

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Effets d'une exposition hormonale sur l'expression des connexines dans les lignées cellulaires mammaires.

Par
Alexandre Petit

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maitre ès sciences (M.Sc)
en science expérimentale de la santé

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	Cathy Vaillancourt INRS Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	R.-Marc Pelletier Université de Montréal
Directrice de recherche INRS-IAF	Isabelle Plante INRS Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Droits réservés de (Alexandre Petit), le 17 novembre 2020

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Isabelle Plante. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis d'entrer dans ton laboratoire malgré mon parcours initial d'informaticien. Je ne serais pas au Canada si tu ne m'avais pas laissé l'opportunité de venir à l'INRS et travailler dans ton laboratoire. Merci mille fois.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury d'avoir pris le temps de lire mon mémoire et d'en faire l'évaluation.

Je voudrais remercier Bélinda, d'avoir été un support moral et ma grande sœur d'adoption pendant ses quatre longues années. J'espère que notre relation restera la même pendant encore bien des années. Ne change pas (reste aussi chiant que tu es).

Merci à Rita d'avoir été présente au bon moment, d'avoir supporté mes blagues douteuses (mais avoue qu'elle était bonne) et d'avoir exprimé tes émotions. Tu es vraiment quelqu'un de génial et tu seras sûrement une formidable docteure.

Merci à Melany alias Micromel de m'avoir encouragée, réconfortée et supportée. J'espère que tu garderas ton innocence de petite licorne encore un bout de temps. N'oublie pas de m'inviter à ta soutenance de doctorat si l'on peut sortir d'ici là.

Merci à Alec d'avoir apporté une présence masculine dans ce laboratoire beaucoup trop féminin (je rigole). J'espère que tu vas réaliser de très belles choses durant ta maîtrise.

Un grand merci à Paulin, Clément, Wesley et Anaïs pour avoir égaillé les soirs, et mes longs week-ends à l'institut. En y repensant, je ne sais pas si c'était une bonne chose...mais en tout cas, on a eu pas mal de fun.

Je n'oublie pas Vincent, Zoé, Laurie, Léa, Richard, Léna, Gabriel, Aicha, Ricaud, Mustapha, Mervé, Guillaume, Claudia, Sara, Anne, Mélanie B. Désolé si j'en oublie au moment d'écrire ça. Si je pouvais, je ferais un paragraphe pour chacun d'entre vous, mais ça serait plus long que ma partie résultat et on me donne qu'une page... Mais je peux vous dire que vous m'avez tous et toutes apporté énormément de bonnes choses et de moments inoubliables. J'espère qu'on en vivra encore plein d'autres.

Je tiens enfin à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer durant ces années à l'INRS que ce soit le temps d'un café, d'une discussion ou d'un trajet de bus.

Résumé

La communication intercellulaire par les jonctions gaps est nécessaire pour le développement et la régulation de la glande mammaire. Les connexines (Cxs) sont des constituantes essentielles du réseau de communication cellulaire. En formant les jonctions gaps, elles permettent le passage de petites molécules entre le cytoplasme de cellules adjacentes. Il a été démontré que l'expression des Cxs et les interactions protéiques qu'elles forment avec les autres protéines jonctionnelles varient au cours du développement, vraisemblablement en fonction des besoins développementaux et fonctionnels du tissu. Ces changements apparaissent principalement pendant la grossesse et semblent similaires aux pics hormonaux observés durant cette même période.

L'hypothèse de cette étude était que l'expression des connexines est influencée par les variations hormonales présentes durant le développement de la glande mammaire. L'objectif principal de cette étude a donc été d'étudier l'influence d'une exposition hormonale sur l'expression des Cxs dans des lignées cellulaires de glande mammaire humaine.

Pour ce faire, des traitements hormonaux (prolactine, ocytocine, progestérone et œstrogène) ont été effectués sur des lignées cellulaires humaines non-tumorigéniques (MCF-10A) et cancéreuses (T47D), et l'expression des Cxs a été vérifiée au niveau protéique et transcriptionnel.

Les expositions ont été réalisées à des concentrations basées sur les doses physiologiques humaines, et suggèrent que l'expression des Cxs est médiée par certaines hormones. La Cx43, en particulier, semble avoir son expression diminuée par la prolactine et augmentée par l'œstradiol au niveau protéique. L'augmentation par la prolactine de la protéine Cx43 se retrouve également au niveau transcriptionnel par une diminution de l'expression des niveaux de transcrits du gène de la Cx43, *GJA1*. Une étude préliminaire sur la voie de signalisation reliée aux récepteurs à la prolactine PrlR a également conforté nos résultats.

Bien que les résultats pour les trois autres connexines n'ont pas donné de résultats concluants, de nombreuses optimisations de protocoles, de méthodes et d'analyses ont été effectuées durant ce projet, et permettront d'investiguer plus aisément les Cxs, de comprendre leur rôle dans la glande mammaire ainsi que leur implication dans le cancer du sein.

Mot clé : Connexines, Cancer, Hormone, Communication, Interaction, Régulation

Abstract

Intercellular communication through gap junctions is necessary for the development and regulation of the mammary gland. Connexins (Cxs) are essential constituents of the cellular communication network. By forming gap junctions, they allow the passage of small molecules between the cytoplasm of adjacent cells. It has been shown that the expression of Cxs and the protein interactions they form with other junctional proteins vary during development, presumably depending on the developmental and functional needs of the tissue. These mainly during pregnancy and the hormonal changes similar to the pictures seen during this same period.

The hypothesis of this study was that the expression of connexins was influenced by the hormonal variations present during the development of the mammary gland. The main objective of this study was therefore to study the influence of hormonal exposure on the expression of Cxs in human mammary gland cell lines.

Thereby, hormonal treatments (prolactin, oxytocin, progesterone and estrogen) were carried out on non-tumorigenic (MCF-10A) and cancerous (T47D) human cell lines, and the expression of Cxs was verified at the protein and transcriptional level.

Exposures were made at concentrations recommended on human physiological doses, and suggest that Cxs expression is mediated by certain hormones. Cx43, in particular, appears to be influenced by prolactin and estradiol at the protein level. The influence of prolactin on Cx43 is also found at the level of transcription by a decrease in the expression of the levels of transcripts of the Cx43 gene, GJA1. A preliminary study on the signaling pathway linked to the PrIR prolactin receptors also confirmed our results.

Although the results for the other three connexins could not be successfully completed, many optimizations of protocols, methods and analyzes were carried out during this project, and to investigate more to use the Cxs, to understand their role in mammary gland as well as their implication in breast cancer.

Keywords: Connexins, Cancer, Hormone, Communication, Interaction, Regulation

TABLE DES MATIERES

Remerciements	III
Résumé	V
Abstract	VII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVI
LISTE DES ABREVIATIONS	XVIII
INTRODUCTION	21
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	24
1.1 Anatomie et physiologie de la glande mammaire.....	24
Développement de la glande mammaire.....	26
1.1.1 Développement prénatal	26
1.1.2 Développement néonatal et pré-pubertaire.....	27
1.1.3 Développement au cours de la puberté.....	27
1.1.4 Développement au cours de la gestation.....	28
1.1.5 Développement pendant la lactation.....	29
1.1.6 Involution	29
1.2 Régulation du développement et de la fonction de la glande mammaire.	30
1.2.1 Principales hormones impliquées dans le développement	31
SECTION 2 : IMPLICATION DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE	37
1.3 Les jonctions communicantes	37
1.4 Expression des connexines lors du développement de la glande mammaire	39
1.5 Régulation des jonctions communicantes.....	40
1.5.1 Structure des gènes codant pour les Cxs	41
1.5.2 Régulation transcriptionnelle des connexines	42
1.5.2.1 Facteurs Sp	42
1.5.2.2 Activator protein 1	43
1.5.2.3 Le facteur TFAP2A ou Activator protein 2 alpha	43
1.5.2.4 E2F1	43
1.5.2.5 YY1	43
1.5.3 Épigenétique.....	44
1.5.4 Régulation de l'expression des Connexines par les hormones	44
1.6 Intéactome des connexines	45

SECTION 3. CANCER ET JONCTIONS INTERCELLULAIRES	46
1.7 Cancer du sein	46
1.8 Implication des connexines dans le cancer du sein.....	46
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	48
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	50
2.1 Animaux.....	50
2.2 Extraction de protéines sur tissus	50
2.3 Western blot.....	51
2.4 Immunoprécipitation	52
2.5 Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse.....	53
2.6 Culture cellulaire : Cellules T47D.....	53
2.6.1 Mise en culture.....	53
2.7 Culture cellulaire : Cellules MCF10A	53
2.6.2 Passage.....	54
2.6.3 Traitements hormonaux.....	54
2.8 Extraction de protéine sur cellules.....	55
2.9 Extraction d'ARN.....	56
2.10 RT-qPCR	56
2.11 Droplet digital PCR (ddPCR).....	56
2.12 Tests statistiques	57
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	61
3.1 Étude de l'interactome des connexines dans le développement de la glande mammaire murine	61
3.2 Effet d'une exposition hormonale sur les niveaux protéiques des connexines.....	64
3.2.1 Effets d'un traitement à la prolactine sur les jonctions communicantes dans les cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).....	64
3.2.2 Effets d'un traitement à l'estradiol sur les jonctions communicantes dans des cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).....	68
3.2.3 Effets d'un traitement à la progestérone sur les jonctions communicantes dans des cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).....	68
3.3 Effet d'une exposition hormonale sur l'expression des gènes des connexines	69
3.3.1 Effets d'un traitement à la prolactine sur les niveaux de <i>GJA1</i> dans des cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).....	70
3.3.2 Effets d'un traitement à l'estradiol sur les niveaux de <i>GJA1</i> dans des cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).	71
3.3.3 Effets d'un traitement aux ocytocines et la progestérone sur les niveaux de <i>GJA1</i> dans des cellules de glande mammaire humaine (<i>in vitro</i>).	72
3.4 Étude préliminaire de la voie de signalisation de la prolactine	73

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	75
CONCLUSION	83
BIBLIOGRAPHIES	85

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Illustration de la structure anatomique de la glande mammaire humaine

Figure 1.2 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'unité fonctionnelle sécrétrice de la glande mammaire : l'acinus

Figure 1.3 : Représentation schématique des différentes étapes du développement de la glande mammaire

Figure 1.4 : Représentation schématique de l'action des hormones durant le développement de la glande mammaire.

Figure 1.5 : Représentation schématique des voies de signalisation des estrogènes.

Figure 1.6 : Représentation schématique de la voie de signalisation de la progestérone.

Figure 1.7 : Représentation schématique de la voie principale de signalisation de la prolactine.

Figure 1.8 : Schéma de la configuration des jonctions communicantes

Figure 1.9 : Niveau protéique de Cx43, Cx26, Cx30 et Cx32 en fonction du stade de développement de la glande mammaire.

Figure 1.10 : Représentation schématique des gènes *GJB1*, *GJA1*, *GJB6* et *GJB2*

Figure 1.11 : Interaction des connexines avec les protéines des jonctions cellulaires

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Représentation schématique du protocole d'immunoprécipitation

Figure 2.2 : Protocole expérimental des traitements hormonaux de 72 heures in vitro.

Figure 2.3 : Protocole expérimental des traitements hormonaux de 8 heures in vitro.

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Résultats LC-MS/MS des complexes protéiques associés aux connexines 26, 30 et 32

Figure 3.2 : Résultat des comparaisons des différents tampons de lyse et des billes magnétiques

Figure 3.3 : Résultat des comparaisons des différents tampons d'élution entre nos deux tampons de lyse.

Figure 3.4 : Effets d'un traitement à la prolactine sur les niveaux protéiques du récepteur à la prolactine PrIR (A), de Cx43 (B), et de P-STAT5 (C).

Figure 3.5 : Effets d'un traitement à l'ocytocine sur les niveaux protéiques du récepteur à l'ocytocine OTR (A) et de Cx43 (B).

Figure 3.6 : Effets d'un traitement à l'estradiol sur les niveaux protéiques du récepteur aux estrogènes ERA et de Cx43.

Figure 3.4 : Effets d'un traitement à la progestérone sur les niveaux protéiques des récepteurs à la progestérone PRA (A), PRB (B) et de Cx43 (C).

Figure 3.7 : Effets d'un traitement à la progestérone sur les niveaux protéiques des récepteurs à la progestérone PRA, PRB et de Cx43

Figure 3.8 : Étude préliminaire des effets d'un traitement à la prolactine sur l'expression de *GJB2* (Cx26).

Figure 3.9 : Effets d'un traitement à la prolactine sur l'expression de *GJA1* (Cx43).

Figure 3.10 : Effets d'un traitement à l'estradiol l'expression de *GJA1* (Cx43).

Figure 3.11 : Visualisation des gènes de références suite à un traitement à l'ocytocine.

Figure 3.12 : Visualisation des gènes de références suite à un traitement à la progestérone.

Figure 3.13 : Effets d'un antagoniste à la prolactine sur les niveaux protéiques de Stat5 et phospho Stat5 in vitro sur la lignée T47D.

Figure 3.14 : Effets d'un antagoniste à la prolactine sur les niveaux protéiques de Stat5 (A) et phospho Stat5 (B) in vitro sur la lignée T47D traité à la prolactine.

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 2.1 Liste des anticorps utilisée pour les immunobuvardage de type Western

Table 2.2 Liste des anticorps utilisée pour les immunoprécipitations

Table 2.3 Liste des amorces utilisées pour les PCR en temps réel (RT-qPCR) et les droplet digital PCR (ddPCR)

Table 2.4 Liste des gènes de référence utilisée pour les RT-PCR en temps réel (rt-qPCR)

CHAPITRE 3

Table 3.1 Tableau de comparaison des différentes optimisations des co-immunoprécipitation.

LISTE DES ABREVIATIONS

- AMPC : cyclic adenosine monophosphate
- AP1 : activator protein 1
- BSA : albumine de sérum bovin
- CL : boucle cytoplasmique
- COIP : co-immunoprécipitation
- CT : domaines C-terminal
- Cxs : connexines
- DAG : diacylglycérol
- ddPCR : droplet digital PCR
- ECL : Enhanced chemiluminescence
- ERA / ER α : récepteur alpha des estrogènes
- ERB / ER β : : récepteur bêta des estrogènes
- FABP3 : fatty acid binding protein 3
- FABP4 : fatty acid binding protein 4
- FBS : sérum bovin foetal
- FT : facteurs de transcriptions
- FSH : hormone folliculo stimulante
- GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- GJA1 : gap junction alpha-1 protein
- GJB1 : gap junction bêta-1 protein
- GJB2 : gap junction bêta-2 protein
- GJB6 : gap junction bêta-6 protein

GJIC : communication intercellulaire par les jonctions gaps

HRP : horseradish Peroxidase

HSP : heat Shock Protein

IRS1 : récepteurs à l'insuline de type 1

IRS2 : récepteurs à l'insuline de type 2

IP : immunoprécipitation

IP3 : inositol trisphosphate

KO : knockout

LC-MS : liquid chromatography mass spectrometry

LH : hormone lutéinisante

NTD : partie amino-terminal

OTR : récepteurs à l'ocytocine

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PRA : récepteur progestérone A

PRB : récepteur progestérone B

PrIR : récepteur à la prolactine

PUM1 : pumilio member 1

PVDF : poly(fluorure de vinylidène)

qPCR : PCR en temps réel

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

TEB : terminal End Buds

TR : récepteur hormones thyroïdiennes

UXT : ubiquitously Expressed Prefoldin Like Chaperone

INTRODUCTION

La mise en place des structures de la glande mammaire se déroule en majorité après la naissance et est fortement régulée par le système endocrinien. L'épithélium de la glande mammaire est composé d'une couche de cellules luminales entourée d'une couche de cellules basales, formée majoritairement de cellules myoépithéliales. Il contient aussi diverses populations de cellules souches et progénitrices. Pour un développement normal et un bon fonctionnement de la glande mammaire, il est primordial que ces différentes couches cellulaires la composant communiquent entre elles. Les interactions entre les différents types cellulaires sont, entre autres, réalisées par les jonctions intercellulaires. Trois types des jonctions cellulaires participent à ces interactions : les jonctions lacunaires (mieux connues sous les appellations « jonctions gaps » ou jonctions communicantes), les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Ces jonctions cellulaires forment une structure dynamique qui se crée, se remodèle et se dissocie au cours du développement selon les besoins du tissu. La communication intercellulaire par les jonctions gaps (GJIC) joue également un rôle important dans la signalisation cellulaire des tissus.

Les connexines (Cxs), une famille de protéines formant les jonctions gaps, jouent ainsi un rôle dans la croissance, le développement embryonnaire, la différenciation des tissus et les fonctions tissulaires. Leur dérégulation a été associée à plusieurs maladies, comme le cancer. Quatre Cxs sont exprimées dans les glandes mammaires de la souris, soit Cx43, Cx26, Cx30 et Cx32, et deux chez l'humain, soit Cx26 et Cx43. Il a été démontré que l'expression des Cxs est modifiée durant les différentes phases de développement des glandes mammaires.

L'hypothèse de base de ce projet est que l'expression des Cxs est modulée par différents mécanismes transcriptionnels liés à la signalisation hormonale durant le développement des glandes mammaires.

Afin, de répondre à l'hypothèse, le premier objectif visait à étudier l'intéactome des jonctions communicantes au cours du développement de la glande mammaire dans le but d'établir une liste de protéines, pour chacun des stades de développement

des glandes mammaires, pouvant potentiellement interagir directement ou indirectement avec les connexines.

Le second objectif visait à évaluer l'impact des hormones sur des lignées cellulaires humaines. Des traitements *in vitro* de 72 heures à concentration croissante de prolactine, d'estrogènes, de progestérone et d'ocytocine ont été réalisés sur les cellules T47D et MCF10A. Les niveaux protéiques des Cxs ont été observés en immunobuvardage de type Western.

Le dernier objectif visait à évaluer l'effet de ces mêmes hormones sur l'expression transcriptionnelle des Cxs. Des traitements entre 2 et 8 heures à concentration fixe de prolactine, d'estrogènes, de progestérone et d'ocytocine ont été réalisés sur les cellules T47D. Les niveaux d'ARNm ont été évalués par RT-qPCR en temps réel.

Le premier chapitre de ce mémoire est une revue de littérature composée de trois différentes sections. La première section a pour but de présenter l'anatomie, le développement et les fonctions de la glande mammaire. La deuxième section vise à mettre en évidence le rôle ainsi que la régulation des jonctions communicantes, plus particulièrement des Cxs essentielles pour le développement de la glande mammaire. Finalement, la dernière section traitera du cancer du sein et de l'implication des Cxs dans sa progression. Le deuxième chapitre montrera les différentes méthodologies utilisées durant ce projet. Le troisième chapitre portera sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma maîtrise. Enfin, le dernier chapitre analysera et discutera des résultats obtenus afin de présenter une conclusion et une perspective à ce projet.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

SECTION 1 : LA GLANDE MAMMAIRE

1.1 Anatomie et physiologie de la glande mammaire

La glande mammaire joue un rôle dans la synthèse, la sécrétion et l'éjection du lait, ceci afin de permettre la nutrition et le développement du nouveau-né. On retrouve une seule paire de glandes mammaires chez l'humain au niveau du thorax. Chez la souris, cinq paires sont présentes : une au niveau cervical, deux au niveau thoracique, une au niveau abdominal et une au niveau inguinal. Le développement de la glande mammaire se déroule en plusieurs étapes et commence avant la naissance.

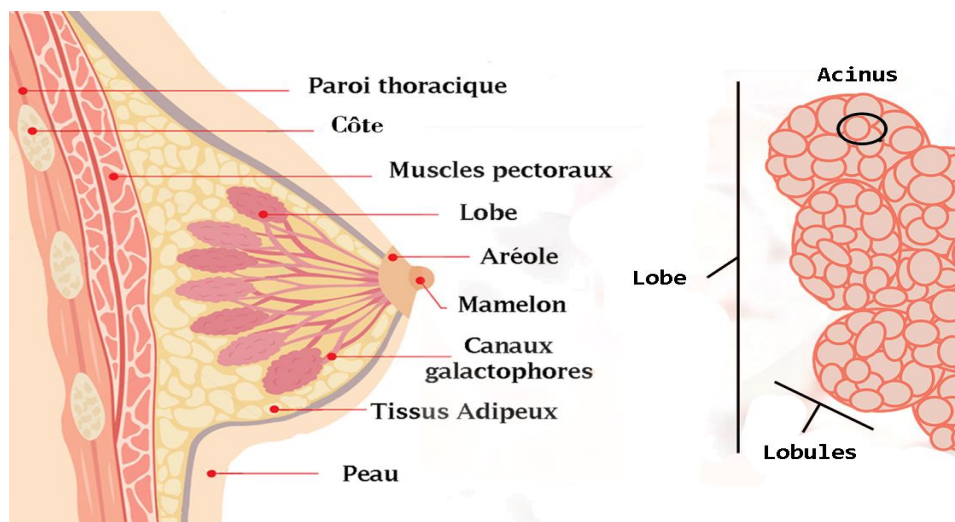


Figure 1.1 : Illustration de la structure anatomique de la glande mammaire humaine. L'illustration de gauche représente l'épithélium ramifié entouré du stroma et l'illustration de droite représente la structure des lobes. La glande mammaire repose sur la paroi thoracique composée des côtes et des muscles pectoraux. Le lait est produit dans les acini contenus dans les lobules des lobes qui sont reliés par les canaux galactophores qui convergent au mamelon. (Modifié de matoommi, 123rf.com).

