynecologic Oncology, vol. 97, p. 155-65.

LAIRD, D. W. 2005. "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1711, p. 172-82.

LAIRD, D. W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G. D. Carystinos et M. A. Alaoui-Jamali. 1999. "Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors". Cancer Research, vol. 59, p. 4104-10.

LAIRD, D. W. 1996. "The Life Cycle of a Connexin: Gap Junction Formation, Removal, and Degradation". Journal of Bioenergetics and Biomembranes, vol. 28, p. 311-318.

LAIRD, P. W. 2003. "The power and the promise of DNA methylation markers". Nat Rev Cancer, vol. 3, p. 253-66.

LAMBRECHT, R. W., E. Ertürk, E. E. Grunden, D. B. Headley, H. A. Peters, C. R. Morris et B. T. Bryan. 1983. "Renal toxicity and tumorogenicity of hexachlorobenzene (HCB) in Syrian golden hamsters (H) after subchronic administration". Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., vol. 42, p. 786.

LAMPE, P. D. et A. F. Lau. 2004. "The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication". International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 36, p. 1171-86.

LAROUCHE, L. 1993. Relaton entre la porphyrie hépatique induite par l'hexachlorobenzene et l'hépatocancérogenese chez le rat. Montréal, Canada. Thèse, Université de Montreal.

LAUDER, A., A. Castellanos et K. Weston. 2001. "c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of Tcells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis". Molecular and Cellular Biology, vol. 21, p. 5797-805.

LAUTERMANN, J., H. G. Frank, K. Jahnke, O. Traub et E. Winterhager. 1999. "Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea". Developmental Genetics, vol. 25, p. 306-11.

LAUTERMANN, J., W. J. ten Cate, P. Altenhoff, R. Grummer, O. Traub, H. Frank, K. Jahnke et E. Winterhager. 1998. "Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea". Cell and Tissue Research, vol. 294, p. 415-20.

LEE, M. J. et S. K. Rhee. 1998. "Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in which the expression of connexin26 is induced". Molecules and Cells, vol. 8, p. 295-300.

LEE, S. W., C. Tomasetto, D. Paul, K. Keyomarsi et R. Sager. 1992. "Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines". Journal of Cell Biology, vol. 118, p. 1213-21.

LEFEBVRE, P. P. et T. R. Van De Water. 2000. "Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene". Brain Research. Brain Research Reviews, vol. 32, p. 159-62.

LESLIE, N. R., R. M. Biondi et D. R. Alessi. 2001. "Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases". Chemical Reviews, vol. 101, p. 2365-80.

LI, G. et M. Herlyn. 2000. "Dynamics of intercellular communication during melanoma development". Molecular Medicine Today, vol. 6, p. 163-9.

LINDSLEY, C. W., Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber et M. E. Duggan. 2005. "Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors". Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 15, p. 761-4.

LITTLE, T. L., E. C. Beyer et B. R. Duling. 1995. "Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo". American Journal of Physiology, vol. 268, p. H729-39.

LOEWENSTEIN, W. R. 1966. "Permeability of membrane junctions". Annals of the New York Academy of Sciences , vol. 137, p. 441-72.

LU, Z., S. Ghosh, Z. Wang et T. Hunter. 2003. "Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion". Cancer Cell, vol. 4, p. 499-515.

LUO, Y., A. R. Shoemaker, X. Liu, K. W. Woods, S. A. Thomas, R. de Jong, E. K. Han, T. Li, V. S. Stoll, J. A. Powlas, A. Oleksijew, M. J. Mitten, Y. Shi, R. Guan, T. P. McGonigal, V. Klinghofer, E. F. Johnson, J. D. Leverson, J. J. Bouska, M. Mamo, R. A. Smith, E. E. Gramling-Evans, B. A. Zinker, A. K. Mika, P. T. Nguyen, T. Oltersdorf, S. H. Rosenberg, Q. Li et V. L. Giranda. 2005. "Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo". Mol Cancer Ther, vol. 4, p. 977-86.