Néanmoins, la grande majorité des changements de son anatomie se produit durant la vie postnatale, en particulier à la puberté et pendant la grossesse (Richert, Schwertfeger et al, 2000). Tant chez l'humain que chez la souris, chaque glande, dans son stage complètement développé et fonctionnel, comprend plusieurs lobules contenant une multitude d'alvéoles ou acinus, unité fonctionnelle des glandes mammaires (**Figure 1.1**) (Veltmaat, Mailleux et al. 2003).

L'ensemble des alvéoles va former des structures appelées lobules, qui va lui-même s'organiser en lobe. Le lait produit à partir des lobes va être transporté vers le mamelon par le biais des canaux galactophores (**Figure 1.2**). L'épithélium de la glande mammaire est divisé en deux couches, une couche interne de cellules luminales et une couche externe de cellules basales. Les cellules basales sont principalement des cellules myoépithéliales qui vont se contracter afin de faciliter l'éjection du lait (**Figure 1.2**).

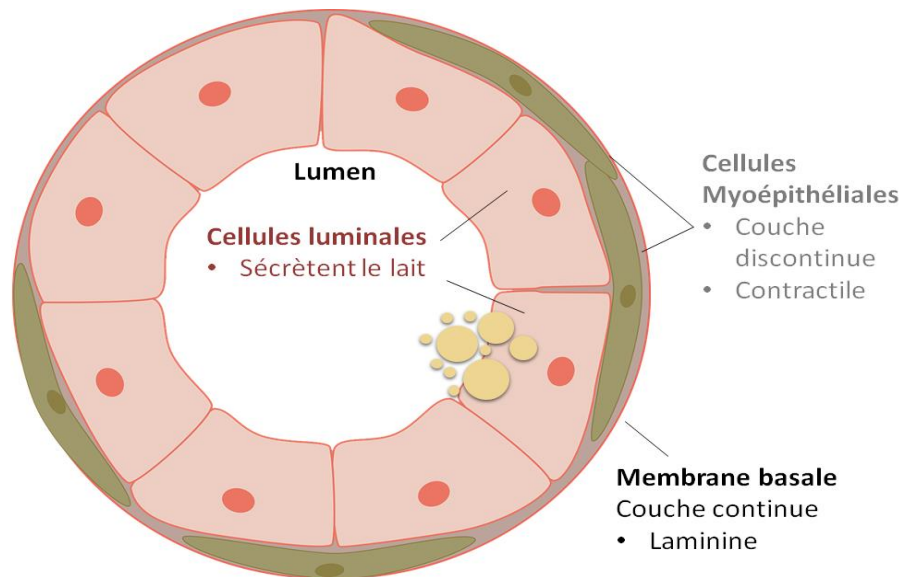


Figure 1.2 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'unité fonctionnelle sécrétrice de la glande mammaire : l'acinus. La lumière du lumen est entourée par une couche interne de cellules épithéliales luminales sécrétrices entourée par une couche de cellules myoépithéliales. L'épithélium est séparé du stroma par la membrane basale. (Figure adaptée de Mélanie Busby (non publié)).

Au niveau des alvéoles, les cellules luminales vont se différencier lors de la grossesse pour produire le lait durant la lactation. L'épithélium contient aussi diverses populations de cellules souches et progénitrices. Le stroma qui supporte et nourrit l'épithélium est composé majoritairement de matrice extracellulaire (laminine, collagène...), d'adipocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales ainsi que de cellules hématopoïétiques.

Développement de la glande mammaire

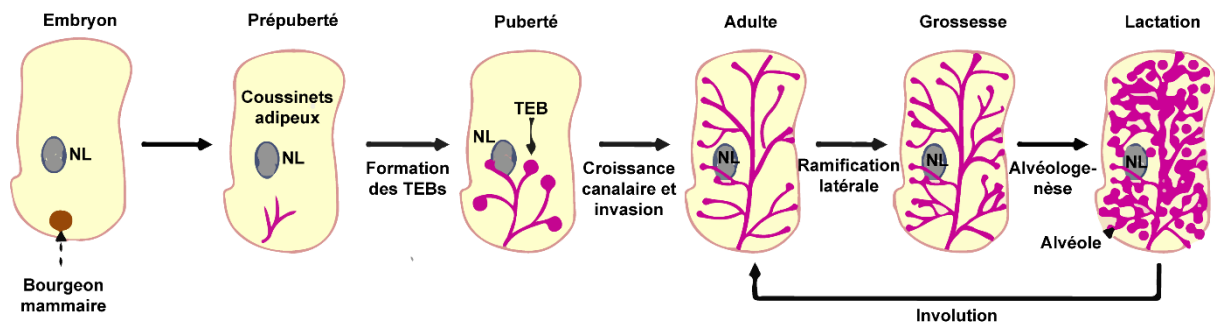


Figure 1.3 : Représentation schématique des différentes étapes du développement de la glande mammaire. Schéma des différentes étapes du développement de la glande mammaire à partir de l'embryon mammaire primaire, suivi des différents stades de développement, jusqu'à l'involution. La placode mammaire va se différencier en bourgeons mammaires qui vont pénétrer dans le mésenchyme sous-jacent. À la naissance, un arbre rudimentaire est présent. À la puberté, suite aux inductions hormonales, différentes périodes de ramification et d'expansion vont se suivre. À ce stade, la glande mammaire va connaître une croissance rapide causée par l'action des hormones ovariennes et former des structures appelées bourgeons terminaux ou TEB. Durant la grossesse, une phase de prolifération, l'alvéologenèse va avoir lieu. On voit alors l'apparition des alvéoles ou acinus. Les cellules luminales vont se différencier en lactocytes, et proliférer durant la lactation. Enfin, une phase d'involution va permettre un retour au stade pré-gestationnel. NL : Nœud lymphatique. (Adapté de Manavathi, 2014)

1.1.1 Développement prénatal

La glande mammaire est partagée en deux compartiments cellulaires, l'épithélium et le stroma, respectivement dérivés de l'ectoderme et du mésoderme. Chez la souris, le développement commence vers le 10^{ième} et le 11^{ième} jour de gestation, alors que chez l'humain, il s'initie à la 6^{ième} semaine de grossesse. Les cellules ectodermiques se regroupent et s'assemblent sur la face ventrale de l'embryon de manière symétrique en région cranio-ventrale, une structure qu'on appelle crêtes ectodermiques ou lignes de lait (Hens and Wysolmerski, 2005).

La plupart des cellules épithéliales présentes sur les crêtes, vont ensuite s'atrophier, à l'exception des régions cervicales, thoraciques, abdominales et inguinales chez la souris et de la zone thoracique chez l'humain, où les futures glandes mammaires se formeront (Veltmaat, Mailleux et al., 2003). Au 13^{ième} jour, les crêtes mammaires se composent de deux rangées de cellules distinctes : les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses séparées par une membrane basale. Les bourgeons primaires provenant du mésenchyme apparaissent à partir du 15^{ième}

jour. Ces bourgeons se composent de cellules mésenchymateuses qui formeront par la suite le coussin adipeux. Au 16^{ième} jour de la gestation chez la souris, et entre la 12^{ième} et la 16^{ième} semaine de grossesse chez l'humain, les mamelons apparaissent à la surface de la peau (Richert, Schwertfeger et al., 2000). Les canaux lactifères primaires vont se former de façon concomitante par l'apoptose des cellules épithéliales présentes au centre de ces bourgeons mammaires. Au 18^{ième} jour, le lumen commence à se former dans l'espace intercellulaire entre les crêtes. Les cellules vont continuer à proliférer durant tout le développement embryofœtal jusqu'à la naissance pour former un réseau de canaux rudimentaires (Sternlicht, 2006).

1.1.2 Développement néonatal et pré-pubertaire

À la naissance, les glandes mammaires sont encore primitives et inachevées. Leur développement va continuer à se dérouler, mais de façon assez lente, soit au même rythme que la croissance du corps, avant la puberté. Les glandes vont également subir une succession de ramifications. Ces élongations des canaux lactifères vont donner naissance à l'ébauche des bourgeons terminaux (**Figure 1.3**).

1.1.3 Développement au cours de la puberté

La puberté commence vers le 35^{ième} jour après la naissance chez la souris, alors que chez l'humain, elle s'initie vers la 12^{ième} année. La puberté marque le début des cycles œstraux chez la femelle. En comparaison avec le développement pré-pubertaire, la glande mammaire va connaître une croissance rapide durant la puberté. L'accélération de développement est causée, entre autres, par l'action des hormones ovariennes. Les canaux primaires vont proliférer et s'allonger sous l'action des estrogènes dans des structures appelées bourgeons terminaux, situées aux extrémités de ces canaux (Neville, McFadden et al., 2002). Les bourgeons terminaux, ou TEBs (Terminal End Buds) se composent de deux types cellulaires : une couche de cellule externe, ou coiffe, qui donneront naissance aux cellules myoépithéliales, et au centre, de plusieurs couches de cellules qui formeront les cellules luminales (Sternlicht, 2006). L'action des estrogènes couplée à celle de la progestérone va également permettre aux canaux de se diviser pour former des canaux secondaires (Atwood, Hovey et al., 2000). On parle de division dichotomique (**Figure 1.3**).

À partir de la puberté, la glande mammaire se caractérise par une activité de type cyclique. Le cycle œstral est la suite des événements qui se répètent entre deux ovulations. Au fur et à mesure de ces cycles, les cellules localisées dans les TEBs vont subir différentes périodes de mitoses et de migration cellulaire (Richert, Schwertfeger et al., 2000). On assiste en parallèle à un remodelage de la matrice extracellulaire (Macias and Hinck, 2012). Ceci va entraîner une diminution des coussins adipeux suite à l'invasion de l'épithélium glandulaire. Sous l'action des hormones, les TEBs vont se diviser en canaux terminaux ou bourgeons alvéolaires. Au centre des canaux, les cellules subiront l'apoptose pour former le lumen (Sternlicht, 2006). Lorsque les canaux atteignent l'extrémité du coussin adipeux, ils forment alors des bourgeons alvéolaires. Les bourgeons alvéolaires sont également formés d'un lumen entouré de cellules luminales, elles-mêmes entourées de cellules myoépithéliales (Musumeci, 2015). Au cours des cycles œstraux, le nombre de bourgeons alvéolaires va s'accroître de façon très importante (Macias and Hinck, 2012). Ces canaux terminaux donnent naissance aux alvéoles (Javed, 2013) qui vont sécréter le lait durant lactation. Cette prolifération sera ensuite suivie d'une phase de régression des glandes mammaires en l'absence de fécondation. La prolifération reprendra ainsi à chaque début d'un nouveau cycle menstruel jusqu'à l'avènement d'une grossesse ou de la ménopause (**Figure 1.3**).

1.1.4 Développement au cours de la gestation

Le développement durant la grossesse se déroule en deux phases. La première phase de développement lié à la grossesse, ou alvéologénèse, est une phase de prolifération. L'épithélium de la glande mammaire va connaître une rapide expansion avec la prolifération des cellules et des canaux lactifères terminaux (Masso-Welch, 2000). On voit alors l'apparition des alvéoles ou acinus, unité fonctionnelle de la glande mammaire. La croissance des lobules d'acini va continuer jusqu'à ce que l'espace entre les canaux soit complètement rempli. À la mi-grossesse, les cellules luminales des acini vont commencer à accumuler des lipides intracellulaires dans leur cytoplasme. Le nombre de réticulums endoplasmiques, d'appareils de Golgi et de vésicules de sécrétion va également augmenter (Masso-Welch, 2000). C'est la première étape de la lactogénèse. L'inhibition de la prolactine, par l'action de la

progestérone, bloquera les prochaines étapes de différenciation jusqu'à la lactation (Musumeci, 2015). L'augmentation de l'épithélium alvéolaire a pour conséquence de modifier la couche de cellules myoépithéliales, la rendant plus discontinue. La membrane basale qui entoure l'acini se retrouve alors en plus grand contact avec les cellules luminales. Ceci se rajoute à la progression des bourgeons alvéolaires dans le coussin adipeux. On se retrouve ainsi avec moins de tissus conjonctifs entourant les alvéoles. Les adipocytes inter-alvéolaires, maintenant aux contacts des cellules luminales, vont favoriser le maintien de la structure des alvéoles (Masso-Welch, 2000).

1.1.5 Développement pendant la lactation

L'apparence de la glande mammaire en début de lactation est très différente de la glande mammaire en fin de grossesse. À fin de la gestation, l'expulsion du placenta va induire une diminution de la progestérone. Ceci va causer une augmentation du niveau de prolactine dans le sang (McNeilly, 1979). La prolactine est une hormone qui favorise la synthèse et la sécrétion du lait (Macias, 2012). La présence de la prolactine va permettre aux cellules luminales des alvéoles de finir leur différenciation en lactocytes, mais également stimuler la prolifération cellulaire afin de garder un nombre constant de ces lactocytes durant toute la période de lactation (Hassiotou, 2012) (**Figure 1.3**). Les lactocytes vont sécréter le lait dans le lumen des acini qui va par la suite être transporté dans les canaux galactophores par la contraction des cellules myoépithéliales en réponse à l'ocytocine, et éjecté au niveau du mamelon (Musumeci, 2015). La lactation dure environ 3 semaines chez les rongeurs et varie entre 3 et 24 mois chez la femme.

1.1.6 Involution

La fin de la lactation sera marquée d'une régression de l'épithélium au profit du coussinet adipeux qui lui, va se reformer. Au début de l'involution, la majeure partie de la glande mammaire est composée de l'épithélium sécrétoire. L'involution correspond à un retour de la glande mammaire à un stade de pré-grossesse. Elle comprend deux phases : une première réversible et une seconde irréversible.

Durant la première phase, réversible, des vacuoles lipidiques ainsi que des lysosomes vont augmenter suite à la fin de l'allaitement. Les cellules épithéliales vont alors entrer dans un processus d'apoptose (Watson, 2006). L'accumulation de lait va remplir la lumière des canaux galactophores. Les cellules épithéliales engorgées de lait vont se détacher des cellules adjacentes et être excrétées dans la lumière des acini (Macias and Hinck, 2012). La deuxième phase, irréversible, commence après 48 heures de sevrage. Les alvéoles vont commencer à s'affaisser, et l'approvisionnement de lait cesse. Une seconde période d'apoptose arrive, accompagnée d'une augmentation de macrophages et de mastocytes qui vont faciliter le remodelage tissulaire (Marti, Feng et al., 1997). L'involution des tissus chez la souris dure environ une dizaine de jours. Suite à l'involution, la glande mammaire se remet à subir des cycles de prolifération-régression, jusqu'à la prochaine grossesse, ou jusqu'à la ménopause.

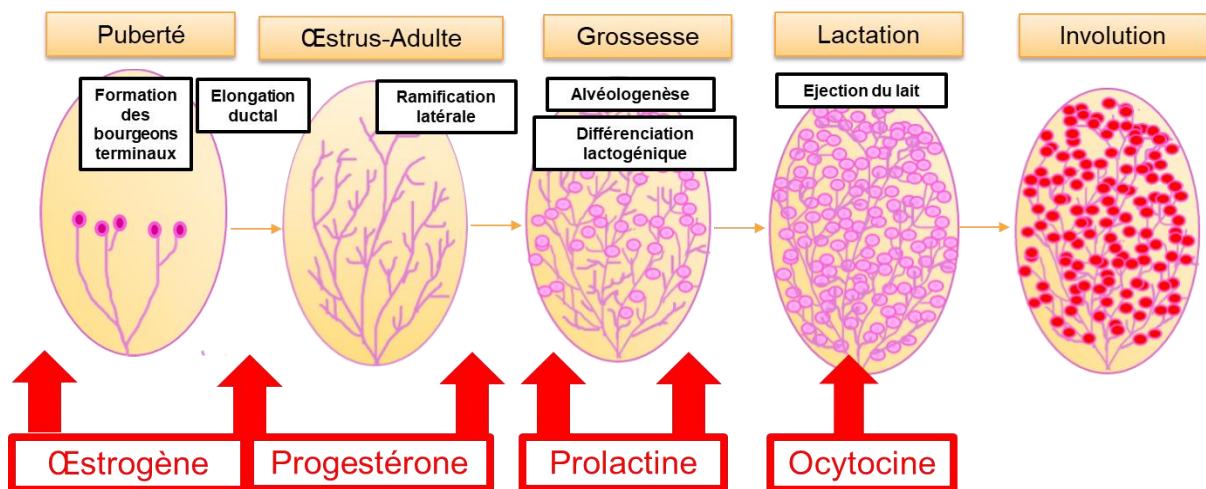


Figure 1.4 : Représentation schématique de l'action des hormones durant le développement de la glande mammaire. À la puberté, la morphogénèse commence sous le contrôle des œstrogènes et de la progestérone qui régulent la prolifération des canaux et la ramification latérale. Pendant la grossesse, l'œstrogène, la progestérone et la prolactine jouent un rôle dans l'expansion alvéolaire. Aux derniers stades de la grossesse et pendant la lactation, la prolactine joue un rôle clé dans l'établissement de l'état de sécrétion (Figure adaptée de Rita Gouesse (non publié)).

1.2 Régulation du développement et de la fonction de la glande mammaire.

Le développement de la glande mammaire est contrôlé par de multiples mécanismes de régulation, dont les hormones. À partir de la puberté, le développement devient hormono-dépendant (**Figure 1.4**). Tout au long du cycle

menstruel, les ovaires vont sécréter différentes hormones, telles que la progestérone et les estrogènes, qui vont réguler le développement de la glande mammaire. De façon similaire, les hormones durant la grossesse vont permettre la formation des alvéoles et la sécrétion du lait durant la lactation.

1.2.1 Principales hormones impliquées dans le développement

1.2.1.1 Les estrogènes

L'estrogène est une hormone ovarienne stéroïdienne régulatrice essentielle au développement de la glande mammaire, tout particulièrement au stade pubertaire. On la retrouve dans le corps sous trois formes dites naturelles : l'œstriol, l'estrone et l'estradiol (Ruan, Monaco et al., 2005). Elle permet l'élongation des canaux lactifères et est en grande partie responsable de la forte croissance de glande mammaire durant la puberté. Elle régule également d'autres hormones telles que la prolactine, l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et la progestérone (Briskin, 2010). L'estrogène, grâce à son caractère lipophile, peut passer à travers la membrane lipidique des cellules et se fixer sur ses récepteurs spécifiques. On retrouve deux types de récepteurs, le récepteur alpha ($ER\alpha$) et le récepteur bêta ($ER\beta$) encodés respectivement par les gènes ESR1 et ESR2 (Ghali, 2018). Les deux récepteurs sont présents dans les deux compartiments : les cellules épithéliales et les cellules stromales de la glande mammaire (Deroo, 2006 ; Saji, 2000). Il a été démontré que les récepteurs $ER\alpha$ sont essentiels pour le développement de la glande mammaire (Briskin, 2010). L'absence de récepteurs $ER\beta$ cause un ralentissement des branchements des canaux, ainsi qu'une diminution de la sécrétion de progestérone intracellulaire (Briskin, 2010).

Les estrogènes et leurs récepteurs vont permettre de réguler plusieurs processus biologiques par le biais de différentes voies de signalisation. La voie classique, dite génomique directe, se fait par la fixation des estrogènes sur les ERs (Junita Desouza, 2019) (**Figure 1.5**). La fixation de l'estrogène va provoquer la dimérisation du récepteur. Ces dimères vont migrer au niveau du noyau et réguler l'expression de gènes cibles tels que Sp-1, AP-1 ou bien STAT5 (Le Grand, 2009).

La voie génomique indirecte, ou « tethered » va se faire en coopération avec des facteurs de transcriptions (FTs), tels que la protéine activatrice AP-1 ou Sp-1 (**Figure 1.5**) (Kushner, 2000). Les estrogènes vont se fixer au niveau des ERs qui vont

par la suite se lier à des FTs afin de recruter des complexes protéiques, activant ou inhibant l'expression de gènes cibles (Junita Desouza, 2019).

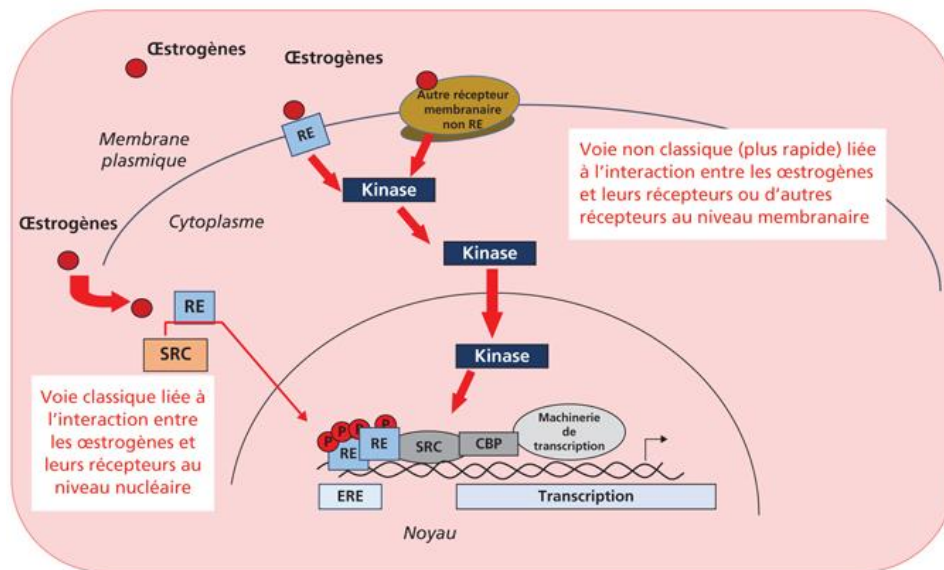


Figure 1.5 Représentation schématique des voies de signalisation des œstrogènes. Les œstrogènes vont impliquer plusieurs voies de signalisation. La voie génomique directe implique la fixation des œstrogènes sur leur récepteur. La voie génomique indirecte se fait en coopération avec des facteurs de transcriptions. Enfin, une voie dite non génomique dépendant du calcium intracellulaire. (Richard, 2016).