LYNCH, D. K., C. A. Ellis, P. A. Edwards et I. D. Hiles. 1999. "Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism". Oncogene, vol. 18, p. 8024-32.

MANTHEY, D., F. Bukauskas, C. G. Lee, C. A. Kozak et K. Willecke. 1999. "Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 14716-23.

MAREEL, M., M. Bracke et F. Van Roy. 1994. "Invasion Promoter Versus Invasion Suppressor Molecules:the Paradigm of E-cadherin". Molecular Biology Reports, vol. 19, p. 45-67.

MARTIN, T. A., G. Watkins, R. E. Mansel et W. G. Jiang. 2004. "Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells". Cell Biology International, vol. 28, p. 361-71.

MEIER, R., D. R. Alessi, P. Cron, M. Andjelkovic et B. A. Hemmings. 1997. "Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 30491-7.

MESNIL, M., V. Krutovskikh, C. Piccoli, C. Elfgang, O. Traub, K. Willecke et H. Yamasaki. 1995. "Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity". Cancer Research, vol. 55, p. 629-39.

MEYER, R. A., D. W. Laird, J. P. Revel et R. G. Johnson. 1992. "Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies". Journal of Cell Biology, vol. 119, p. 179-89.

MILLER, T., G. Dahl et R. Werner. 1988. "Structure of a gap junction gene: rat connexin-32". Bioscience Reports, vol. 8, p. 455-64.

MIRSALIS, J. C., J. A. Monforte et R. A. Winegar. 1994. "Transgenic animal models for measuring mutations in vivo". Critical Reviews in Toxicology, vol. 24, p. 255-80.

MOENNIKES, O., A. Buchmann, T. Ott, K. Willecke1 et M. Schwarz. 1999. "The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains". Carcinogenesis, vol. 20, p. 1379-82.

MOMIYAMA, M., Y. Omori, Y. Ishizaki, Y. Nishikawa, T. Tokairin, J. Ogawa et K. Enomoto. 2003. "Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells". Cancer Sci, vol. 94, p. 501-7.

MONAGHAN, P., C. Clarke, N. P. Perusinghe, D. W. Moss, X. Y. Chen et W. H. Evans. 1996. "Gap junction distribution and connexin expression in human breast". Experimental Cell Research, vol. 223, p. 29-38.

MONGROO, P. S., C. N. Johnstone, I. Naruszewicz, C. Leung-Hagesteijn, R. K. Sung, L. Carnio, A. K. Rustgi et G. E. Hannigan. 2004. "Beta-parvin inhibits integrin-linked kinase signaling and is downregulated in breast cancer". Oncogene, vol. 23, p. 8959-70.

MORSI, A. S., R. E. Godfrey, J. K. Chipman et S. D. Minchin. 2003. "Characterisation of the connexin32 promoter and changes in response element complexes in rat liver and hepatocytes during culture associated with oxidative stress". Toxicol In Vitro, vol. 17, p. 191-9.

MUMMA, C.F. et E.W.Lawless1975. Survey of industrial processing data. Task I-Hexachlorobenzene and hexachlorobutadiene pollution for chlorocarbon processes (EPA-56013-75-004). Washington, DC. USA EPA.

MUNARI-SILEM, Y. 1996. "[Gap junctions in the thyroid gland: distribution, regulation, function]". Annales d Endocrinologie, vol. 57, p. 484-6.

NAGY, J. I., D. Patel, P. A. Ochalski et G. L. Stelmack. 1999. "Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance". Neuroscience, vol. 88, p. 447-68.

NERI, L. M., P. Borgatti, S. Capitani et A. M. Martelli. 2002. "The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1584, p. 73-80.

NEUHAUS, I. M., L. Bone, S. Wang, V. Ionasescu et R. Werner. 1996. "The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters". Bioscience Reports, vol. 16, p. 239-48.