Il existe aussi une voie dite non génomique (**Figure 1.5**). La fixation des œstrogènes sur les ERs va recruter le calcium intracellulaire qui va ainsi stimuler la production de cyclic adenosine monophosphate (AMPc) (Marino, 2006). Ceci va déclencher des cascades de kinase ou de phosphorylation agissant sur des facteurs de transcription, activant ou inhibant l'activité de gènes (Junita Desouza, 2019).

1.2.1.2 Progestérone

La progestérone est une hormone stéroïdienne essentielle durant l'alvéologénèse et la grossesse. Elle est produite à partir du cholestérol sous l'action de la LH et est sécrétée par les ovaires. Elle joue un rôle dans le maintien de la paroi utérine. Elle inhibe l'action de la prolactine et induit la synthèse des androgènes et des œstrogènes (Macias, 2012). À l'image des œstrogènes, elle possède deux récepteurs. Le récepteur à la progestérone A (PRA) et récepteur à la progestérone B (PRB) (Di Renzo, 2016), présents à la fois dans l'épithélium et le stroma mammaire (OM Conneely, 2003). Ces deux isoformes sont transcrites à partir de deux promoteurs différents présents sur le même gène. L'isoforme B est plus longue et plus active que

l'isoforme A (la partie N-terminal de 164 acides aminés est manquante.) (Daniel, 2011). Il a été montré que la transplantation de cellules épithéliales knockout (KO) pour les récepteurs PR, dans le coussin adipeux de souris de type sauvage n'induisait pas de retard de développement. Néanmoins, la ramification des canaux ainsi que la formation des alvéoles étaient, quant à elles, inhibées (Briskin, 2010).

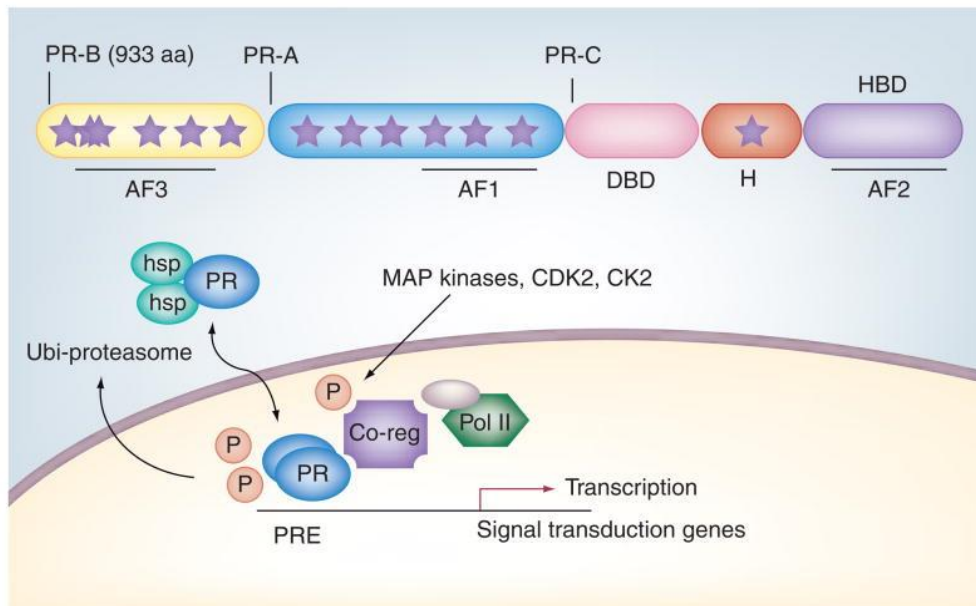


Figure 1.6 Représentation schématique de la voie de signalisation de la progestérone. La fixation de la progestérone à son récepteur PR va changer sa conformation, ce qui le libère des protéines chaperonnes, permettant sa dimérisation. Les dimères vont se diriger vers le noyau et se fixer sur l'ADN de gènes cibles et ainsi réguler leur transcription (Lange, 2017).

Les récepteurs à la progestérone (PRs) sont localisés dans le cytoplasme des cellules et sont associés à des complexes protéiques, Heat Shock Proteins (HSP) (AR Daniel, 2011). La progestérone va traverser par diffusion passive la membrane plasmique des cellules et se lier à son récepteur PR dans le cytoplasme. Ceci va changer la conformation de PR, le dissociant du complexe protéique HSP, permettant ainsi sa dimérisation et sa translocation dans le noyau (AR Daniel, 2011) (**Figure 1.6**). La fixation de PR à l'ADN de gènes cibles permet de réguler leur transcription (AR Daniel · 2011). Les PRs vont également pouvoir interagir par le biais de leur partie amino-terminal (NTD) avec des kinases présentes au niveau des membranes, tel que les Mitogen-activated protein kinases (MAPK), entraînant la transcription de gènes cibles (Dressing, 2009).

1.2.1.3 Prolactine

La prolactine est une hormone responsable de la production du lait et est stimulée lors de l'allaitement (Freeman, 2000). Elle est secrétée par l'hypophyse. La quantité de prolactine va commencer à augmenter durant la grossesse suite à la concentration élevée de progestérones et d'estrogènes. Néanmoins, l'action de la prolactine sur la production du lait est encore inhibée. L'accouchement va permettre à la prolactine, suite à la diminution des taux d'estrogènes et de progestérone, d'induire la lactation (Brisken and Ataca, 2015). Durant la lactation, la succion des mamelons va activer le complexe aréolo-mammaire et hypothalamo-hypophysaire, ainsi que la sécrétion de la prolactine par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse. Il a été montré que des souris déficientes pour le récepteur à la prolactine vont avoir un ralentissement du développement de leurs canaux lactiques ainsi qu'une baisse de l'expression de leurs protéines lactiques (Brisken, 2010).

Les récepteurs à la prolactine, ou PRLR, sont présents au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales mammaires (CJ Ormandy, 1993 ; SR Oakes, 2008). La liaison de la prolactine avec PRLR va activer 3 voies de signalisation différentes : la voie protéine Janus kinases Jak2/Stat5, la voie P13K/Akt et la voie MAPK (CM Gorvin, 2015).

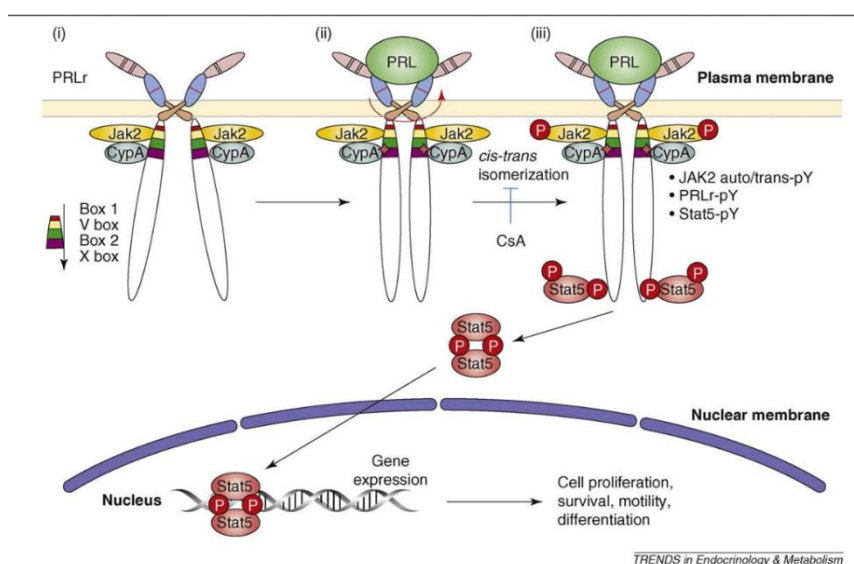


Figure 1.7 Représentation schématique de la voie principale de signalisation de la prolactine. La voie de signalisation principale de la prolactine suite à sa fixation au niveau de son récepteur est la voie Jak2/STAT, résultant en la translocation dans le noyau de STAT5 (Radhakrishnan, 2012).

Lors de la fixation de la prolactine à son récepteur, Jak2, lié au PRLR, va s'autophosphoryler, induisant la phosphorylation de STAT5. STAT5 va alors se transloquer dans le noyau et se lier à des gènes spécifiques (Radhakrishnan, 2012). **(Figure 1.7).**

Enfin, l'activation de PRLR va faciliter l'ancrage de kinases (Src) qui vont activer la voie de signalisation PI3K/Akt (AJ Richard, 2011). La fixation de la prolactine sur son récepteur va induire la phosphorylation de deux récepteurs à l'insuline (IRS1 et IRS2) (CM Gorvin, 2015). Cette phosphorylation est une étape clé de la régulation de la kinase PI3 (Radhakrishnan, 2012).

1.2.1.4 Ocytocine

L'ocytocine est impliquée dans l'éjection du lait. Elle est synthétisée dans l'hypothalamus et stockée dans la post-hypophyse (Lee, 2009). La succion des mamelons induit un influx nerveux qui va résulter en la libération d'ocytocine (calcium dépendant). L'ocytocine va se fixer au niveau des récepteurs à l'ocytocine (OTR) présents à la surface des cellules myoépithéliales, déclenchant la contraction des cellules myoépithéliales qui entourent les lactocytes. Les contractions vont permettre l'éjection du lait dans le lumen des canaux, puis vers l'extérieur, via les canaux galactophores (Da Costa TH, 1995).

Les récepteurs de l'ocytocine (OTR) sont présents à la surface des cellules myoépithéliales. La voie de signalisation principale de l'ocytocine est la voie Gq/PLC/InsP3 (C Viero, 2010). La liaison de l'ocytocine avec OTR va activer une protéine Gαq ainsi que la phospholipase C. Ceci va amener au clivage de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) (B Lerman, 2018). IP3 va induire la libération de calcium cytoplasmique qui va stimuler le complexe Ca²⁺/Calmoduline, activant l'enzyme Myosin light-chain kinase (MLCK) (B Lerman, 2018). La MLCK va phosphoryler les chaînes légères des myosines, se fixant à l'actine et permettant la contraction des cellules myoépithéliales (VA Tobin, 2007).

1.2.1.5 Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont synthétisées à partir de la thyroïde sous deux formes : thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3) (Schueler, 1990). Par le biais de leur récepteur (TRs), elles sont essentielles au développement des alvéoles de la glande mammaire, de concert avec la prolactine (Capuco, 2008). Ils existent deux types de TR : TR alpha et TR bêta codés respectivement par les gènes $THR\alpha$ et $THR\beta$. Suite à un épissage alternatif, on retrouve plusieurs isoformes pour chacun des récepteurs. $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$ peuvent servir de récepteur à T3, alors que $TR\alpha_2$ est incapable de fixer l'hormone (Schueler, 1990). Les récepteurs sont présents au niveau de la membrane nucléaire des cellules épithéliales de la glande mammaire.

SECTION 2 : IMPLICATION DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE

En plus de l'action des différentes hormones, le développement de la glande mammaire est également dépendant de la communication entre les différents types cellulaires la composant. Cette communication est réalisée, entre autres, par des jonctions cellulaires présentes entre les cellules et participe au maintien de l'homéostasie de la glande mammaire.

1.3 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, ou jonction gap, sont composées d'un assemblage de petites protéines transmembranaires appelées connexines (Cxs) (Stewart, Simek et Laird, 2015). Les Cxs sont nommées d'après leur poids moléculaire estimé ; par exemple, la Cx43 est une protéine de 43kDa. Les Cxs sont synthétisées par des ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique. Six Cxs transmembranaires vont former des héli-canaux, ou connexons, qui vont migrer vers la membrane plasmique et s'aligner avec les connexons des cellules voisines pour former des canaux jonctionnels (Laird, 2006). La jonction gap est constituée du regroupement de centaines de ces canaux à la membrane.

Les jonctions gaps permettent le transport intercellulaire de petites molécules ($\sim < 1.8$ kDa) au travers des canaux de 2-3 nm entre les cytoplasmes des deux cellules (Maeda, 2009). Parmi ces molécules, on trouve des métabolites (nucléotides, oligopeptide), des messagers secondaires (AMPC, IP3, calcium) et des morphogènes (Teleki, 2014). Il est connu que la communication via les jonctions gaps joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie, la morphogénèse ainsi que dans la différenciation cellulaire (Oyamada, 2005). Une perte des Cxs est associée à un développement anormal, à un dysfonctionnement des organes ainsi qu'à l'apparition de cancer (Plante et Laird, 2008 ; Plante et al., 2010). Vingt-une Cxs sont présentes dans les cellules humaines contre 20 pour la souris. Les héli-canaux peuvent être constitués de Cxs identique ou différente, aboutissant soit à des connexons homomériques, soit à des connexons hétéromériques.

Les Cxs sont des protéines transmembranaires possédant quatre hélices transmembranaires hydrophobes (M1 à M4) et deux boucles extracellulaires (EL-1 et EL-2) (**Figure 1.8**) (Heather, 2002). Dans le cytoplasme se trouvent une boucle cytoplasmique (CL) ainsi que les domaines C-terminal (CT) et N-terminal (Debarshi, 2016). Les Cxs diffèrent principalement par leurs domaines CT et CL dont les séquences et les modifications post-traductionnelles, principalement des phosphorylations, vont influencer la sélectivité des molécules transférées ainsi que les interactions avec les protéines partenaires (Laird, 2006). La phosphorylation peut également modifier la conformation des canaux entraînant soit leur ouverture, soit leur fermeture (Alexander et Goldberg, 2003).

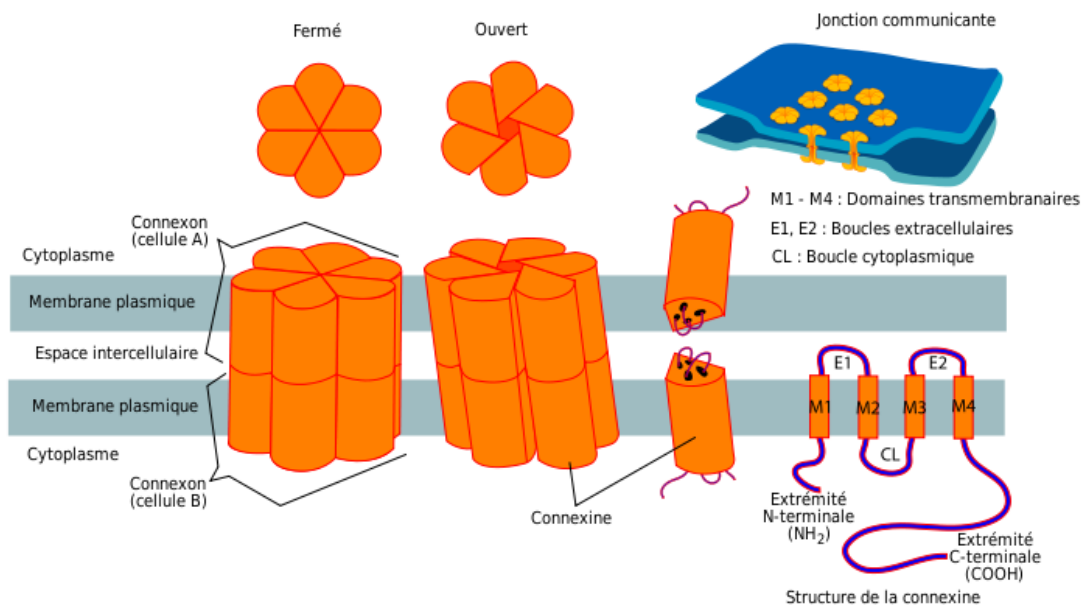


Figure 1.8 Schéma de la configuration des jonctions communicantes. Toutes les connexines sont composées des domaines transmembranaires en hélice appelés M1 à M4 et de deux boucles extracellulaires (EL1, EL2). Leur variabilité se trouve au niveau de leurs domaines CT et CL (Mariana Ruiz, 2016).

Les boucles extracellulaires sont les résidus les plus conservés, car ils permettent aux cellules de réaliser la liaison des connexons entre les deux cellules adjacentes (Stewart, Simek et Laird, 2015). La Cx43, la Cx26, la Cx30 et la Cx32 sont présentes dans les glandes mammaires murines, alors que Cx26 et Cx43 le sont dans les glandes mammaires humaines (Laird, 2006 et McLachlan, 2007). La Cx43 est localisée dans la couche myoépithéliale, entre les cellules luminales et myoépithéliales,

ainsi que dans les fibroblastes du stroma (Dianati, 2016). La Cx26, la Cx30 et la Cx32 sont localisées entre les cellules luminales (Dianati, 2016).

1.4 Expression des connexines lors du développement de la glande mammaire

L'expression des Cxs peut changer au sein d'un même tissu en fonction du type de cellules, mais également en fonction du stade de développement de ce dernier. Ceci confirme l'existence de mécanismes de contrôle pouvant modifier l'expression des Cxs. De plus, les Cxs interagissent et sont co-immunoprecipitées avec une variété de structure et de molécules de signalisation. Dans la glande mammaire, chaque Cx a un profil d'expression particulier qui diffère selon le stade de développement de la glande mammaire (Dianati, 2016) (**Figure 1.9**).

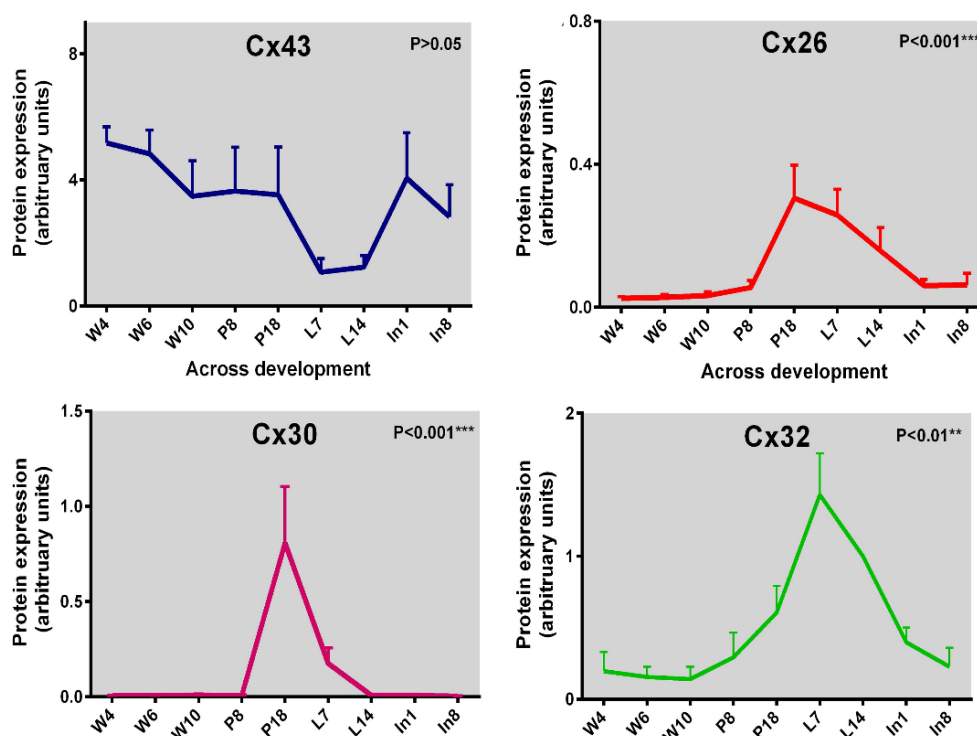


Figure 1.9 Niveau de protéines Cx43, Cx26, Cx30 et Cx32 au cours du développement de la glande mammaire. Les protéines totales ont été extraites à partir des glandes mammaires de souris à différents stades de développement. Les graphiques représentent la moyenne d'expression des Cxs normalisée au niveau des protéines totales (N=4) (modifié de Dianati, 2016). W4 : pré-puberté, W6 : puberté, W10 : Adulte, P8-18 : Grossesse, L7-14 : Lactation, In1-8 : Involution.

La Cx26, encodée par le gène *GJB2*, est exprimée dans la glande mammaire humaine et murine, majoritairement entre les cellules luminales (Dianati, 2016 ; El-Sabban et al., 2003). Cx26 n'est pas détectable entre la puberté et le début de la

grossesse, mais son expression augmente fortement vers la fin de la grossesse (Dianati, 2016). Son expression diminue progressivement jusqu'au début de l'involution (Dianati, 2016). L'expression de la Cx43 diminue durant le début de la phase de puberté et reste stable tout au long de la grossesse. L'expression de la Cx43 subit une diminution en fin de grossesse pour finalement réaugmenter lors de l'involution (Dianati, 2016). L'expression de la Cx30 est indétectable avant le début de la grossesse et pendant l'involution. Un pic d'expression est observé vers le jour 18 de la grossesse pour ensuite fortement diminuer jusqu'à la fin de la lactation (Dianati, 2016). La Cx32 a une expression très faible chez les souris vierges, mais augmente fortement à partir de la grossesse et durant la lactation pour ensuite diminuer vers la fin de cette phase (Dianati, 2016). Ces résultats suggèrent que l'expression des Cxs pourrait être liée aux variations hormonales associées aux différents stades de développement de la glande mammaire.