NEUHAUS, I. M., G. Dahl et R. Werner. 1995. "Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32". Gene, vol. 158, p. 257-62.

NEWHOOK, R. et Meek, M. E. 1994. “Hexachlorobenzene: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada” Environ. Carcino. Ecotox. Rev., vol. C12, p.345-360

NIELSEN, M., R. J. Ruch et O. Vang. 2000. "Resveratrol Reverses Tumor-Promoter-Induced Inhibition of Gap-Junctionnal Intercellular Communication". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 275 , p. 804-809.

NIESINK, R. J.M., J.de Vries et M.A. Hollinger. 1996. Toxicology : Principles and Applications. Boca Raton, New York, USA, CCR Press.

NOLLET, F., P. Kools et F. van Roy. 2000. "Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members". Journal of Molecular Biology, vol. 299, p. 551-72.

NOVAK, A., S. C. Hsu, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, J. Papkoff, R. Montesano, C. Roskelley, R. Grosschedl et S. Dedhar. 1998. "Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 4374-9.

NUNN, R. S., T. J. Macke, A. J. Olson et M. Yeager. 2001. "Transmembrane alpha-helices in the gap junction membrane channel: systematic search of packing models based on the pair potential function". Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 344-51.

NUSSE, R. 2005. "Wnt signaling in disease and in development". Cell Research, vol. 15, p. 28-32.

OHIRA, T., R. M. Gemmill, K. Ferguson, S. Kusy, J. Roche, E. Brambilla, C. Zeng, A. Baron, L. Bemis, P. Erickson, E. Wilder, A. Rustgi, J. Kitajewski, E. Gabrielson, R. Bremnes, W. Franklin et H. A. Drabkin. 2003. "WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 10429-34.

OLOUMI, A., T. McPhee et S. Dedhar. 2004. "Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1691, p. 1-15.

OMORI, Y., M. L. Zaidan Dagli, K. Yamakage et H. Yamasaki. 2001. "Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice". Mutation Research, vol. 477, p. 191-6.

OMORI, Y., A. Doflot-Dancer, M. Mesnil et H. Yamasaki. 1998. "Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects". Toxicology Letters, vol. 96, p. 105-110.

OU, Y. C., R. B. Conolly, R. S. Thomas, Y. Xu, M. E. Andersen, L. S. Chubb, H. C. Pitot et R. S. Yang. 2001. "A clonal growth model: time-course simulations of liver foci growth following penta- or hexachlorobenzene treatment in a medium-term bioassay". Cancer Research, vol. 61, p. 1879-89.

OYAMADA, M., Y. Oyamada et T. Takamatsu. 2005. "Regulation of connexin expression". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1719, p. 6-23.

PAUL, D. L. 1986. "Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein". Journal of Cell Biology , vol. 103, p. 123-34.

PEKARSKY, Y., A. Koval, C. Hallas, R. Bichi, M. Tresini, S. Malstrom, G. Russo, P. Tsichlis et C. M. Croce. 2000. "Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 3028-33.

PERACCHIA, C., A. Sotkis, X. G. Wang, L. L. Peracchia et A. Persechini. 2000. "Calmodulin directly gates gap junction channels". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 26220-4.

PEREIRA, M. A., S. L. Herren, A. L. Britt et M. M. Khoury. 1982. "Sex difference in enhancement of GGTase-positive foci by hexachlorobenzene and lindane in rat liver". Cancer Letters, vol. 15, p. 95-101.

PERSAD, S., S. Attwell, V. Gray, N. Mawji, J. T. Deng, D. Leung, J. Yan, J. Sanghera, M. P. Walsh et S. Dedhar. 2001. "Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 27462-9.

PERSAD, S. et S. Dedhar. 2003. "The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression". Cancer and Metastasis Reviews, vol. 22, p. 375-84.

PIECHOCKI, M. P., R. M. Toti, M. J. Fernstrom, R. D. Burk et R. J. Ruch. 2000. "Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1491, p. 107-22.

PIECHOCKI, M. P., R. D. Burk et R. J. Ruch. 1999. "Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells". Carcinogenesis, vol. 20, p. 401-406.

PINKSE, G. G., M. P. Voorhoeve, M. Noteborn, O. T. Terpstra, J. A. Bruijn et E. De Heer. 2004. "Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix". Liver Int, vol. 24, p. 218-26.

PITOT, H. C. 1993. "The molecular biology of carcinogenesis". Cancer, vol. 72, p. 962-70.

PITOT, H. C., Y. P. Dragan, J. Teeguarden, S. Hsia et H. Campbell. 1996. "Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver". Toxicologic Pathology, vol. 24, p. 119-28.

PLANTE, I., M. Charbonneau et D. G. Cyr. 2002. "Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat". Carcinogenesis, vol. 23, p. 1243-9.

PLANTE, I., D. G. Cyr et M. Charbonneau. 2005. "Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis". Toxicological Sciences, vol. 88, p. 346-57.

PORE, N., S. Liu, H. K. Shu, B. Li, D. Haas-Kogan, D. Stokoe, J. Milanini-Mongiat, G. Pages, D. M. O'Rourke, E. Bernhard et A. Maity. 2004. "Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism". Molecular

Biology of the Cell, vol. 15, p. 4841-53.

POZZI, A., B. Risek, D. T. Kiang, N. B. Gilula et N. M. Kumar. 1995. "Analysis of Multiple Gap Junction Gene Products in the Rodent and Human Mammary Gland". Experimental Cell Research, vol. 220, p. 212-219.

RANDI, A. S., C. Cocca, V. Carbone, M. Nunez, M. Croci, A. Gutierrez, R. Bergoc et D. L. Kleiman de Pisarev. 2006. "Hexachlorobenzene Is a Tumor Co-carcinogen and Induces Alterations in Insulin-Growth Factors Signaling Pathway in the Rat Mammary Gland". Toxicological Sciences, vol. 89, p. 83-92.

RANDI, A. S., H. A. Sancovich, A. M. Ferramola de Sancovich, A. Loaiza, R. A. Kolliker Frers, F. Spinelli et D. L. Kleiman de Pisarev. 2003. "Effect of in vivo administered hexachlorobenzene on epidermal growth factor receptor levels, protein tyrosine kinase activity, and phosphotyrosine content in rat liver". Biochemical Pharmacology, vol. 65, p. 1495-506.

RANDI, A. S., H. A. Sancovich, A. M. Ferramola de Sancovich, A. Loaiza, L. Krawiec et D. L. Kleiman de Pisarev. 1998. "Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function". Toxicology, vol. 125, p. 83-94.

REED, K. E., E. M. Westphale, D. M. Larson, H. Z. Wang, R. D. Veenstra et E. C. Beyer. 1993. "Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein". Journal of Clinical Investigation, vol. 91, p. 997-1004.

REGINATO, M. J., K. R. Mills, J. K. Paulus, D. K. Lynch, D. C. Sgroi, J. Debnath, S. K. Muthuswamy et J. S. Brugge. 2003. "Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis". Nat Cell Biol, vol. 5, p. 733-40.

REN, J., Y. Li et D. Kufe. 2002. "Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 17616-22.

RICHARD, G. 2003. "Connexin gene pathology". Clinical and Experimental Dermatology, vol. 28, p. 397-409.

RIZZARDINI, M. et A. G. Smith. 1982. "Sex differences in the metabolism of hexachlorobenzene by rats and the development of porphyria in females". Biochemical Pharmacology, vol. 31, p. 3543-8.

ROBERTSON, J. D. 1957. "New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers". J Biophys Biochem Cytol, vol. 3, p. 1043-8.

ROSCOE, W., G. I. Veitch, X. Q. Gong, E. Pellegrino, D. Bai, E. McLachlan, Q. Shao, G. M. Kidder et D. W. Laird. 2005. "Oculodentodigital dysplasia-causing connexin43 mutants are non-functional and exhibit dominant effects on wild-type connexin43".

Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 11458-66.

RUCH, R. J. et J. E. Trosko. 2001. "Gap-junction communication in chemical carcinogenesis". Drug Metabolism Reviews, vol. 33, p. 117-24.

RUCH, R. J., W. J. Bonney, K. Sigler, X. Guan, D. Matesic, L. D. Schafer, E. Dupont et J. E. Trosko. 1994. "Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells". Carcinogenesis, vol. 15, p. 301-306.

RUKSTALIS, J. M., A. Kowalik, L. Zhu, D. Lidington, C. L. Pin et S. F. Konieczny. 2003. "Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1". Journal of Cell Science, vol. 116, p. 3315-25.

RUP, D. M., R. D. Veenstra, H. Z. Wang, P. R. Brink et E. C. Beyer. 1993. "Chick connexin-56, a novel lens gap junction protein. Molecular cloning and functional expression". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 706-12.

SAEZ, J. C., D. C. Spray, A. C. Nairn, E. Hertzberg, P. Greengard et M. V. Bennett. 1986. "cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 83, p. 2473-7.

SAI, K., J. Kanno, R. Hasegawa, J. E. Trosko et T. Inoue. 2000. "Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol". Carcinogenesis, vol. 21, p. 1671-6.

SAJI, M., V. Vasko, F. Kada, E. H. Allbritton, K. D. Burman et M. D. Ringel. 2005. "Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 332, p. 167-73.

SAMBROOK, J. et D.Russell. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHAMBONY, A., M. Kunz et D. Gradl. 2004. "Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion". Differentiation, vol. 72, p. 307-18.

SEKI, A., H. S. Duffy, W. Coombs, D. C. Spray, S. M. Taffet et M. Delmar. 2004. "Modifications in the biophysical properties of connexin43 channels by a peptide of the cytoplasmic loop region". Circulation Research, vol. 95, p. e22-8.

SELDEN, A., G. Jacobson, P. Berg et O. Axelson. 1989. "Hepatocellular carcinoma and exposure to hexachlorobenzene: a case report". British Journal of Industrial Medicine, vol. 46, p. 138-40.

SHAO, Q., H. Wang, E. McLachlan, G. I. Veitch et D. W. Laird. 2005. "Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype". Cancer Research, vol. 65, p. 2705-11.

SIEKEL, P., I. Chalupa, J. Beno, M. Blasko, J. Novotny et J. Burian. 1991. "A genotoxicological study of hexachlorobenzene and pentachloroanisole". Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, vol. 11, p. 55-60.

SIMPSON, I., B. Rose et W. R. Loewenstein. 1977. "Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels". Science, vol. 195, p. 294-6.

SMITH, A. G. et J. R. Cabral. 1980. "Liver-cell tumours in rats fed hexachlorobenzene". Cancer Letters, vol. 11, p. 169-72.

SMITH, A. G., J. R. P. Cabral et A. L. Wright. 1987. "Goitre and Wasting Induced in Hamsters by Hexachlorobenzene". Archives of Toxicology, vol. 60, p. 343-349.

SMITH, A. G., J. E. Francis, D. Dinsdale, M. M. Manson et J. R. Cabral. 1985. "Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria". Carcinogenesis, vol. 6, p. 631-6.

SOLAN, J. L. et P. D. Lampe. 2005. "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1711, p. 154-63.

SONG, G., G. Ouyang et S. Bao. 2005. "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival". J Cell Mol Med, vol. 9, p. 59-71.

SOSINSKY, G. E. et B. J. Nicholson. 2005. "Structural organization of gap junction channels". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1711, p. 99-125.

SUSKE, G. 1999. "The Sp-family of transcription factors". Gene, vol. 238, p. 291-300.

TADDEI, I., M. M. Faraldo, J. Teuliere, M. A. Deugnier, J. P. Thiery et M. A. Glukhova. 2003. "Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium". Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, vol. 8, p. 383-94.