1.5 Régulation des jonctions communicantes

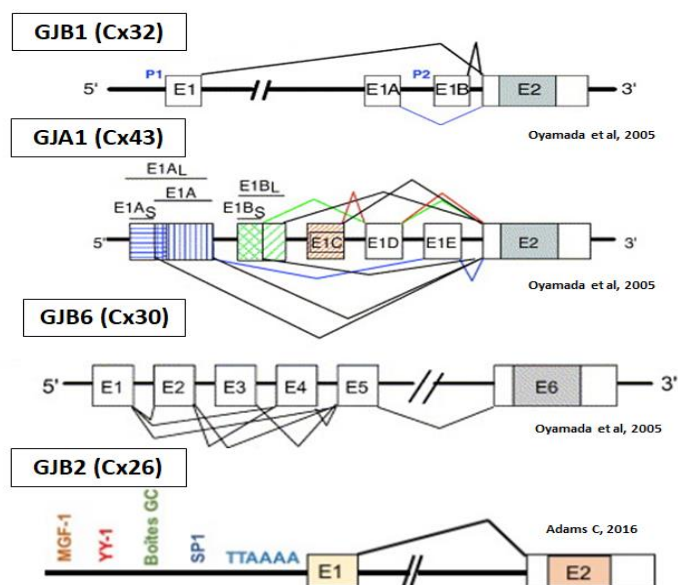


Figure 1.10 Représentation schématique des gènes *GJB1*, *GJA1*, *GJB6* et *GJB2*. *GJB1* est transcrite à partir de deux promoteurs différents P1 et P2 et est constituée de six exons. *GJB6* est constitué de six exons, dont seul l'exon 6 est codant. La région promotrice de *GJB6* a été identifiée en amont du premier exon. Le gène de *GJB2* possède deux exons E1 et E2 : un premier exon court et un second exon comportant toute la partie codante. Le promoteur de la *GJB2* est situé en amont de l'exon 1 et comporte plusieurs sites de liaison possibles aux facteurs de transcription MGF-1, YY1 et SP1. E : exon, P : Promoteur. (Tiré de Adams, 2016 et Oyamada, 2005).

Comme énoncé précédemment, l'expression des Cxs n'est pas identique à tous les stades de développement. Cette différence d'expression peut être liée à différents

mécanismes de régulation présents durant le cycle de vie des Cxs. Il a été démontré que l'expression des Cxs est régulée par des mécanismes épigénétiques, transcriptionnels et post-transcriptionnels (JA Mitchell, 2001 ; Oyamada, 2013), mais également par des interactions avec d'autres protéines (Dianati, 2016).

1.5.1 Structure des gènes codant pour les Cxs

La Cx26 est codée par le gène *GJB2*, présent dans la région 13q12.11 du chromosome 13 chez l'humain et du chromosome 14 chez la souris (Oyamada, 2005) (**Figure 1.10**). Le gène est constitué d'un premier exon non codant (200 pb), d'une grande région intronique (3 000 pb) puis d'un deuxième exon (composé d'une région codante de 128 pb suivi d'une région non codante de 22 pb) (Kiang, 1997). On retrouve cette organisation chez l'humain et chez la souris. Le promoteur de *GJB2* est localisé en amont du premier exon. Au niveau du promoteur, on retrouve, chez les deux espèces, six boîtes GC, deux boîtes GT ainsi qu'une région TTAAAA (Oyamada, 2005). Plusieurs sites de liaison sont accessibles à différents facteurs de transcription tels que Sp, YY1 ou MGF-1 (Kiang, 1997 et Tu, 1998).

La Cx43 est codée par le gène *GJA1* présent sur la région 6q22.31 du chromosome 6 humain et du chromosome 10 chez la souris (**Figure 1.10**). Le gène est constitué de six exons (Pfeifer, 2004). On retrouve chez la souris trois régions promotrices : une en amont du premier exon (P1), une dans le premier exon (P2) et la dernière en amont du troisième exon (P3) (Ochetebedu, 1999). Il a été montré que l'activation des promoteurs est dépendante des tissus. Par exemple, dans le cœur, P1 est activé dans l'ensemble de l'organe, P2 dans l'atrium/septum et P3 uniquement dans les ventricules (Oyamada, 2005). Le rôle de ces promoteurs dans les glandes mammaires est encore peu connu. Des sites de fixations pour c-Myc et HSP90 ont été identifiés chez la souris et le rat au niveau de P2. Chez l'humain, des sites de fixation pour AP-2, SP1, Ets-1 ont été mis en évidence (Carystinos, 2003) (**Figure 1.10**). D'autres sites pour HNF-1, NF-1 et C/EBP ont également été identifiés (Hennemann, 1992).

La Cx30 est codée par le gène *GJB6* présent sur la région 13q12.11 du chromosome 13 humain (14 chez la souris) (**Figure 1.10**). Il est constitué de six exons (autour de 100 pb pour les cinq premiers exons et 1 500 pb pour l'exon 6), dont un

seul est codant (exon 6). La région promotrice de *GJB6* a été identifiée en amont du premier exon. Elle contient une région TTAAAA (Essenfelder, 2005).

La Cx32 est codée par le gène *GJB1* présent sur région Xq13.1 du chromosome X humain et murin. *GJB1* est constitué de trois exons chez l'humain et quatre exons chez la souris (Oyamada 2005) (**Figure 1.10**). L'enchaînement des structures est très similaire à celui de *GJB2*, soit un premier exon non codant suivi d'une grande région intronique et enfin un deuxième groupe d'exons. Le promoteur est également en amont du premier exon. La transcription de ce gène est initiée à partir de deux promoteurs différents P1 et P2 (Oyamada 2005). P2 est présent dans l'intron et est activé dans les cellules nerveuses (Neuhaus, 1996). La région promotrice P1 possède plusieurs sites de fixation à des facteurs de transcription tels que Sp1/Sp3, NF-1 et YY1 (Field, 2003).

1.5.2 Régulation transcriptionnelle des connexines

La régulation transcriptionnelle des Cxs dans la glande mammaire murine est encore peu connue. Néanmoins, des études réalisées dans d'autres tissus ont permis d'identifier certains mécanismes régulateurs de la transcription des Cxs. Plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription (FTs) ont pu être identifiés au niveau des promoteurs des Cxs. Les FTs vont interagir avec les régions promotrices, activant ou inhibant la transcription des gènes.

1.5.2.1 Facteurs Sp

Les facteurs Sp sont des facteurs de transcription possédant un domaine reconnaissant les boîtes GC. Plusieurs sites de liaisons ont été identifiés sur les promoteurs de la Cx26, Cx32 et Cx43. Il a été montré que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 vont pouvoir se fixer au niveau du promoteur de la Cx43 et activer la transcription du gène (Oyamada, 2005). De plus, une mutation au niveau des sites de fixation Sp1 diminue significativement l'expression de la Cx43 dans le foie (Field et al., 2003). Sp1 va également jouer un rôle de régulateur en augmentant l'expression de la Cx26, en particulier dans les cellules mammaires humaines (Tu ZJ, 1998). Sp1 agit la plupart du temps comme un activateur de la transcription, alors que Sp3 peut agir à la fois comme un activateur ou un répresseur en fonction du type cellulaire où il se localise et du promoteur sur lequel il va se fixer.

1.5.2.2 Activator protein 1

Activator protein 1 (AP-1) est un homodimère ou un hétérodimère composé de Jun, Fos, ATF et MAF (Oyamada, 2005). AP-1 va activer la transcription des gènes en se fixant à des séquences consensus [TGAC (T/G) TCA] présentes au niveau des promoteurs. Plusieurs sites de fixation AP-1 ont été identifiés chez la souris et l'humain au niveau du promoteur de la Cx43 et Cx26.

1.5.2.3 Le facteur TFAP2A ou Activator protein 2 alpha

Le facteur de transcription TFAP2 se lie avec le promoteur du gène au niveau des boîtes GC à l'image de Sp1 (Adams, 2007). Dans l'épididyme de rat, TFAP2 agit comme un activateur de la transcription en augmentant l'expression de *GJB2* (Adams, 2007). Au niveau de la glande mammaire, TFAP2 augmente l'expression de *GJB2* durant la grossesse et en début de lactation (Tu, 2001).

1.5.2.4 E2F1

E2F1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des E2Fs. Il joue un rôle dans le cycle cellulaire, l'apoptose, et est considéré comme un suppresseur de tumeur (Worku, 2008). Une diminution du nombre de transcrit de E2F1 semble corrélée à une progression du cancer (Vuaroqueaux, 2007). Plusieurs sites de fixation sont présents sur le gène *GJB2*.

1.5.2.5 YY1

YY1 ou Yin Yang 1 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'activité des promoteurs de gènes cibles. Il peut recruter différents co-facteurs et peut ainsi réguler les mécanismes de méthylation et d'acétylation (Lee, 1995). YY1 est connu pour être dérégulé dans le cancer de la prostate (Deng, 2009). Des sites de fixation à YY1 ont été identifiés dans le promoteur des Cx32 et Cx43 (Adams, 2007). Une mutation dirigée au niveau des sites YY1 dans le promoteur P1 de la Cx43 induit une forte diminution de son expression dans les hépatocytes (Field, 2003).

1.5.3 Épigénétique

Plusieurs mécanismes dits épigénétiques vont être utilisés par les cellules pour contrôler temporairement l'expression des gènes (A Paksa · 2017). Un des mécanismes épigénétiques les plus fréquemment observés est la méthylation. On retrouve ces méthylations le plus souvent au niveau des îlots CpG (régions d'ADN enrichies en cytosine et en guanine). L'hyperméthylation des gènes des Cxs est souvent corrélée à une inactivation de ces gènes (Piechocki, 1999). Il a été montré à partir de cellules hépatiques que la méthylation des gènes des Cx32 et Cx43 était altérée dans le cancer du foie, permettant à certains FTs de se fixer à des régions des gènes des Cxs normalement inaccessibles (Piechocki, 1999). Ceci a également été montré dans la glande mammaire humaine, où des cellules cancéreuses possèdent un taux de méthylation du promoteur de la Cx26 plus faible que dans les promoteurs des cellules non tumorigénique (Tan, 2002).

1.5.4 Régulation de l'expression des Connexines par les hormones

Au niveau de la glande mammaire, les changements d'expression des Cxs présents majoritairement durant la grossesse et la lactation semblent similaires aux pics hormonaux observés durant cette même période. Ceci suggère que les hormones pourraient avoir un impact sur la régulation des gènes des Cxs dans la glande mammaire murine et humaine, telle que cela a été démontré dans d'autres tissus (K Zhao, 1996 ; Petrocelli and Lye, 1993 ; Chung, 2004). Par exemple, dans le myomètre, la progestérone diminue l'expression de la Cx43 alors que l'estrogène augmente son expression (Petrocelli and Lye, 1993). Cette augmentation se fait en parallèle à celle du FT c-Fos, suggérant la fixation de c-Fos sur son site de liaison présent sur *GJA1* (Piersanti, 1995). Plusieurs régions au niveau du promoteur de la Cx43 présentent des demi-sites de fixation aux récepteurs des estrogènes (Yu, 1994). Néanmoins, ces sites ne semblent pas requis pour la transcription de la Cx43 (Oltra, 2003).

1.6 Intéractome des connexines

Les Cxs ne permettent pas uniquement le passage de molécules entre deux cellules, mais interagissent également avec les protéines et les structures présentes dans leur environnement, telles que des molécules de signalisation. Par exemple, les Cxs se co-localisent et co-immunoprécipitent avec des protéines formant les jonctions serrées (claudines) et adhérentes (β -caténine, E-cadhérine P-cadhérine) (Dianati, 2017 ; Dianati, 2016).

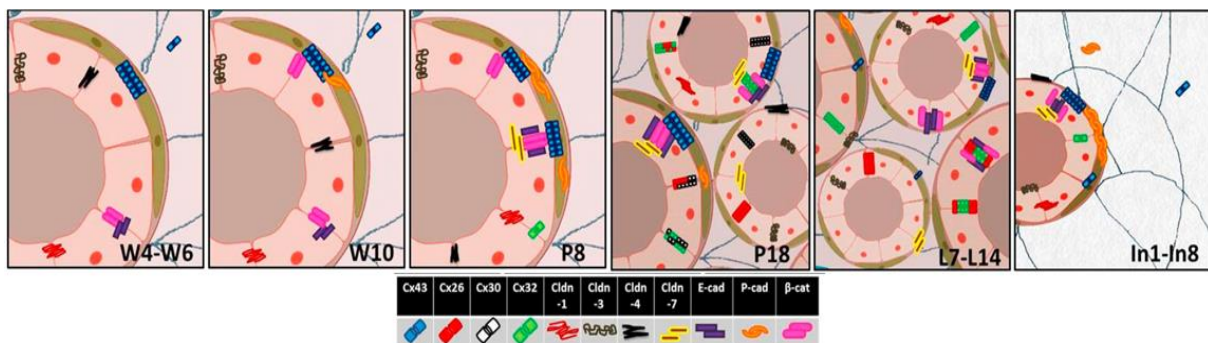


Figure 1.12 Interaction des connexines avec les protéines des jonctions cellulaires. Modèle schématique de la localisation des protéines de jonction et des interactions au cours du développement de la glande mammaire. W4 : prépuberté, W6 : puberté, W10 : Adulte, P8-18 : Grossesse, L7-14 : Lactation, In1-8 : Involution. (Dianati et al., 2016).

En plus des jonctions cellulaires, les Cxs interagissent avec plusieurs composants du cytosquelette (actine, α -spectrine, drébrine) ainsi que des kinases et des phosphatases (Laird, 2006). L'ensemble de ces interactions forme des nexus jonctionnels qui vont être régulés tout au long du développement de la glande mammaire (**Figure 1.11**) (Dianati et al., 2016). Il est probable que ces interactions vont permettre la régulation des Cxs ainsi que leur recrutement à des stades spécifiques.

SECTION 3. CANCER ET JONCTIONS INTERCELLULAIRES

1.7 Cancer du sein

Le cancer du sein est un des cancers les plus fréquemment diagnostiqués et la deuxième cause de mortalité chez la femme. On estime en 2020 que plus de 275 000 nouveaux cas de cancer du sein seront diagnostiqués. Ceci représente 13 % des décès dus à un cancer en 2020 (données de la Société nationale du cancer en 2019). Le cancer du sein touche les tissus mammaires au niveau des canaux galactophores et des lobules (Ganesh N. Sharmaj, 2010). Il existe plusieurs types de cancer qui diffèrent selon la localisation des tumeurs, mais également en fonction du profil d'expression moléculaire (PW Zhang, 2015). La communication cellulaire par les jonctions gaps est essentielle pour l'organisation de nos cellules et donc de nos tissus. Lorsqu'elle est altérée, ou lorsque l'expression des Cxs est modifiée, un développement anormal des glandes mammaires peut survenir et causer des pathologies telles que le cancer du sein.

1.8 Implication des connexines dans le cancer du sein

Si on s'intéresse aux études sur les Cxs dans le cancer, on constate une divergence quant à leur rôle dans le cancer du sein. Les Cxs étaient considérées, dans un premier temps, comme des suppresseurs de tumeur, supportant l'idée que les Cxs pourraient limiter la progression du cancer. La première identification de ce rôle date de 1991 (Lee, 1991). À partir de là, d'autres études ont démontré que les Cx26 et Cx43 étaient moins présentes dans les tumeurs ou dans les lignées cellulaires cancéreuses en comparaison avec les tissus normaux ou les lignées cellulaires non tumorigéniques (H Qin, 2002). Une baisse d'expression de la Cx43 dans les tissus de glande mammaire est corrélée avec une augmentation de l'apparition du cancer du sein (Laird, 1999 et Singal, 2000). Il a également été montré que les niveaux protéiques des Cx26 et Cx43 étaient plus faibles dans les lignées cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231 par rapport aux lignées cellulaires non tumorigéniques (Saghir, 2011 et McLachlan, 2007). De plus, plusieurs études suggèrent que la réexpression et la surexpression des Cxs pourraient ralentir la prolifération cellulaire et la croissance des tumeurs dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Talhouk, 2013).

Cependant, plusieurs évidences suggèrent maintenant que les Cxs pourraient également jouer un rôle de promoteurs de tumeur dans certaines circonstances. Les Cxs permettraient ainsi aux cellules cancéreuses de plus facilement transitées en un phénotype métastatique en favorisant leur migration, leur invasion ainsi que leur attachement à d'autres cellules cancéreuses (A Zhang · 2015). Cela a été montré une première fois en 1998 en regardant l'expression des Cxs dans les métastases. Il a alors été montré que la Cx43 et la Cx26 étaient surexprimées dans plus de 50% des cancers invasifs (Jamieson, 1998). Il a également été montré qu'une surexpression de la Cx43 dans la lignée cellulaire 4T1 permettrait aux cellules cancéreuses de plus facilement adhérer entre elles et ainsi former des tumeurs (Elzarrad, 2007). Enfin, une étude a mis en évidence qu'une grande majorité des tumeurs primaire avec de très faibles taux de Cx26, Cx30 et Cx43 ont commencé à exprimer fortement ces Cxs lors de l'apparition des métastases (Kanczuga-Koda, 2007). Ceci suggère que l'expression des Cxs serait plus forte durant les derniers stades de la progression du cancer.

Une étude récente de notre laboratoire a démontré que l'expression et le rôle de la Cx43 pouvaient en fait dépendre du sous-type de cancer du sein. Dans les cancers de type luminaux, l'expression de la Cx43 était très variable par rapport au tissu sain, puisque certaines tumeurs démontraient une surexpression de la Cx43, alors que d'autres avaient des taux très bas (Busby et al., 2018). Dans les tumeurs de sous-types Her2e et basales, les niveaux de Cx43 étaient diminués (Busby et al., 2018). De plus, de hauts niveaux de Cx43 étaient associés à un pronostic favorable dans les tumeurs lumineales, mais à un mauvais pronostic dans les tumeurs Her2e et basal (Busby et al., 2018).

Finalement, les études préliminaires, réalisées lors de mon stage précédent le début de ma maîtrise, suggèrent que l'expression de la Cx26 est en fait augmentée dans le cancer du sein chez l'homme, et ce, peu importe le sous-type de tumeurs, le grade ou le stade.

Ces résultats suggèrent une dérégulation des mécanismes contrôlant l'expression des Cxs lors du cancer du sein. Identifier ces mécanismes permettrait de mieux comprendre leur rôle dans le développement des glandes mammaires, et comment leur dérégulation influence la progression du cancer du sein.

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Comme énoncé précédemment, il a été démontré que l'expression des Cxs est modifiée durant les différentes phases de développement des glandes mammaires. Il existe donc des mécanismes de régulations modulant cette expression au cours des différentes étapes de développement. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans la glande mammaire pour contrôler le taux de Cxs dans les différents stades sont, à ce jour, peu connus. De plus, la communication intercellulaire par la GJIC joue un rôle important dans la signalisation cellulaire des tissus. Leur dérégulation est associée à plusieurs maladies, plus particulièrement le cancer. Le cancer du sein étant une maladie dépendante du statut des récepteurs hormonaux, comprendre comment ces hormones pourraient influencer l'expression des Cxs, est une piste intéressante de recherche.

De ce fait, l'hypothèse de base de ce projet est que l'expression des Cxs est modulée par différents mécanismes durant le développement des glandes mammaires. Nous supposons que les Cxs sont régulées par des mécanismes transcriptionnels liés à la signalisation hormonale, et par des interactions avec des protéines.

L'objectif global de cette étude avait pour but de mieux appréhender la régulation de l'expression des Cxs lors du développement dans la glande mammaire, et de comprendre comment leur dérégulation peut être associée à des anomalies développementales et à des pathologies. Des sous-objectifs ont été mis en place pour répondre à notre hypothèse.

- (1) Évaluer *in vivo* l'interactome des connexines dans le développement de la glande mammaire murine.
- (2) Évaluer l'impact *in vitro* des hormones sur l'expression des connexines au niveau de lignées cellulaires humaines.
- (3) Évaluer l'impact *in vitro* des hormones sur l'expression des gènes des connexines au niveau de lignées cellulaires humaines.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'ensemble des expérimentations a nécessité différentes approches *in vivo* et *in vitro*. Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur des tissus de glande mammaire de souris, les études *in vitro* ont été réalisées sur des lignées cellulaires humaines non tumorigéniques et cancéreuses.

2.1 Animaux

Des souris C57BL/6 ont été obtenues auprès de Charles River Canada (Saint-Constant, Québec, Canada) et maintenues quelques jours pour acclimatation. Les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO² suivi d'une ponction cardiaque. Les glandes mammaires ont été collectées à différents stades de développement : avant la puberté (semaine 4, W4), autour de la puberté (W6), au stade adulte (W10), durant le 8^{ième} jour (P8) et le 18^{ième} jour (P18) de la grossesse, durant la lactation au jour 7 (L7) et au jour 14 (L14) et enfin durant le 1^{er} jour (In1) et le 7^{ème} jour (In7) de l'involution. Pour chaque stade de développement, six souris ont été sacrifiées et les glandes mammaires récupérées. Des frottis vaginaux ont été effectués sur les souris femelles quotidiennement pour évaluer leur cycle menstruel. Les femelles W10 ont été sacrifiées en œstrus. Pour les stades de gestation, de lactation et d'involution, une souris mâle et trois souris femelles en œstrus ont été placées dans une cage pendant 24h. Les femelles démontrant la présence de sperme dans les frottis vaginaux après la cohabitation de 24h étaient considérées comme gestantes. Pour chaque souris, quatre paires de mamelles ont été récupérées : deux thoraciques, une abdominale et une inguinale. Les paires thoraciques et abdominales ont été utilisées en histologie ou enrobées en cryomatrice. Les glandes inguinales ont été stockées à -80°C pour être ensuite utilisées pour les différentes expériences de biologie moléculaire. Les glandes mammaires inguinales ont servi à réaliser les immunoprécipitations et les immunobuvardage de type western (western blot). Tous les protocoles animaux utilisés ont été approuvés par le Comité universitaire de protection des animaux.

2.2 Extraction de protéines sur tissus

Les tissus de souris stockés à -80°C ont été broyés à l'aide d'un homogénéisateur dans du tampon de lyse (Triple détergent : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0,02% sodium azide, 0,1% SDS, 1% Nonidet P40, 0,5%, sodium deoxycholate),

auquel a été rajouté des inhibiteurs de protéases afin d'inhiber la dégradation des protéines présentes dans les tissus (HaltProtease, Sigma Aldrich). Les lysats ont ensuite été centrifugés afin d'y enlever les lipides et les débris cellulaires. Les extraits protéiques contenus dans le surnageant ont été aliquotés et stockés à -80°C pour utilisation future.

2.3 Western blot

La concentration en protéines a été déterminée à l'aide la trousse d'analyse de protéines Pierce BiCinchoninic acid Assay (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, États-Unis). Les protéines totales ont été chargées sur des gels d'acrylamide TGX Stain-Free™ (Bio-rad, Mississauga, Ontario, Canada). Après la migration par électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de poly(fluorure de vinylidène (PVDF) grâce à un système de transfert (Trans-blot Turbo, Bio-Rad Laboratories). Les protéines totales présentes sur la membrane après le transfert ont été visualisées par le biais d'un système d'imagerie de gel (Chemidoc). Les membranes ont ensuite été bloquées dans du TBS-Tween contenant 5% de lait ou 5% d'albumine de sérum bovin (BSA), selon la ou les protéines étudiées. Les membranes ont été par la suite incubées toute la nuit à 4°C en agitation lente avec un anticorps dirigé contre la Cx étudié. Après lavage, un anticorps secondaire couplé à une enzyme fluorogène Horseradish Peroxidase (HRP) a été incubé avec la membrane PVDF pendant 1 heure.

La révélation a été faite par application d'un substrat luminescent, le Enhanced chemiluminescence (ECL ; Clarity™ western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad) sur la membrane placée dans le système d'imagerie ChemiDoc. Une deuxième révélation avec un second couple d'anticorps primaires/secondaires a été effectuée sur la même membrane afin d'observer les interactions cellulaires entre les protéines du complexe et les Cxs. Enfin, les signaux obtenus par WB ont été comparés aux protéines totales présentes sur les membranes, ceci dans le but de s'assurer qu'une quantité égale de protéines soit introduite dans chacun des puits.

2.4 Immunoprécipitation

Les lysats utilisés pour l'immunoprécipitation ont été préparés à partir de tissus surgelés tels que décrits plus haut. Les immunoprécipitation (IP) ont été réalisées par le biais de billes magnétiques (PureProteome™, Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Des IPs ont été réalisées avec des anticorps orientés contre les Cx26 (CX-1E8, Thermo fisher), Cx30 (#700–258, Life Technologies), Cx32 (#265–279, Sigma-Aldrich) et Cx43 (#C6219, Sigma-Aldrich)

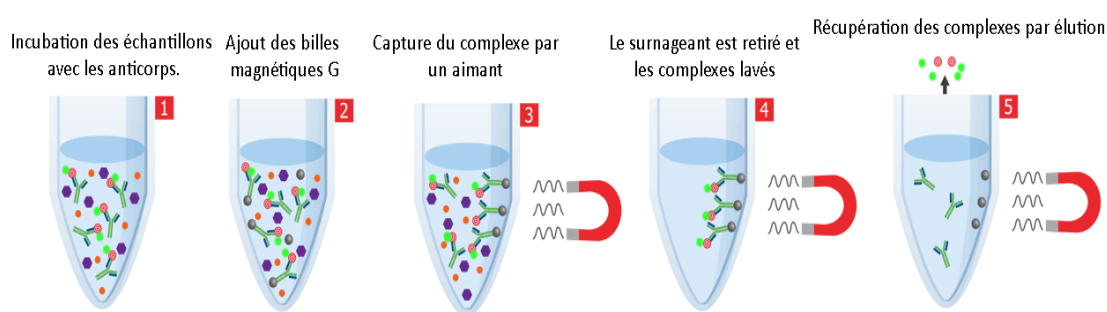


Figure 2.1 Représentations schématiques du protocole d'immunoprécipitation. Les lysats protéiques sont placés en incubation avec des anticorps orientés contre les connexines afin de créer un complexe anticorps/Cxs. Ce complexe est ensuite capté par des billes magnétiques et récupéré par le biais d'un aimant. La liaison du complexe avec les billes est enfin brisée par ajout d'un tampon d'élution.

En parallèle, des IPs ont été réalisées avec des anticorps IgG Rabbit (#3900, Cell Signaling) ou IgG Mouse (#5415, Cell Signaling) non spécifiques produits avec la même espèce que les anticorps orientés contre les Cxs. Ces contrôles négatifs ont permis de vérifier la spécificité des anticorps anti-Cxs. L'incubation des extraits protéiques avec les différents anticorps a été faite à 4°C toute la nuit à faible agitation. Ceci a permis aux anticorps de se fixer lentement aux Cxs à une faible température pour ne pas dégrader les protéines. Les billes magnétiques ont été ajoutées le lendemain aux complexes anticorps-protéines pendant 90 minutes. Les complexes billes-anticorps-protéines ont ensuite été récupérés par le biais d'un aimant afin de les séparer du reste du lysat. Le lysat a été gardé afin de contrôler que la capture des protéines spécifiques a bien été réalisée et que l'on n'en retrouve plus ou peu dans le lysat. Les complexes billes-anticorps-protéine ont ensuite été dissociés grâce à de la glycine à pH2. Cette dissociation permet de séparer les chaînes lourdes et légères

des IgGs présentes dans les échantillons et pouvant potentiellement interférer avec les analyses western blot subséquentes lorsqu'elles ont le même poids que les protéines analysées.

2.5 Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse

Une partie des échantillons obtenus par co-immunoprécipitation ont été envoyés à l'UQAM dans le laboratoire du Dre Lekha Sleno afin d'être analysés par Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). La LC-MS/MS avait pour but d'identifier des composés inconnus dans nos complexes protéiques précédemment obtenus par Co-IP.

2.6 Culture cellulaire : Cellules T47D

2.6.1 Mise en culture

La lignée cellulaire T47D (ATCC HTB-133) est une lignée de cellules épithéliales humaines cancéreuses de glande mammaire, immortalisée à partir de cellules d'une patiente de 54 ans atteinte d'un carcinome canalaire infiltrant du sein. Un vial de cellules a été décongelé dans un bain-marie à 37°C. Le contenu du vial a étéensemencé dans un T75 auquel a été ajouté 10 mL de milieu de culture RPMI sans rouge de phénol (ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Gibco), de glucose et d'HEPES agité doucement et incubé à 37°C avec 5% de CO².

2.7 Culture cellulaire : Cellules MCF10A

La lignée cellulaire MCF10A (ATCC CRL-10317) a été immortalisée à partir de cellules épithéliales humaines non tumorigéniques de glande mammaire d'une femme de 36 ans. Un vial de cellule a été décongelé dans un bain-marie à 37°C. Le contenu du vial a été transféré dans un tube de 15 mL auquel ont été ajoutés 10 mL d'un mélange de milieux MEM sans rouge de phénol, supplémentés de 100 ng de toxine du choléra ainsi que 10% de FBS, agité doucement. Le tube a été centrifugé à 120 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été enlevé et le culot a été suspendu dans 8 mL de milieu de culture puis les cellules ont étéensemencées dans un flacon de 75 cm² (T75) et incubées à 37°C avec 5% de CO² jusqu'à confluence

2.6.2 Passage

Les cellules ont été passées lorsque la confluence atteignait 90%. Les cellules ont été rincées avec du PBS 1X. 1.5 mL de trypsine-EDTA (ThermoFisher Scientific) a été ajouté et les cellules ont été placées à 37°C pendant 7 minutes afin de les décoller pour les mettre en suspension et de les dissocier. La trypsine a été ensuite inhibée avec 2.5 mL de milieu de culture. Les cellules ont ensuite été comptées avec un compteur de cellules TC20 (BioRad), puis ensemencées dans une nouvelle T25 (10^6 cellules) ou dans une plaque 6 puits (10^5 cellules/puits).

2.6.3 Traitements hormonaux

Pour tester l'impact des hormones (progestérone, œstrogène, prolactine et ocytocine) sur l'expression des Cxs, les cellules ont été exposées à différentes concentrations d'hormones.

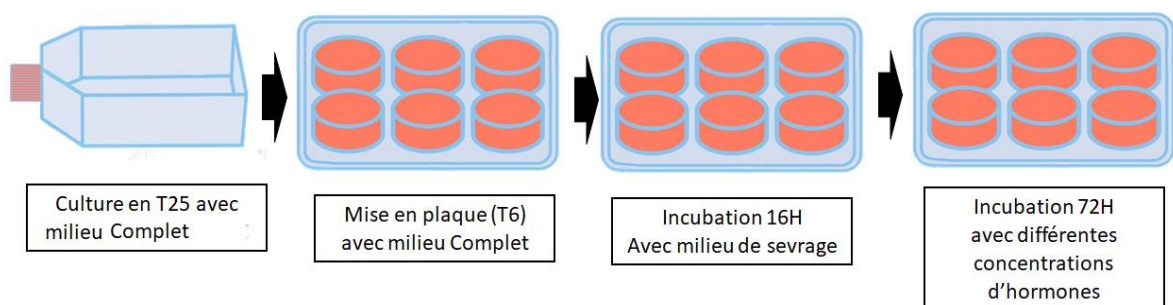


Figure 2.2 Protocole expérimentale des traitements hormonaux de 72 heures *in vitro*. Les cellules ont été placées en culture dans des plaques 6 puits jusqu'à une confluence de 70%. Après 16 heures de sevrage, différentes concentrations croissantes d'hormone ont été ajoutées au milieu de sevrage pendant une période de 72 heures. Les protéines cellulaires ont été extraites par le biais d'un tampon de lyse (voir la *section extraction de protéine*) puis détachées avec un grattoir à cellules.

Les flasques ont été incubés à 37°C et 5% de CO² pendant environ deux jours afin de laisser les cellules proliférer à une confluence de 60 %. De là, les cellules ont été lavées au Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), trypsinisées et ensemencées dans des plaques de six puits (~200 000 cellules / puits) en présence de milieux de sevrage (milieu complet supplémenté de 10% de FBS strippé) pendant 16 heures afin de retirer les hormones présentes dans le milieu.

Dans un premier temps, des traitements de 72 heures ont été effectués avec des concentrations croissantes d'hormones rajoutées au milieu de sevrage dans chacun des six puits (**Figure 2.2**). Ces concentrations d'hormones ont été basées sur les concentrations physiologiques retrouvées dans la glande mammaire murine durant la grossesse et la lactation. Ainsi, des concentrations entre 0 et 200 ng/ μ L pour la prolactine (DS Park, 2002 ; CM Perks, 2004), l'estrogène et la progestérone (J-M. Tia, 2018 ; MO Joly-Pharaboz, 1990) et entre 0 et 100 ng/ μ L pour l'ocytocine (DS Park, 2002) ont été utilisés. Les cellules ont été récoltées pour analyse.

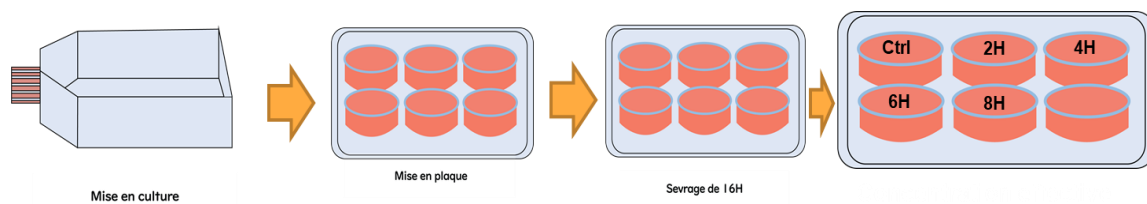


Figure 2.3 Protocole expérimental des traitements hormonaux de 2-8 heures in vitro. Les cellules ont été placées en culture dans des plaques 6 puits jusqu'à une confluence de 70%. Après 16 heures de sevrage, une concentration fixe d'hormone a été ajoutée au milieu de sevrage pendant une période de 2 à 8 heures. L'ADN des cellules a été extrait par le biais d'un kit d'extraction (voir la section extraction d'ADN).

Dans un deuxième temps, les cellules ont été traitées pendant à une seule concentration d'hormones, basée sur le signal maximal obtenu dans les expériences précédentes, et traitées pendant 0, 2, 6 et 8 heures (**Figure 2.3**). Les cellules ont été ensuite récoltées et analysées.

2.8 Extraction de protéine sur cellules

Les protéines des cellules ont été extraites à l'aide d'un tampon de lyse (triple détergent décrit précédemment). Les cellules ont été incubées dans le tampon de lyse pendant 5 minutes sur glace et ont ensuite été récoltées à l'aide d'un grattoir. Le lysat a été centrifugé à 2500 RPM, le surnageant aliquoté puis stocké à -80°C. Les lysats ont été quantifiés par dosage BCA et analysés par western blot, tel que décrit précédemment.

2.9 Extraction d'ARN

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide d'une trousse Aurum™ ARN total (BIO-RAD) suivant les instructions données par le fabricant. La concentration d'ARN a été quantifiée avec le NanoDrop™ One/OneC (Thermo Scientific), alors que la pureté et la qualité des échantillons ont été évaluées en utilisant la trousse Experion d'analyse RNA StdSens (système d'électrophorèse automatisé Experion™ BIO-RAD).

2.10 RT-qPCR

L'ARN a été converti en ADNc à l'aide d'une trousse de synthèse d'ADNc iScript™ (BIO-RAD). Pour obtenir le seuil de cycles idéal (CT), différentes concentrations d'ADNc ont d'abord été amplifiées à l'aide de SsoFast™ EvaGreens Supermix (BIO-RAD) suivant les instructions du fabricant. L'expression des gènes a ensuite été quantifiée selon les conditions optimisées pour chacun des gènes en utilisant logiciel de gestion Bio-Rad CFX Maestro. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt (Cx26, Cx30, Cx32 et Cx43 ; Tableau 1.3) ont été normalisés aux gènes de référence (GAPDH, FABP3, FABP4, PUM, UXT) (**Table 1.4**) choisis en fonction de leur stabilité lors des différents traitements.

2.11 Droplet digital PCR (ddPCR)

L'analyse en ddPCR a été réalisée selon les recommandations du fabricant. Le mélange réactionnel utilisé contenait 1x d'EvaGreen ddPCR Supermix, 150 nM d'amorces forward/reverse et 0,01–16 ng d'ADNc matrice. Pour la génération de gouttelettes, 20 µL de mélange réactionnel et 70 µL d'huile de génération de gouttelettes (EvaGreen) ont été chargés dans la cassette de génération de gouttelettes, qui a été ensuite placée dans un générateur de gouttelettes. Chaque mélange de réactions de PCR (40 µL) a été transféré sur une plaque de PCR à 96 puits, qui a été scellée avec une feuille de chaleur en utilisant le scellant pour plaque de PCR PX1 (Biorad). L'amplification a été réalisée dans un cycleur thermique C1000 Touch après une activation initiale de l'ADN polymérase (95 ° C, 5 min) et 40 cycles consistant en une dénaturation de l'ADN (95 ° C, 30 s), un annealing (57 ° C, 1 min) et une extension (60 ° C, 1 min). Les gouttelettes ont été lues avec un lecteur QX200 et analysées à

l'aide du logiciel QuantaSoft (Bio-Rad). Les valeurs sont rapportées en tant qu'unités géniques d'ADNc par unités l'ADNc total.

2.12 Tests statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) et Rstudio (langage R). Pour les données à distribution normales, une p-value (p) a été calculée en utilisant des tests de variances ou ANOVA (test paramétrique) suivie d'un ajustement des valeurs par test de comparaison multiple. Pour les données ne suivant pas la distribution normale, les tests non paramétriques ont été effectués (test de Kruskal-wallis). Une valeur de $P < 0.05$ a été considérée comme significative.

Table 2.1 Liste des anticorps utilisée pour les immunobuvardage de type Western.

	Anticorps	Compagnie	#catalogue	Espèce	Dilution	Agent bloquant
Anticorps primaires	Cx26	LSBIO	LS-B5511	Souris	1/500	3% BSA
	Cx30	Invitrogen	71-2200	Lapin	1/500	3% BSA
	Cx32	Sigma-Aldrich	C3470	Lapin	1/500	3% BSA
	Cx43	Sigma-Aldrich	C6219	Lapin	1/1000	5% lait
	Stat5	Cell Signaling	9363	Lapin	1/1000	5% lait
	P-Stat5	Cell Signaling	4322	Lapin	1/1000	5% lait
	Estrogen Receptor A	Cell Signaling	8644	Lapin	1/1000	5% lait
	Ocytocin Receptor	EMD Milipore	ABN297	Lapin	1/1000	3% BSA
	Progesteron receptor A	Cell Signaling	8757	Lapin	1/1000	5% lait
	Progesteron receptor B	Cell Signaling	3176	Lapin	1/1000	5% lait
Anticorps secondaire	Prolactin Receptor	Cell Signaling	13552	Lapin	1/1000	5% lait
	Anti-rabbit IgG-HRP	Cell Signaling	7074s	Chèvre	1/10000	5% lait
	Anti-Mouse IgG-HRP	Cell Signaling	7076s	Chèvre	1/10000	5% lait

Table 2.2 Liste des anticorps utilisés pour les immunoprécipitations

	Anticorps	Compagnie	#catalogue	Espèce	Dilution
Anticorps primaires	Cx26	LSBIO	LS-B5511	Souris	1/40
	Cx30	Invitrogen	71-2200	Lapin	1/40
	Cx32	Sigma-Aldrich	C3470	Lapin	1/40
	Cx43	Sigma-Aldrich	C6219	Lapin	1/50
Anticorps contrôles	rabbit (DA1E) mAb IgG Isotype	Cell Signaling	3900	Lapin	1/400
	mouse (G3A1) mAb IgG Isotype control	Cell Signaling	5415	Souris	1/400

Table 2.3 Liste des amorces utilisées pour les PCR en temps réel (RT-qPCR) et les droplet digital PCR (ddPCR)

Amorces (humain)		
Gène	Sens (5' – 3')	Anti-sens (5' – 3')
<i>GJB2</i>	TCCCGACGCAGAGCAA	GCAGGGTGTTCAGACAAAG
<i>GJB6</i>	CACTCCAGTGGGGTAGGAGA	GCGCTGGTTTATCCCTGAGT
<i>GJB1</i>	GACAGGGAGGTGTGAATGAGG	GGCAGTAGAATGCCGGTTCA
<i>GJA1</i>	TACCAAACAGCAGCGGAGTT	TGGGCACCACTCTTTTGCTT

Table 2.4 Liste des gènes de référence utilisée pour les PCR en temps réel (RT-qPCR)

Amorces (humain)		
Gène	Sens (5' – 3')	Anti-sens (5' – 3')
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	GGAAGATGGTGTATGGGATTTTC
<i>PUM1</i>	AGTGGGGGACTAGGCGTTAG	GTTTTCATCACTGTCTGCATCC
<i>FABP3</i>	GATGACAGGAAGGTCAAGTCGG	GTAAGTCCGAGTGCTCACCA
<i>FABP4</i>	AAGCTGGTGGTGGAAATGTGTC	AAATTTTCAGTCCAGGGCCTCGT
<i>UXT</i>	TGAGCGACTCCAGGAAGCTA	GGGACCACTGTGTCAACGAA

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Étude de l'interactome des connexines dans le développement de la glande mammaire murine

Un premier objectif a été d'identifier *in vivo*, les protéines présentes dans la glande mammaire murine pouvant interagir avec les différentes Cxs afin d'avoir une vue d'ensemble de l'interactome des Cxs. Il a s'agit, dans un premier temps, d'extraire les protéines des glandes mammaires à différents stades de développement, puis d'isoler les complexes protéiques couplés aux Cxs par co-immunoprécipitation (Co-IP). Ensuite, deux différentes approches ont été utilisées pour identifier les protéines interagissant avec les Cxs. Les complexes protéiques isolés ont été étudiés, d'une part, par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) afin d'obtenir une liste des protéines immunoprécipitées avec les Cxs. D'autre part, les Co-IP ont été analysées par western blot afin d'optimiser et de confirmer les résultats obtenus par LC-MS/MS.