TAKEDA, A., E. Hashimoto, H. Yamamura et T. Shimazu. 1987. "Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C". FEBS Letters, vol. 210, p. 169-72.

TAKEDA, A., S. Saheki, T. Shimazu et N. Takeuchi. 1989. "Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes". Journal of Biochemistry, vol. 106, p. 723-7.

TAN, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A. G. de Herreros et S. Dedhar. 2001. "Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells". Oncogene, vol. 20, p. 133-40.

TAN, C., S. Cruet-Hennequart, A. Troussard, L. Fazli, P. Costello, K. Sutton, J. Wheeler, M. Gleave, J. Sanghera et S. Dedhar. 2004. "Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK)". Cancer Cell, vol. 5, p. 79-90.

TAN, I. P., C. Roy, J. C. Saez, C. G. Saez, D. L. Paul et M. S. Risley. 1996. "Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions". Biology of Reproduction, vol. 54, p. 1300-10.

TANAKA, M. et H. B. Grossman. 2004. "Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells". Oncology Reports, vol. 11, p. 537-41.

TANNO, B., A. Negroni, R. Vitali, M. C. Pirozzoli, V. Cesi, C. Mancini, B. Calabretta et G. Raschella. 2002. "Expression of insulin-like growth factor-binding protein 5 in neuroblastoma cells is regulated at the transcriptional level by c-Myb and B-Myb via direct and indirect mechanisms". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 23172-80.

TATENO, C., S. Ito, M. Tanaka, M. Oyamada et A. Yoshitake. 1994. "Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats". Carcinogenesis, vol. 15, p. 517-21.

TEMME, A., A. Buchmann, H. D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz et K. Willecke. 1997. "High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32". Current Biology, vol. 7, p. 713-6.

TEMME, A., T. Ott, F. Dombrowski et K. Willecke. 2000. "The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin32 expressing gap junctions". Journal of Hepatology, vol. 32, p. 627-35.

TERZAGHI-HOWE, M., G. W. Chang et D. Popp. 1997. "Emergence of undifferentiated rat tracheal cell carcinomas, but not squamous cell carcinomas, is associated with a loss of expression of E-cadherin and of gap junction communication". Carcinogenesis, vol. 18, p. 2043-50.

TEUBNER, B., B. Odermatt, M. Guldenagel, G. Sohl, J. Degen, F. Bukauskas, J. Kronengold, V. K. Verselis, Y. T. Jung, C. A. Kozak, K. Schilling et K. Willecke. 2001. "Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons". Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 1117-26.

TO-FIGUERAS, J., M. Sala, R. Otero, C. Barrot, M. Santiago-Silva, M. Rodamilans, C. Herrero, J. Grimalt et J. Sunyer. 1997. "Metabolism of Hexachlorobenzene in Humans: Association between serum levels and Urinary Metabolites in a Highly Exposed population". Environmental and Health Perspectives, vol. 105, p. 78-83.

TOKER, A. et A. C. Newton. 2000. "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 8271-4.

TOROK, K., K. Stauffer et W. H. Evans. 1997. "Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains". Biochemical Journal, vol. 326 (Pt 2), p. 479-83.

TROSKO, J. E. et R. J. Ruch. 1998. "Cell-Cell Communication in Carcinogenesis". Frontiers in Biosciences, vol. 3, p. d208-236.

TROUSSARD, A. A., N. M. Mawji, C. Ong, A. Mui, St -Arnaud R et S. Dedhar. 2003. "Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 22374-8.

TUCKER, M. A. et L. Barajas. 1994. "Rat connexins 30.3 and 31 are expressed in the kidney". Experimental Cell Research, vol. 213, p. 224-30.

TUTTLE, J.R.. 1979. A survey of the sources, uses and environmental distribution of hexachlorobenzene in Alberta, Saskatchewan, Manitoba and hte NorthWest Territories. Edmonton, Canada. Environmental Protection Service, Fisheries and Environment Canada, 94 pages.