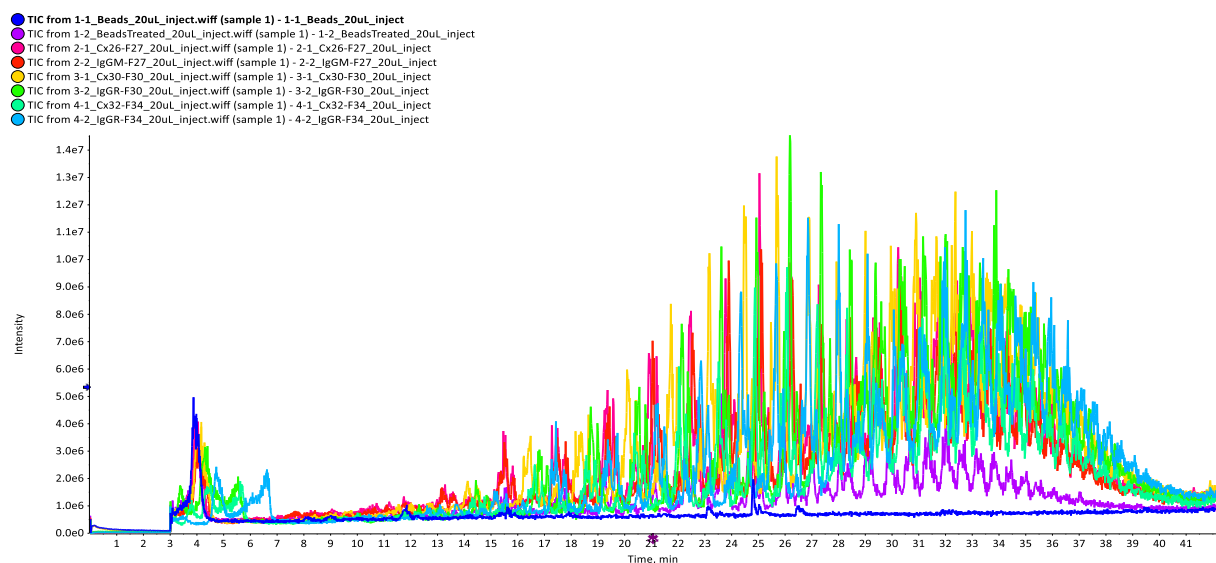


Figure 3.1 Résultats LC-MS/MS des complexes protéiques associés aux connexines 26 (en rouge), 30 (en jaune) et 32 (en vert). Les complexes Cxs/protéines ont été analysés par LC-MS dans le laboratoire du Dre Lekha Sleno à l'UQAM. Chaque profil protéique des Cxs a été comparé à un contrôle igG de l'animal d'où provient chacun des anticorps. Cx26 : IgG Souris ; Cx30/Cx32 : IgG Rabbit.

Nos premières analyses par LS-MS/MS ont montré une multitude de pics d'intensité variable indiquant une contamination par polymères (**Figure 3.1**) et n'étaient donc pas analysables. Nous avons supposé que certains paramètres de

notre protocole expérimental devaient être adaptés pour permettre de correctement récupérer nos complexes protéiques. De ce fait, nous avons donc procédé à plusieurs phases d'optimisation à différent niveau (tampon lyse, billes magnétiques. et tampon d'éluion) (**Table 3.1**).

TAMPON DE LYSE		Billes	
Tampon triple buffer (Maniatis)	Tampon Test	Milipore	Pierce
SDS	Triton	Proteine G	Protein A/G
NONIDET	Glycerol	Magnétique	
Sodium deoxycholate	EGTA	TAMPON D'ELUTION	
TRIS, NaCl		Glycine	IgG éluion buffer

Table 3.1 Tableau de comparaison des différentes optimisations des co-immunoprécipitations. La composition du tampon de lyse triple buffer, couramment utilisé dans le laboratoire, a été modifiée pour permettre une meilleure lyse des connexines. Les billes magnétiques G de la compagnie Milipore Sigma ont été comparées aux billes magnétiques A/G à plus haut rendement de la compagnie Fisher. Enfin notre tampon d'éluion à la glycine a été comparé à un tampon d'éluion IgG spécifique permettant notamment de diminuer le bruit des IgG non spécifiques.

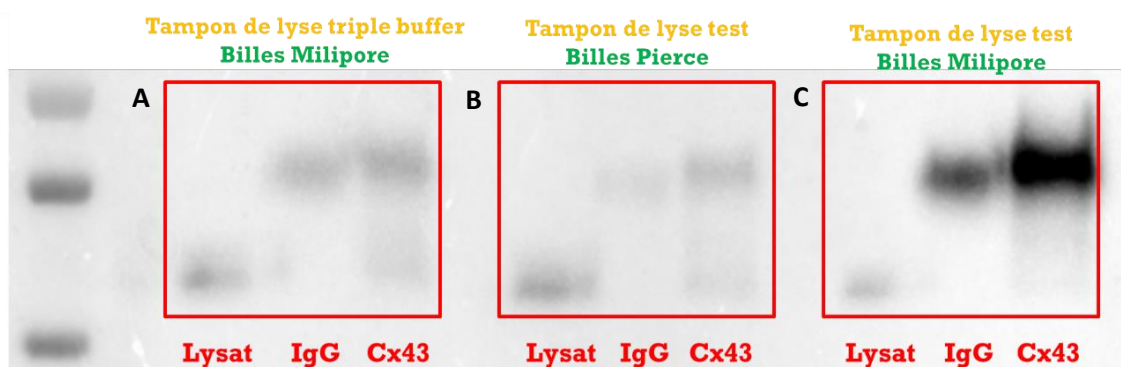


Figure 3.2 Résultats des comparaisons des différents tampons de lyse (A, C) et des billes magnétiques (B, C). Les résultats ont été obtenus par western blot après une immunoprécipitation de la Cx43. Chaque blot est divisé en 3 colonnes : le lysat total, le contrôle négatif IgG et la bande de la Cx43. (A) illustre le résultat obtenu avant optimisation. (B) montre le résultat obtenu après avoir utilisé le nouveau tampon de lyse ainsi que les nouvelles billes. (C) est le résultat des anciennes billes avec le nouveau tampon d'éluion.

En premier lieu, nous avons modifié la composition de notre tampon de lyse permettant de récupérer les protéines présentes dans les glandes mammaires murines. Le but recherché était d'augmenter le rendement de Cxs extraite des tissus de souris. Après analyse par western blot, nous avons constaté une meilleure capture de nos complexes protéiques (**Figure 3.2C**). On observe néanmoins un signal présent également pour le contrôle IgG qui montre que la capture n'est pas parfaitement spécifique. En second lieu, des billes magnétiques provenant d'un autre fournisseur et de composition différente ont été utilisées pour permettre une meilleure capture des Cxs. Néanmoins le changement de billes n'a pas donné de résultat probant (**Figure 3.2B**). Enfin un dernier test a été effectué en changeant de tampon d'éluion dans le but de retirer le bruit de fond de notre contrôle négatif IgG. Les résultats obtenus ont été moins concluants que pour notre première solution d'éluion (**Figure 3.3**). Malgré toutes ses mises au point, les analyses LC-MS/MS démontraient toujours une contamination de polymères. Ainsi, bien que les IP soient efficaces, d'autres optimisations devront être faites pour analyser correctement les interactomes des Cxs.

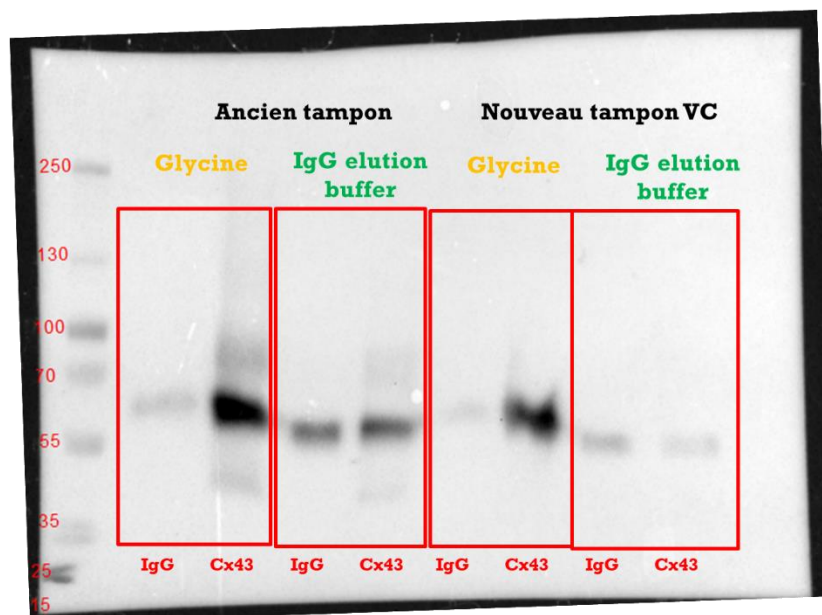


Figure 3.3 Résultats des comparaisons des différents tampons d'éluion entre nos deux tampons de lyse. Les résultats ont été obtenus par western blot après une immunoprécipitation de la Cx43. Chaque blot est divisé en 2 colonnes : le contrôle négatif IgG et la bande de la Cx43. A gauche, les résultats obtenus sur l'ancien tampon de lyse, à droite ceux du nouveau tampon de lyse.

3.2 Effet d'une exposition hormonale sur les niveaux protéiques des connexines

L'action des hormones sur l'expression des Cxs a été évaluée par les traitements sur les cellules T47D avec différentes concentrations de 4 différentes hormones : la prolactine, la progestérone, l'ocytocine et les estrogènes. Les traitements ont d'abord été réalisés sur des durées de 72 heures. Bien qu'à la base de nos expérimentations, nous voulions tester l'influence des hormones sur la lignée MCF10A, les premiers résultats obtenus par analyses en western résultats n'ont pas été suffisamment concluant pour pouvoir être analysé. En effet, les niveaux de Cxs sont très bas, voire indétectables, dans cette lignée, et les traitements hormonaux n'ont pas augmenté les niveaux de façon à ce qu'ils soient détectables. De ce fait, seuls les résultats des T47D seront montrés dans ce chapitre.

3.2.1 Effets d'un traitement à la prolactine sur les jonctions communicantes dans les cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

Afin de déterminer si la prolactine joue un rôle dans la régulation de l'expression des Cxs et du récepteur à la prolactine (PrIR) au cours du développement de la glande mammaire, des doses croissantes (0, 12, 25, 50, 100, 200 ng/mL) de prolactine ont été ajoutées au milieu de culture de sevrage. Nous avons d'abord évalué les effets du traitement sur PrIR. Une augmentation dose-dépendante des niveaux protéiques a été observée suivant le traitement, qui était significative à 50 ng/mL (**figure 3.4A**). En parallèle nous avons confirmé que le traitement à la prolactine activait bien la voie jak/STAT, en analysant les niveaux protéiques de Phospho-STAT5 (p-STAT5). Ici encore, une augmentation dose-dépendante des niveaux protéiques de p-STAT5 a été observée, validant l'efficacité du traitement (**figure 3.4B**).

Au niveau de l'expression de la Cx43, une seule bande spécifique à la Cx43 a été détectée autour de 43 kD. Une diminution dose-dépendante a été observée à partir de 50 ng/mL, qui devient significative à la concentration de 200 ng/mL (**figure 3.4C**). Les niveaux d'expression de la Cx26, Cx30 et Cx32, dans les cellules non traitées étaient bas, et le traitement à la prolactine n'a pas eu d'impact sur leur expression. (résultats non présentés).

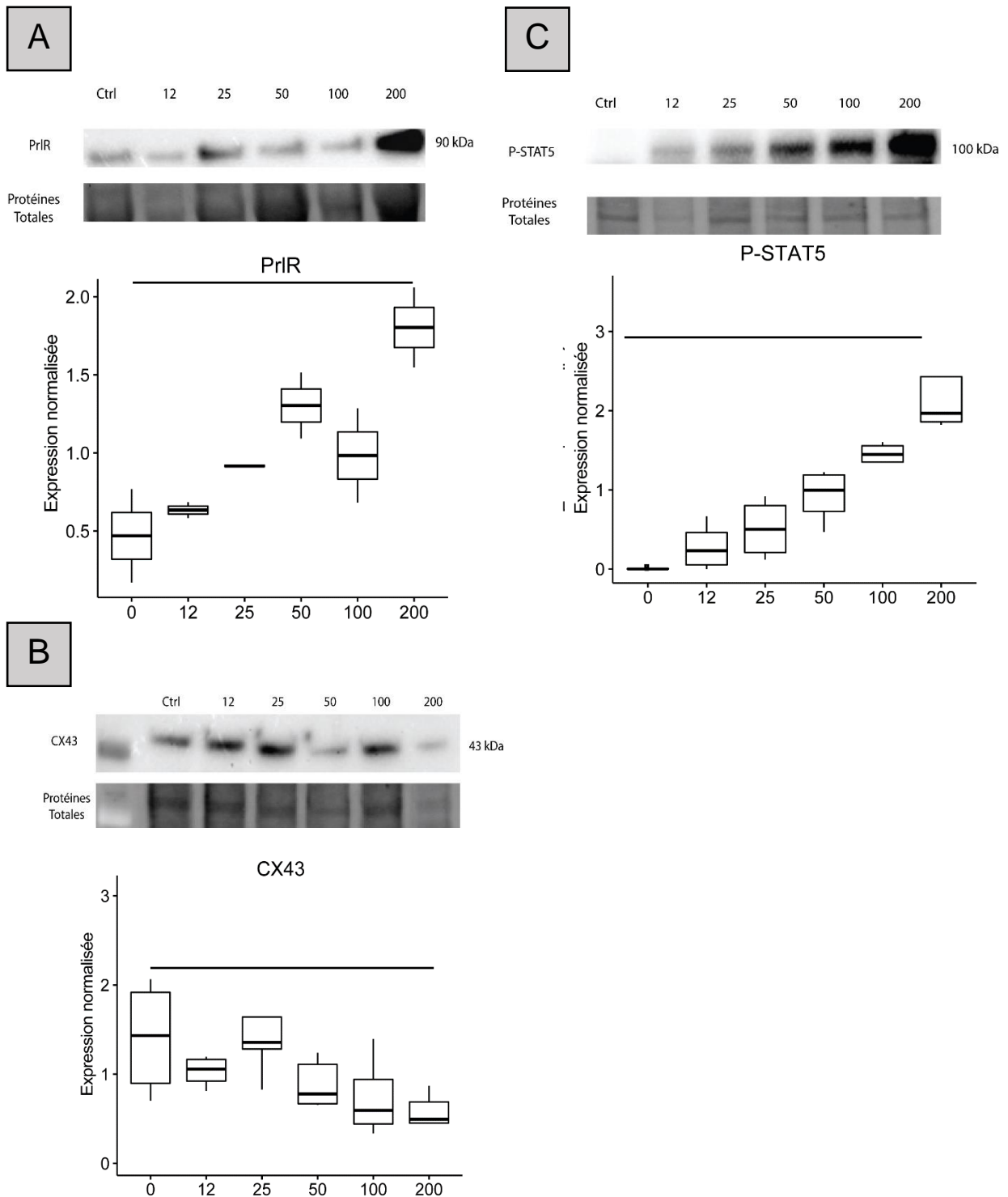


Figure 3.4 Effets d'un traitement à la prolactine sur les niveaux protéiques du récepteur à la prolactine PrIR (A), de Cx43 (B), et de p-STAT5 (C). Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations de 0 à 200 ng/mL de prolactine au terme d'un sevrage de 16 heures. Les protéines ont été extraites après 72 heures de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. La barre noire représente une différence significative entre deux groupes ($p < 0.05$). (n=5)

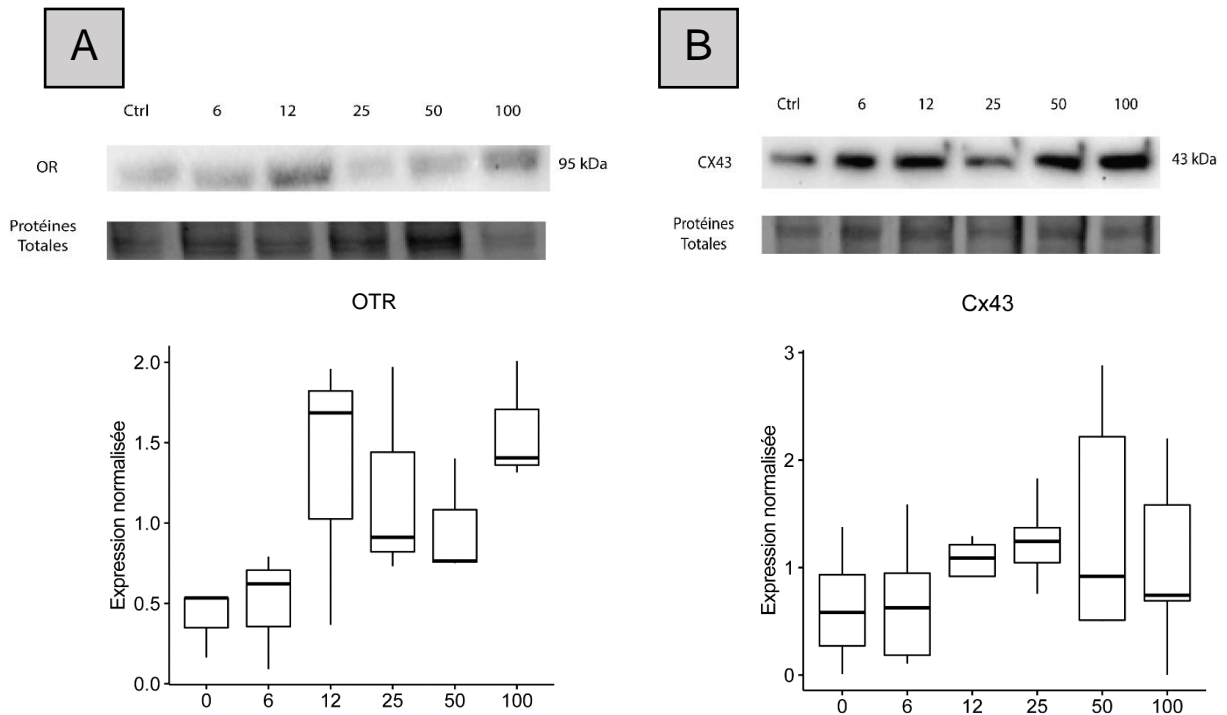


Figure 3.5 Effets d'un traitement à l'ocytocine sur les niveaux protéiques du récepteur à l'ocytocine OTR (A) et de Cx43 (B). Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations de 0 à 100 ng/mL d'ocytocine au terme d'un sevrage de 16 h. Les protéines ont été extraites après 72 heures de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. (n=5)

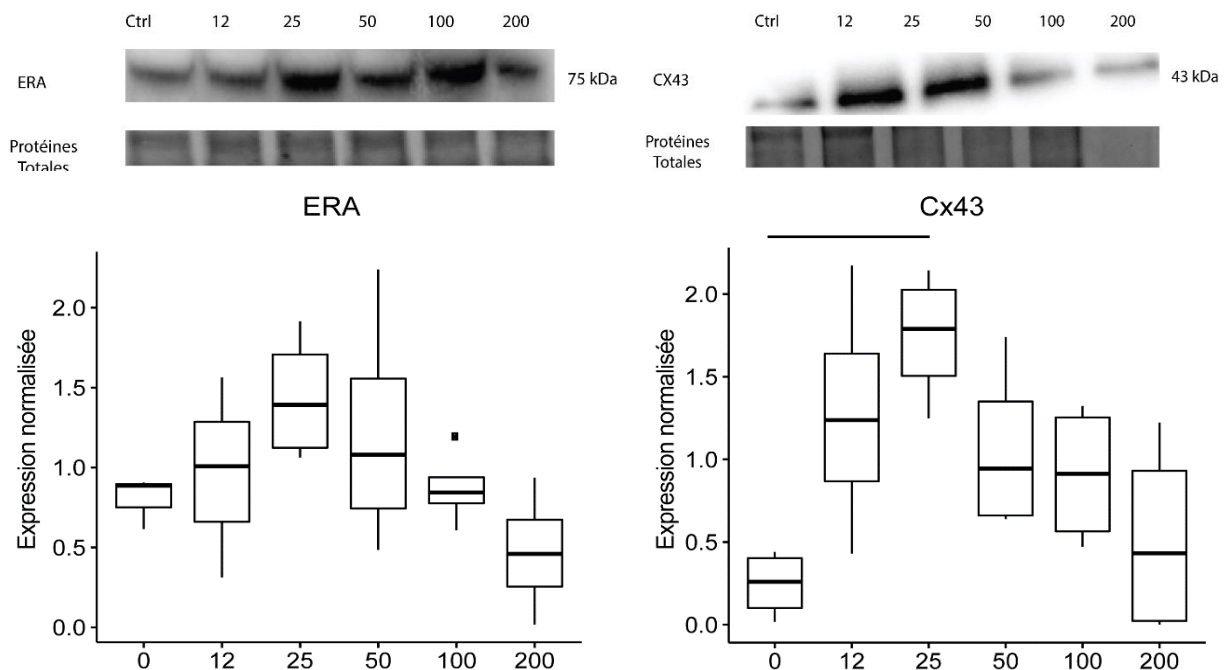


Figure 3.6 Effets d'un traitement à l'estradiol sur les niveaux protéiques du récepteur aux estrogènes ER α (A) et de Cx43 (B). Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations de 0 à 200 ng/mL d'estradiol au terme d'un sevrage de 16 h. Les protéines ont été extraites après 72 heures de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. La barre noire représente une différence significative entre deux groupes ($p < 0.05$). (n=5)

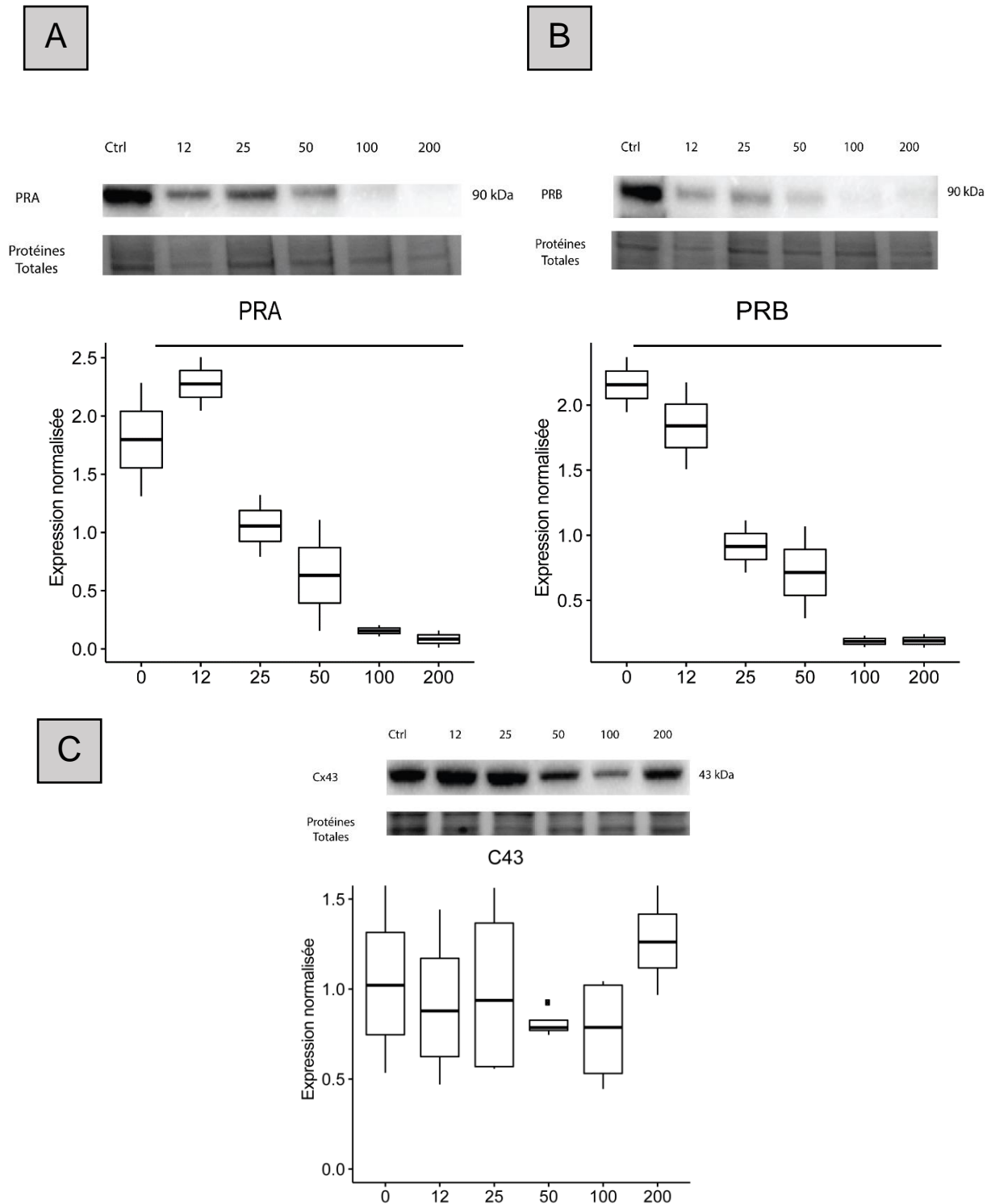


Figure 3.7 Effets d'un traitement à la progestérone sur les niveaux protéiques des récepteurs à la progestérone PRA (A), PRB (B) et de Cx43 (C). Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations croissantes de 0 à 200 ng/mL de progestérone au terme d'un sevrage de 16 heures. Les protéines ont été extraites après 72 heures de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. (n=5)

De même, dans le but de déterminer si l'ocytocine joue un rôle dans la régulation de l'expression des Cxs des doses (0, 6, 12, 25, 50, 100 ng/mL) d'ocytocine ont été ajoutées au milieu de culture de sevrage. Suite au traitement, les niveaux protéiques du récepteur OTR augmentent à partir de l'exposition à 12 ng/mL d'ocytocine et restent élevés jusqu'à 100 ng/mL (**figure 3.5A**).

Au niveau de l'expression de la Cx43, aucune variation significative dans les niveaux protéiques n'a été observée suite au traitement à l'ocytocine (**figure 3.5B**). Il semble, néanmoins, y avoir une tendance à l'augmentation entre 12 et 100 ng/mL, mais celle-ci est masquée par la variabilité des résultats obtenus. Ici encore, le traitement à l'ocytocine n'a pas eu d'impact sur l'expression de Cx26, Cx30 et Cx32 (résultats non présentés).

3.2.2 Effets d'un traitement à l'estradiol sur les jonctions communicantes dans des cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

L'effet de l'estradiol dans la régulation de l'expression des Cxs a ensuite été étudié suite à une exposition à des doses croissantes d'estradiol (0, 12, 25, 50, 100, 200 ng/mL). Au niveau de son récepteur ER α , on constate une augmentation de l'expression dose-dépendante entre 12 et 25 ng/mL. Les niveaux redescendent à partir de 50 ng/mL pour revenir à un niveau basal et même plus bas à 200 ng/mL (**figure 3.6A**). De façon intéressante, les niveaux de Cx43 suivent la même tendance que ER α . Une augmentation significative a été observée à concentration de 25 ng/mL (**figure 3.6B**). Cependant dès 50 ng/mL les niveaux redescendent pour revenir à un niveau presque basal à 200 ng/mL. Ici encore, le traitement à l'estradiol n'a pas eu d'impact sur l'expression de Cx26, Cx30 et Cx32 (résultats non présentés).

3.2.3 Effets d'un traitement à la progestérone sur les jonctions communicantes dans des cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

Afin de déterminer si la progestérone joue un rôle dans la régulation de l'expression, des Cxs des doses (0, 12, 25, 50, 100, 200 ng/mL) de progestérone ont été ajoutées au milieu de culture de sevrage. Au niveau de ses récepteurs PRA et PRB, on constate une diminution dose-dépendante de l'expression des 2 récepteurs à partir de 12 ng/mL de progestérone pour PRB et de 25 ng/mL pour PRA. Les niveaux restent à un niveau très faible et stable jusqu'à 200 ng/mL (**figure 3.7A**). Aucune

variation dans les niveaux protéiques de Cx43 n'a été observée suite au traitement à la progestérone (**figure 3.7C**). On constate néanmoins beaucoup de variabilité au niveau des résultats. De façon similaire, aucun effet n'a été observé pour les niveaux de Cx26, Cx30 et Cx32 (résultats non montrés).

3.3 Effet d'une exposition hormonale sur l'expression des gènes des connexines

L'action des hormones sur l'expression des gènes des connexines, *GJA1* (Cx43), *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30), *GJB1* (Cx32) a été évalué par les traitements sur les cellules T47D avec différentes concentrations effectives de 4 différentes hormones : la prolactine (200 ng), la progestérone (100 ng), l'ocytocine (12 ng) et les estrogènes (25 ng). Les traitements ont été réalisés sur des durées de 2 à 8 heures.

De même que pour les études protéiques, nos résultats en RT-qPCR et ddpCR ont confirmé que les niveaux d'expression de *GJB2* (Cx26) sont bas (**Figure 3.8**), et très bas ou inexistantes pour *GJB6* (Cx30) et *GJB1* (Cx32), dans les cellules T47D. On observe néanmoins une tendance à l'augmentation du nombre de copies de *GJB2* entre 2 et 4 heures de traitement à la prolactine. Ceci serait conforme à l'augmentation observée de l'expression de Cx26 durant la lactation dans les tissus, mais ce résultat ne peut être confirmé faute de l'existence de gènes de référence stable au moment où nous avons effectué ces tests préliminaires.

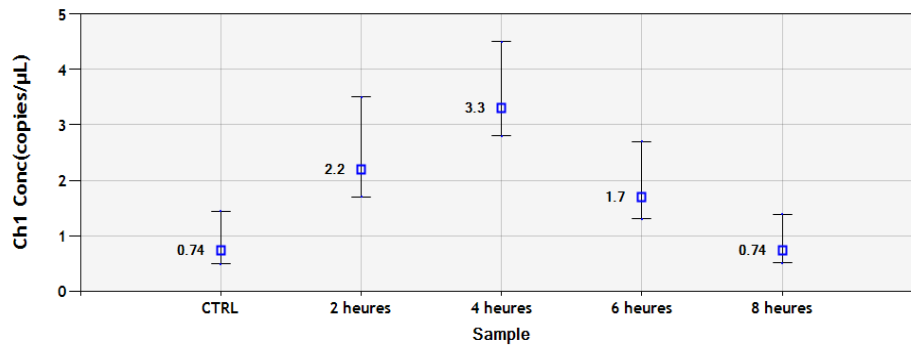


Figure 3.8 Études préliminaires des effets d'un traitement à la prolactine sur l'expression de GJB2 (Cx26). Les cellules T47D ont été exposées à une concentration de 200 ng/mL de prolactine au terme d'un sevrage de 16 h. Les cellules ont été lysées et l'ARNm a été extrait après 0, 2, 4, 6 et 8 heures de traitement avec un kit commercial. L'ARNm a ensuite été converti en ADN par transcription inverse (RT) puis amplifié et analysé par ddPCR avec les amorces spécifiques à GJB2. Les concentrations sont exprimées en copie par μl (non normalisé).

3.3.1 Effets d'un traitement à la prolactine sur les niveaux de GJA1 dans des cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

Afin de déterminer si la prolactine joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de GJA1, une dose de 200 ng/mL de prolactine, soit la dose à laquelle la diminution maximale de Cx43 avait été observée, a été ajoutée au milieu de culture de sevrage.

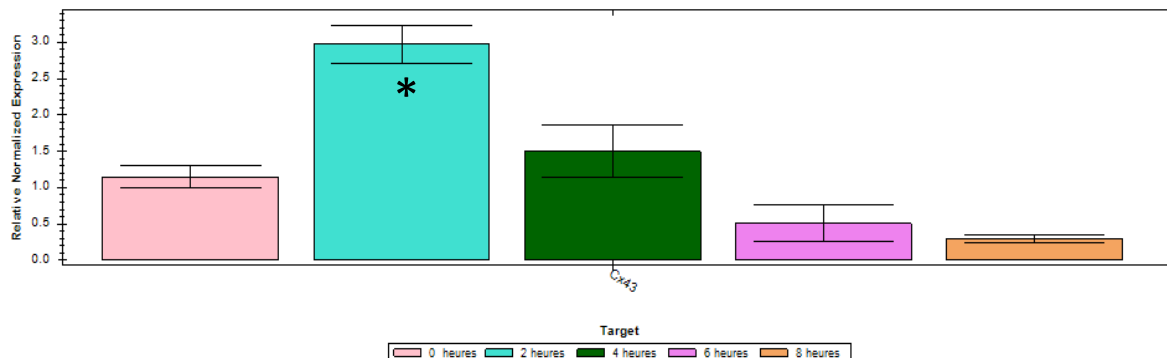


Figure 3.9 Effets d'un traitement à la prolactine sur l'expression de GJA1 (Cx43).

Les cellules T47D ont été exposées à une concentration de 200 ng/mL de prolactine au terme d'un sevrage de 16 h. Les cellules ont été lysées et l'ARNm a été extrait après 0, 2, 4, 6 et 8 h de traitement avec un kit commercial. L'ARNm a ensuite été converti en ADN par transcription inverse (RT) puis amplifiée par RT-qPCR en temps réel avec les amorces spécifiques à GJA1. Les niveaux d'expression de GJA1 ont été déterminés par la méthode $\Delta\Delta\text{Ct}$. Les données ont été normalisées en utilisant les gènes UXT et FABP3. Les données sont exprimées en la moyenne par erreur standard. L'étoile représente une différence significative par rapport au contrôle (Temps = 0 heure) ($p < 0.05$). (N=5)

Une augmentation significative à 2 heures de traitement a été observée dans les niveaux d'expression de *GJA1* dans les cellules T47D suite à l'induction de prolactine. Les niveaux redeviennent stables à 4 heures puis diminuent à 6 heures. Cette diminution devient significative à 8 heures (**Figure 3.8**).

3.3.2 Effets d'un traitement à l'estradiol sur les niveaux de GJA1 dans des cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

Afin de déterminer si des estrogènes jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de *GJA1*, une dose de 25 ng/mL d'estradiol a été ajoutée au milieu de culture de sevrage. Cette concentration permettait d'observer une augmentation significative de Cx43 au niveau protéique.

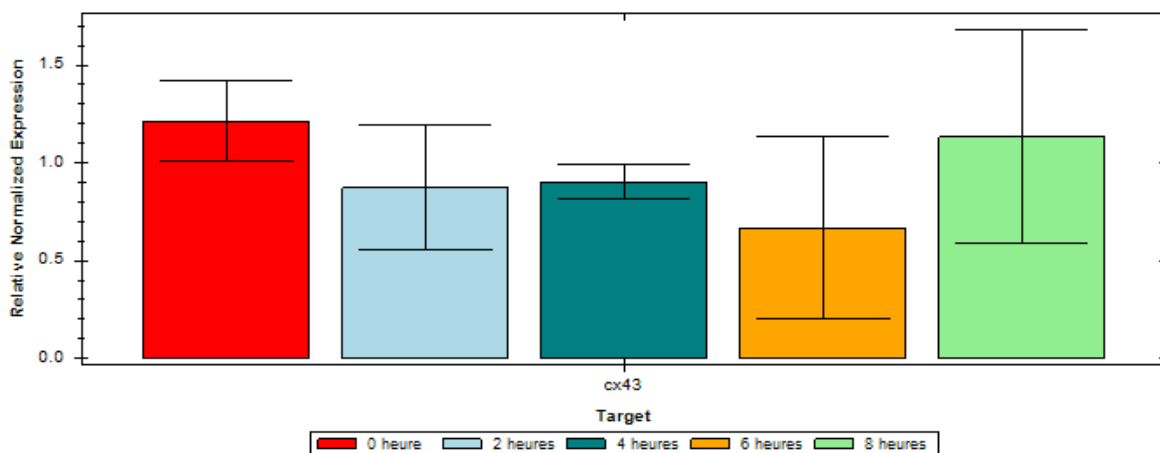


Figure 3.10 Effets d'un traitement à l'estradiol l'expression de GJA1 (Cx43). Les cellules T47D ont reçu une concentration de 25 ng/mL d'estrogène au terme d'un sevrage de 16 h. Les cellules ont été lysées et l'ARNm a été extrait après 0, 2, 4, 6 et 8 h de traitement avec un kit commercial. L'ARNm a ensuite été converti en ADN par transcription inverse (RT) puis amplifiée par RT-PCR en temps réel avec les amorces spécifiques à GJA1. Les niveaux d'expression de GJA1 ont été déterminés par la méthode $\Delta\Delta C_t$. Les données ont été normalisées en utilisant les gènes GAPDF et FABP3. Les données sont exprimées en la moyenne par erreur standard. (N=5)

La dose de 25 ng/mL d'estradiol n'a pas eu d'effet significatif sur les niveaux d'ARNm de la Cx43 de 2 à 8 heures de traitement (**Figure 3.9**). Toutefois, une

tendance à la diminution semble apparaître entre 2 et 6 heures, mais celle-ci reste transitoire et absente à 8 heures de traitement (**Figure 3.9**).

3.3.3 Effets d'un traitement aux ocytocines et la progestérone sur les niveaux de *GJA1* dans des cellules de glande mammaire humaine (*in vitro*).

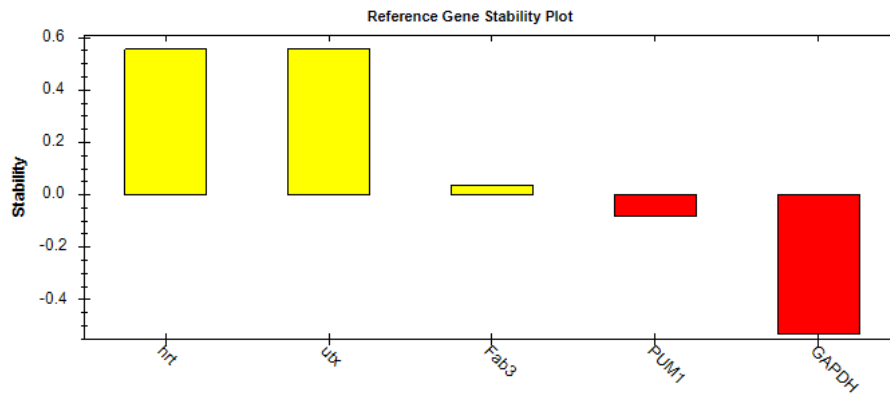


Figure 3.11 Visualisation des gènes de références suite à un traitement à l'ocytocine. Plusieurs gènes de références ont été analysés grâce à l'outil de sélection du logiciel biorad CFX Maestro. Les gènes modérément stables sont représentés en jaune et enfin les gènes instables sont représentés en rouge. (n=1)

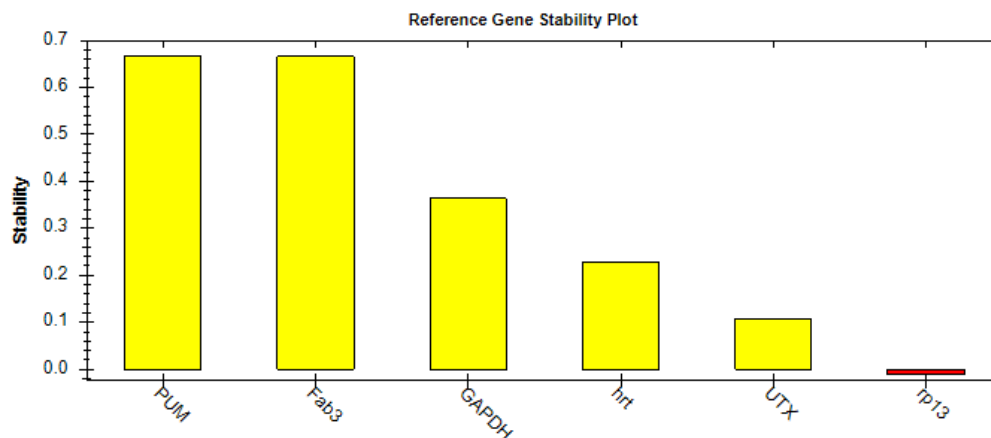


Figure 3.12 Visualisation des gènes de références suite à un traitement à la progestérone. Plusieurs gènes de références ont été analysés grâce à l'outil de sélection du logiciel biorad CFX Maestro. Les gènes modérément stables sont représentés en jaune et enfin les gènes instables sont représentés en rouge. (n=1)

Concernant les deux dernières hormones, progestérone et ocytocine, bien que les traitements aient été réalisés, les analyses par RT-qPCR ne peuvent être analysées de façon fiable puisqu'aucun gène de référence pour l'ocytocine (**Figure 3.10**) et la progestérone (**Figure 3.11**) ne se sont révélés suffisamment stables.

3.4 Étude préliminaire de la voie de signalisation de la prolactine

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de Cx43 au niveau protéique et transcriptionnel, nous avons par la suite réalisé des traitements hormonaux à la prolactine, couplés à une exposition à un antagoniste, PrIA. Dans un premier temps, une série de gammes de concentration d'antagoniste a été réalisée afin de vérifier que PrIA inhibe effectivement la signalisation liée à la prolactine. Pour ce faire, des concentrations de 0 à 500 ng/mL ont été ajoutées au milieu de culture de sevrage pendant 20 minutes. À 100 ng, une diminution de 60% de p- STAT5 est observée pour atteindre les 100% à 500 ng (**Figure 3.12A**) et (**Figure 3.12B**).