UMHAUER, S., R. J. Ruch et J. Fanning. 2000. "Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma". American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 182, p. 999-1000.

VALIUNAS, V., E. C. Beyer et P. R. Brink. 2002. "Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity". Circulation Research, vol. 91, p. 104-11.

VAN AKEN, E., O. De Wever, A. S. Correia da Rocha et M. Mareel. 2001. "Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer". Virchows Archiv, vol. 439, p. 725-51.

VAN DE SANDE, T., T. Roskams, E. Lerut, S. Joniau, H. Van Poppel, G. Verhoeven et J. V. Swinnen. 2005. "High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB". Journal of Pathology , vol. 206, p. 214-9.

VAN NOORT, M., J. Meeldijk, R. van der Zee, O. Destree et H. Clevers. 2002. "Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 17901-5.

VASKO, V., M. Saji, E. Hardy, M. Kruhlak, A. Larin, V. Savchenko, M. Miyakawa, O. Isozaki, H. Murakami, T. Tsushima, K. D. Burman, C. De Micco et M. D. Ringel. 2004. "Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer". Journal of Medical Genetics, vol. 41, p. 161-70.

VOM DAHL, S., F. Schliess, R. Reissmann, B. Gorg, O. Weiergraber, M. Kocalkova, F. Dombrowski et D. Haussinger. 2003. "Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 27088-95.

VON MALTZAHN, J., C. Euwens, K. Willecke et G. Sohl. 2004. "The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers". Journal of Cell Science, vol. 117, p. 5381-92.

WANG, D., L. Sun, E. Zborowska, J. K. Willson, J. Gong, J. Verraraghavan et M. G. Brattain. 1999. "Control of type II transforming growth factor-beta receptor expression by integrin ligation". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 12840-7.

WANG, F., R. K. Hansen, D. Radisky, T. Yoneda, M. H. Barcellos-Hoff, O. W. Petersen, E. A. Turley et M. J. Bissell. 2002. "Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts". Journal of the National Cancer Institute, vol. 94, p. 1494-503.

WANG, F., V. M. Weaver, O. W. Petersen, C. A. Larabell, S. Dedhar, P. Briand, R. Lupu et M. J. Bissell. 1998. "Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 14821-6.

WANG, Y. et B. Rose. 1997. "An inhibition of gap-junctional communication by cadherins". Journal of Cell Science, vol. 110 (Pt 3), p. 301-9.

WARNGARD, L., Y. Bager, Y. Kato, K. Kenne et U. G. Ahlborg. 1996. "Mechanistical studies of the inhibition of intercellular communication by organochlorine compounds". Archives of Toxicology. Supplement. Archiv fur Toxikologie. Supplement, vol. 18, p. 149-59.

WHITE, T. W. 2000. "Functional analysis of human Cx26 mutations associated with deafness". Brain Research. Brain Research Reviews, vol. 32, p. 181-3.

WHITE, T. W., R. Bruzzone, D. A. Goodenough et D. L. Paul. 1992. "Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70". Molecular Biology of the Cell, vol. 3, p. 711-20.

WHITE, T. W., D. L. Paul, D. A. Goodenough et R. Bruzzone. 1995. "Functional analysis of selective interactions among rodent connexins". Molecular Biology of the Cell, vol. 6, p. 459-70.

WILLECKE, K., J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch et G. Sohl. 2002. "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome". Biological Chemistry, vol. 383, p. 725-37.

WILLECKE, K., R. Heynkes, E. Dahl, R. Stutenkemper, H. Hennemann, S. Jungbluth, T. Suchyna et B. J. Nicholson. 1991. "Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung". Journal of Cell Biology, vol. 114, p. 1049-57.

WILLIAMS, D. T., LeBel, G. L., et Junkins, E. 1988. "Organohalogen residues in human adipose autopsy samples from six Ontario municipalities". Journal - Association of Official Analytical Chemists, vol. 71, p.410-414.

WOLFRUM, C., D. Besser, E. Luca et M. Stoffel. 2003. "Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 11624-9.

WU, C. 2001. "ILK interactions". Journal of Cell Science, vol. 114, p. 2549-50.

WU, C. et S. Dedhar. 2001. "Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes". Journal of Cell Biology, vol. 155, p. 505-10.

WU, C., S. Y. Keightley, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, M. Coppolino, S. Goicoechea, J. A. McDonald et S. Dedhar. 1998. "Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E- cadherin expression, and tumorigenicity". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 528-36.

YAMAMOTO, T., T. Kojima, M. Murata, K. Takano, M. Go, H. Chiba et N. Sawada. 2004. "IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways". Experimental Cell Research, vol. 299, p. 427-41.

YAMAMOTO, T., T. Kojima, M. Murata, K. Takano, M. Go, N. Hatakeyama, H. Chiba et N. Sawada. 2005. "p38 MAP-kinase regulates function of gap and tight junctions during regeneration of rat hepatocytes". Journal of Hepatology, vol. 42, p. 707-18.

YAMASAKI, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, T. Tanaka, M. L. Zaidan-Dagli et Y. Omori. 1999. "Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis". Comptes Rendus de l Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie, vol. 322, p. 151-9.

YAMASAKI, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, A. Columbano, H. Tsuda et N. Ito. 1993. "Gap Juntional Intercellular Communication and Cell Proliferation during Rat Liver Carcinogenesis". Environmental Health Perspectives, vol. 101, p. 191-198.

YANO, T., F. Ito, K. Kobayashi, Y. Yonezawa, K. Suzuki, R. Asano, K. Hagiwara, H. Nakazawa, H. Toma et H. Yamasaki. 2004. "Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candiate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients". Cancer Letters, vol. 208, p. 137-42.

YEAGER, M. 1998. "Structure of cardiac gap junction intercellular channels". Journal of Structural Biology, vol. 121, p. 231-45.

YOGANATHAN, N., A. Yee, Z. Zhang, D. Leung, J. Yan, L. Fazli, D. L. Kojic, P. C. Costello, M. Jabali, S. Dedhar et J. Sanghera. 2002. "Integrin-linked kinase, a promising cancer therapeutic target: biochemical and biological properties". Pharmacology and Therapeutics, vol. 93, p. 233-42.

YOUNES, M. N., S. Kim, O. G. Yigitbasi, M. Mandal, S. A. Jasser, Y. Dakak Yazici, B. A. Schiff, A. El-Naggar, B. N. Bekele, G. B. Mills et J. N. Myers. 2005. "Integrin-linked kinase is a potential therapeutic target for anaplastic thyroid cancer". Mol Cancer Ther, vol. 4, p. 1146-56.

YUAN, S. T., X. Q. Hu, J. P. Lu, H. KeiKi, W. R. Zhai et Y. E. Zhang. 2000. "Changes of integrin expression in rat hepatocarcinogenesis induced by 3'-Me-DAB". World J Gastroenterol, vol. 6, p. 231-233.

ZAMPIGHI, G. A., D. D. Loo, M. Kreman, S. Eskandari et E. M. Wright. 1999. "Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in Xenopus laevis oocytes". Journal of General Physiology, vol. 113, p. 507-24.

ZHANG, J. T. et B. J. Nicholson. 1994. "The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions". Journal of Membrane Biology, vol. 139, p. 15-29.

ZHANG, J.-T. et B. J. Nicholson. 1989. "Sequence and Tissus Distribution of a Second Protein of Hepatic Gap Junctions, Cx26, As Deduced from its cDNA". The Journal of Cell Biology, vol. 109, p. 3391-3401.

ZHOU, B. P., J. Deng, W. Xia, J. Xu, Y. M. Li, M. Gunduz et M. C. Hung. 2004. "Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition". Nat Cell Biol, vol. 6, p. 931-40.

ZHU, D., S. Caveney, G. M. Kidder et C. C. Naus. 1991. "Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 1883-7.