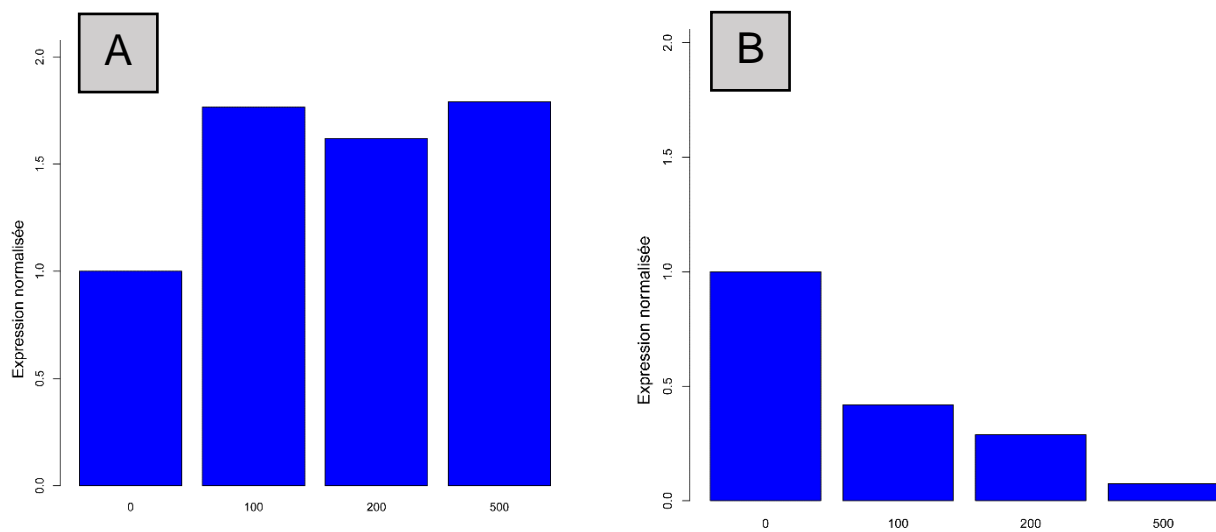


Figure 3.13 Effets d'un antagoniste à la prolactine sur les niveaux protéiques de STAT5 (A) et p-STAT5 (B) *in vitro* sur la lignée T47D. Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations croissantes de 0 à 500 ng/mL d'antagoniste PrIA au terme d'un sevrage de 16 heures. Les protéines ont été extraites après 20 minutes de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. (n=1)

Par la suite, les cellules T47D ont été exposées à 200 ng de prolactine, puis à des concentrations croissantes de PrIA pendant 20 minutes. De façon similaire, une diminution de p-STAT5, mais moins importante, a été observée à 100 ng (40%) et à 500 ng (60%). **(Figure 3.13).**

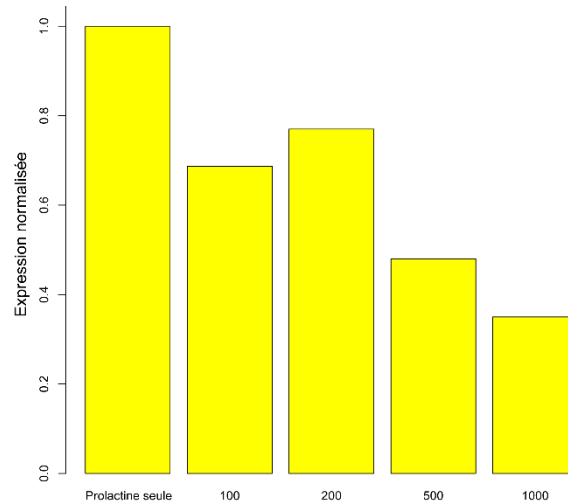


Figure 3.14 Effets d'un antagoniste à la prolactine sur les niveaux protéiques de p-STAT5 *in vitro* sur la lignée T47D traité à la prolactine. Les cellules T47D ont été exposées à des concentrations croissantes de 0 à 1000 ng/mL d'antagoniste PrIA et à 200 ng/mL de prolactine au terme d'un sevrage de 16 heures. Les protéines ont été extraites après 20 minutes de traitement. Les données ont été normalisées sur les protéines totales présentes sur la membrane de PVDF. (n=1)

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Dans le but de comprendre la régulation des Cxs et l'implication des hormones dans le développement de la glande mammaire humaine, notre étude visait à identifier quelles hormones parmi la progestérone, l'ocytocine, l'estradiol et la prolactine pouvaient augmenter ou diminuer l'expression des Cxs. L'intérêt était de comprendre les mécanismes responsables des changements d'expression des Cxs observés dans la glande mammaire murine au cours de son développement (Dianati et al., 2017) et de transposer ces résultats à l'humain, mais aussi de mieux comprendre comment leur dérégulation contribue au cancer du sein. Conformément à cette idée, des cellules épithéliales humaines ont été exposées à différentes concentrations d'hormone correspondantes à celles retrouvées dans la glande mammaire humaine dans les différents stades de développement. Dans un premier temps, les cellules ont été exposées à des concentrations de prolactine (0 à 200ng/mL), de progestérone (0 à 200ng/mL), d'ocytocine (0 à 100ng/mL) et d'estradiol (0 à 200ng/mL) pendant 3 jours consécutifs (72 heures) afin de voir les effets des traitements sur l'expression protéiques des Cxs. Ensuite, les cellules ont été exposées à une seule concentration de chacune des hormones, basée sur les résultats précédents, mais à des temps plus courts, afin de voir les effets sur la transcription des Cxs. Nos résultats ont démontré que la Cx43, mais pas les autres Cxs, est régulée par des changements hormonaux dans les cellules de la glande mammaire humaine.

L'expression des Cx26, Cx30 et Cx32 ne semble pas être modulée par les traitements hormonaux dans les cellules de la glande mammaire humaine

Nous avons choisi d'utiliser les cellules MCF-10A et T47D pour nos expériences puisqu'elles expriment les récepteurs hormonaux ER, PR, PrIR et OR. Par contre, nos études ont déterminé que les niveaux basaux de Cx26, Cx30 et Cx32 sont très bas. Ces deux lignées proviennent de cellules luminales humaines, et sont non-tumorigéniques dans le cas des MCF-10A, mais cancéreuses dans le cas des T47D. Des analyses réalisées par immunobuvardage de type western blot, nous ont indiqué que Cx26, Cx30 et Cx32 étaient bel et bien présents dans nos deux lignées,

néanmoins, les signaux obtenus étaient malheureusement trop faibles pour être analysables. De façon similaire, les analyses en RT-qPCR et en ddPCR ont montré que les transcrits étaient présents, mais à des niveaux très faibles.

Les Cx26, Cx30 et Cx32 sont connues pour être exprimées dans les cellules luminales de la glande mammaire murine (RS Talhouk, 2005), mais à des stades spécifiques du développement. Plus particulièrement, leur expression est élevée lors de la grossesse et de la lactation, des stades pendant lesquelles la progestérone, la prolactine, l'estradiol et l'ocytocine ont des rôles importants à jouer (Briskin, 2010). Ainsi, bien que les niveaux basaux étaient bas, nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition à ces hormones pourrait augmenter l'expression de ces trois Cxs dans les cellules MCF-10A et T47D, ce qui n'a pas été le cas au niveau protéique. Plusieurs études se sont déjà intéressées à l'effet des hormones sur les niveaux d'ARNm des Cxs. Les hormones thyroïdiennes peuvent se lier au promoteur de *GJA1* et augmenter son expression dans les cellules de foie (Stock et al., 2000). La TSH peut stimuler l'expression des gènes *GJB1* et *GJA1* dans les cellules de la glande thyroïde (Munari-Silem et al., 1994). Au niveau des hormones étudiées dans ce projet, l'augmentation de la concentration d'estrogène dans l'utérus augmente l'expression de *GJA1* dans les cellules du myomètre (Orsino, 1996 ; Petrocelli et al., 1993). Au contraire, la progestérone peut diminuer les niveaux d'ARNm de *GJA1* au sein du myomètre durant la grossesse (Dong et al., 2009, Petrocelli et al., 1993).

Les niveaux de *GJB2*, codant pour la Cx26, étant légèrement plus élevés dans les cellules T47D que ceux de *GJB6* (Cx30) et *GJB1* (Cx32), une analyse préliminaire a pu être réalisée. Ces données préliminaires montrent une tendance à l'augmentation de l'expression de *GJB2* lors de l'exposition à la prolactine. Ceci serait conforme au profil de la Cx26 qui montre une augmentation spécifiquement à la fin de la grossesse et durant la période de lactation, là où l'expression de la prolactine est la plus forte. Cette hypothèse est appuyée par une étude dans laquelle il a pu être montré qu'un knock-out de ses récepteurs chez la souris résulte en une diminution l'expression de Cx26 durant la grossesse comparée à des souris témoins (Ormandy et al., 2003). De plus, il a été montré qu'un site de liaison à STAT5, effecteur de la voie jak/stat, était présent sur le promoteur de Cx26, ce qui conforte cette hypothèse (Talhouk et al., 2005). On se retrouverait avec un profil inversé entre Cx26 et Cx43. Néanmoins, ceci

devra être confirmé par une nouvelle étude. Ensemble, ces résultats laissent penser que ces trois Cxs sont exprimées à des niveaux trop faibles dans notre lignée T47D et donc nous empêchent de reproduire les résultats démontrés *in vivo* chez la souris (Dianati, 2017).

Une autre explication possible de la difficulté rencontrée dans l'étude des Cx26, Cx30 et Cx32 dans les cellules MCF-10A et T47D est que bien que leur expression soit suffisamment documentée dans certaines cellules luminales murines, leur expression chez l'humain est quant à elle beaucoup plus controversée en raison de faible expression des Cxs, de la faible sensibilité des anticorps anti-Cxs et des variations tissulaires (Monaghan et al., 1994 ; Locke et al., 2000 ; 2004, Yamanaka et al., 2001). Une autre explication serait que la lignée T47D exprime plus fortement les récepteurs hormonaux que les MCF10A. Elle serait donc plus encline à répondre aux différents traitements. La lignée MCF10A pourrait donc être moins sensible aux traitements hormonaux que la lignée cancéreuse et nécessiterait des concentrations plus importantes d'hormones.

Des tests préliminaires ont été au préalable effectués sur les lignées et ont démontré que les cellules T47D et les MCF10A expriment les récepteurs des hormones ciblées. Au niveau des T47D, une augmentation significative de PrlR comparée aux cellules non traitées a été observée à une concentration de 100 ng/mL de prolactine, tendance se confirmant à 200ng/mL. De plus, une augmentation dose-dépendante de p-STAT5 a été observée, et démontre l'efficacité du traitement. De façon similaire, l'effet du traitement sur l'expression du récepteur OTR est visible à 12 ng/mL par une augmentation légère suivit d'une augmentation plus nette à partir de 25 ng/mL indiquant que les cellules ont bien répondu à l'exposition à l'ocytocine.

Concernant les deux récepteurs PRA et PRB, on observe une réponse nette illustrée par une diminution de leur expression proportionnelle aux concentrations de progestérone ajoutées au milieu. Cette diminution pourrait être due à une trop forte réaction des cellules face à l'entrée de la progestérone dans le milieu. En effet, il a été montré que pendant le cycle menstruel, un taux circulant élevé de progestérone peut être associé à une diminution de l'expression des PRs, en particulier de PRA (Scarpin, 2009).

Suite au traitement, l'expression du récepteur ER α a augmenté après traitement avec 25 ng/ml d'estrogènes. Néanmoins, nous avons constaté qu'au-delà de 50 ng/mL l'expression du récepteur avait diminué pour revenir au niveau normal à 100 ng/mL. À l'image de la progestérone, on peut supposer que l'entrée d'une concentration d'estrogènes trop élevée dans le milieu va avoir pour impact de saturer la réponse du récepteur et donc diminuer son expression.

Finalement, il est possible que les cellules doivent être exposées aux hormones de façon simultanée pour stimuler l'expression de ces trois Cxs. En effet, dans la glande mammaire, les cellules épithéliales sont exposées à une combinaison d'hormones, et non pas à une seule hormone à la fois, comme c'est le cas de nos expériences. À la vue des pics d'expression de Cx43 durant la fin de grossesse et de lactation, l'effet observé serait le résultat de la montée des niveaux de prolactine. Néanmoins, il est important de noter que les niveaux de progestérone et d'estrogène bien que, plus bas durant cette période, ne sont pour autant pas nuls et pourrait encore influencer l'expression des Cxs. Les inductions ponctuelles de l'ocytocine pourraient également jouer un rôle.

De même, d'autres hormones, comme l'hormone gonadotrophine chorionique ou l'hormone galactogène placentaire sont également exprimées lors de la grossesse, et pourraient jouer un rôle dans la régulation des Cxs. Des études complémentaires sur une autre lignée cellulaire possédant des niveaux d'expression plus élevés de ces Cxs, et avec d'autres hormones ou une combinaison d'hormones sont nécessaires afin d'avoir un portrait plus global.

L'expression de la Cx43 est régulée l'estradiol dans les cellules de la glande mammaire humaine

Nos résultats ont démontré une augmentation des niveaux protéiques de Cx43 lors de l'exposition à l'estradiol à la concentration de 12 ng/mL, qui devient significative à 25ng/mL, au niveau des T47D au terme de 72 heures de traitement. Les niveaux demeurent élevés à 50 et 100 ng/mL, sans que la différence soit significative par rapport au témoin, et redescendent au niveau des témoins à 200 ng/mL. Fait

intéressant, l'expression de Cx43 suit la même tendance que celle de ER α , suggérant un lien entre les deux comme cela a pu être démontré au niveau des cellules du myomètre (Lye et al., 1993 ; Petrocelli et al., 1993) ou bien de l'épididyme chez le rat (Lee, 2014). Cette augmentation semble également similaire à ce qui a été démontré *in vivo*, dans la glande mammaire murine, où les niveaux d'estrogènes au stade adulte montrent la plus grande augmentation de l'expression de Cx43 (Dianati, 2017). Des traitements avec des concentrations plus faibles pourraient éventuellement ainsi permettre de mieux cerner les variations au niveau de l'expression de la Cx43.

Contrairement à sur les protéines., les expositions à l'estradiol à une concentration de 25 ng/mL au niveau des T47D n'ont montré aucune variation significative comparée aux cellules non traitées. L'augmentation des niveaux protéiques de Cx43 observée ne semble pas être attribuable à une augmentation de l'expression de *GJA1*. Néanmoins, on constate énormément de variabilité au niveau de ces résultats, ce qui laisse supposer que la régulation de *GJA1* est régie par plusieurs autres paramètres pouvant potentiellement masquer l'impact réel des estrogènes sur les Cxs. En effet, il est connu que les Cxs sont régulées par de nombreux mécanismes post-transcriptionnels (Mitchell, 2001 ; Oyamada, 2013). La phosphorylation du résidu s262 présent chez la Cx43 joue un rôle majeur dans son internalisation dans la membrane et son traitement par les connexosomes (Norris, 2017). De plus, Il a été montré que la 17- β -estradiol réduit les niveaux de phosphorylation de Cx43 au niveau des cardiomyocytes de rat (Chung, 2004). Il est donc possible que l'estradiol stabilise Cx43 à la membrane, et/ou retarde sa dégradation par les connexosomes.

L'expression de la Cx43 est inhibée par la prolactine dans les cellules de la glande mammaire humaine

Plusieurs études ont démontré que l'expression de la Cx43 peut être modulée par la prolactine dans différents tissus. Nos résultats démontrent que c'est aussi le cas dans les cellules épithéliales de la glande mammaire. Une diminution dose-dépendante des niveaux protéiques de Cx43 a été observée, qui devient significative à concentration de 200 ng/mL de prolactine. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire montrant que la Cx43 voit son

expression diminuée durant la fin de la grossesse et la lactation pendant le développement de la glande mammaire murine (Dianati, 2017). L'action de la prolactine se déroule principalement durant cette même période du développement, ce qui pourrait expliquer l'impact négatif de la prolactine sur l'expression de la Cx43.

De façon intrigante, les transcrits démontraient une augmentation significative après 2 heures de traitement, suivi d'une baisse graduelle pour atteindre environ 50% et 25% des niveaux basaux après 6h et 8h de traitement, respectivement. Ce résultat, bien que contraire à notre première observation sur la Cx43, pourrait s'expliquer par une réaction précoce des cellules à la prolactine sur le court terme, amenant à une augmentation temporaire de l'expression de *GJA1*. Cette hypothèse se confirme par l'observation d'une diminution significative de l'expression de *GJA1* à 8 heures de traitement plus conforme à nos attentes. On peut donc supposer que l'effet de la prolactine sur l'expression de *GJA1* n'est pas immédiat et nécessite quelques heures pour se manifester.

Il est également possible que la fixation de la prolactine à son récepteur stimule la production de PrIR, augmentant ainsi le signal lié à p-STAT5, ce qui amènerait la baisse de Cx43 à plus long terme. La trop forte entrée de prolactine dans l'environnement cellulaire pourrait activer un rétrocontrôle négatif par le biais de suppresseurs de cytokine (SOCS1), inhibant temporairement la voie de signalisation Jak/Stat (Alexander, 2004). SOCS1 peut, en se liant à Jak2 grâce à son domaine SH2, stopper l'activité catalytique de la protéine (Ungureanu, 2002). La prolactine pourrait ainsi sur le court terme stimuler l'expression de ces cytokines.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la diminution observée des niveaux protéiques de la Cx43 à 72 heures pourrait donc résulter de la diminution de l'expression de *GJA1* suite à la fixation de la prolactine au niveau de son récepteur PrIR. Comme énoncé dans le premier chapitre de ce mémoire, la fixation de la prolactine au niveau de son récepteur PrIR va entraîner l'auto phosphorylation de Jak2, induisant la phosphorylation de STAT5. STAT5 ainsi phosphorylé va alors migrer vers le noyau et se lier à des gènes spécifiques (Radhakrishnan, 2012). Cette phosphorylation était bien observée dans les cellules T47D, confirmant l'activation dose-dépendante de PrIR suite au traitement. Pour confirmer le lien entre la prolactine

et l'expression de Cx43, les cellules T47D ont ensuite été exposées à la prolactine et à un antagoniste, le PrIRA. Il a été montré que cet antagoniste pouvait diminuer la phosphorylation de STAT5 avec ou sans ajout de prolactine (Alkharusi,2016). Les résultats préliminaires ont montré que l'antagoniste seul diminue significativement (60%) la phosphorylation basale de STAT5 aux concentrations supérieures à 100ng par rapport aux cellules normales. En présence de prolactine, l'effet se manifeste à 100ng par une inhibition de 40% de la phosphorylation et de 60% à 500ng. Les résultats préliminaires démontrent également que l'ajout de l'antagoniste permet un retour à une expression normale de la Cx43.

Ces résultats sont encourageants pour la suite de ce projet, car ils permettront d'étudier et d'approfondir l'étude de la régulation de Cx43. Une étude en cours vise à inhiber l'expression de STAT5 à l'aide de siRNA afin de déterminer quel acteur de la voie de signalisation serait le principal responsable de la modification d'expression de Cx43 et de son gène *GJA1*.

L'expression de la Cx43 n'est pas affectée par l'ocytocine et la progestérone dans les cellules de la glande mammaire

Enfin, concernant l'effet de l'ocytocine, les expositions à des concentrations de 0 à 100ng/mL n'ont montré aucune variation significative au niveau des cellules T47D traitées. Bien que l'on ne distingue pas d'effet pour la Cx43, on peut souligner qu'une tendance à l'augmentation est visible, à l'image du récepteur OTR à concentration de 12 ng/mL. Il a été montré chez la souris qu'une absence de OTR induit une baisse de l'expression de la Cx43 dans l'utérus (Yoshida, 2019), ce qui concorderait avec l'augmentation de Cx43 corrélée à celle d'OTR observée dans nos cellules. Néanmoins, l'ocytocine est une hormone pulsative stimulée, en outre, par la succion des mamelons par le nouveau-né (Lee, 2009). Il est difficile d'évaluer la relation précise de l'ocytocine avec Cx43 au cours du développement de la glande mammaire, bien que l'on sache que son relâchement se déroule principalement durant l'allaitement (Da Costa TH, 1995). Une alternative serait d'effectuer des traitements sur de plus courtes durées afin de mieux reproduire l'effet de l'exposition à l'ocytocine.

Au niveau des traitements à la progestérone, les expositions à des concentrations de 0 à 200ng/mL au niveau des T47D, n'ont également montré aucune

variation significative sur les cellules traitées. Comme énoncé plus haut dans cette discussion, il a été démontré que la progestérone affecte les niveaux d'ARNm de *GJA1* à la baisse dans le myomètre durant la grossesse (Dong et al., 2009, Petrocelli et al., 1993). Cependant, au niveau de la glande mammaire murine, bien que l'expression de Cx43 diminue durant la grossesse (Dianati, 2017), la progestérone ne semble pas avoir un effet aussi marqué que dans le myomètre. Ceci se confirme par les variations observées au niveau de nos traitements. Néanmoins la diminution de l'expression des récepteurs PRA et PRB à la plus basse concentration de nos traitements pourrait expliquer cette variabilité. Il serait intéressant de tester des expositions à plus faibles concentrations de progestérone pour potentiellement y voir un effet sur l'expression de la Cx43.

CONCLUSION

Il n'est plus à prouver que les Cxs jouent un rôle essentiel dans le maintien de la communication cellulaire et dans le développement de la glande mammaire. Les variations de leur expression au cours du développement sont un nouvel enjeu important de la recherche et la compréhension des jonctions communicante. Comprendre comment les Cxs peuvent être régulées dans la glande mammaire pourrait permettre de mieux appréhender leur dérégulation dans le cancer du sein. Notre étude a démontré que la Cx43 est influencée par des expositions à la prolactine et aux estrogènes. Nous avons également démontré que l'effet de la prolactine affectait, sur le long terme, la transcription du gène *GJA1*, ce qui n'a pas été le cas pour les estrogènes. L'expression de Cx43 est relativement haute durant tout le développement, à l'exception de la lactation où elle diminue (Dianati, 2017). L'hypothèse que les variations de la Cx43 observée chez la souris seraient similaires aux pics hormonaux de la prolactine et des estrogènes présents durant le développement de la glande mammaire semble donc se confirmer.

Nos études ont également permis d'obtenir des résultats préliminaires encourageants pour la suite du projet sur un potentiel effet de la prolactine sur l'expression de *GJB2* (Cx26). Pour de futures études, il serait intéressant d'étudier si ces variations observées se retrouvent également au niveau de cellules saines de glande mammaire. De nouvelles approches pour l'observation des effets de la progestérone et de l'ocytocine pourraient aussi être mises en place. Il serait également important de poursuivre l'étude la voie de signalisation jak/stat afin de mieux cerner le rôle de STAT5 dans la régulation. Ceci pourrait être, par exemple, réalisé par le biais d'ARN interférent ciblant spécifiquement STAT5. Concernant l'étude de Cx26, Cx30 et Cx32, la possibilité de trouver des lignées cellulaires cancéreuses ou non, exprimant plus fortement ces Cxs seraient une bonne alternative. Enfin, bien que certains des résultats présentés dans ce mémoire n'ont pas pu aboutir, de nombreuses optimisations de protocoles, de méthodes et d'analyses effectuées durant ce projet permettront, j'espère, d'évaluer plus aisément les Cxs, de comprendre leur rôle dans la glande mammaire et leur implication dans le cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIES

1. Adam C, Cyr DG. Role of Specificity Protein-1 and Activating Protein-2 Transcription Factors in the Regulation of the Gap Junction Protein Beta-2 Gene in the Epididymis of the Rat. *Biol Reprod.* 2016 Jun;94(6):120. doi: 10.1095/biolreprod.115.133702. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27053364; PMCID: PMC6702783.
2. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:503-29. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312. PMID: 15032587.
3. Alkharusi A, Yu S, Landázuri N, Zadjali F, Davodi B, Nyström T, Gräslund T, Rahbar A, Norstedt G. Stimulation of prolactin receptor induces STAT-5 phosphorylation and cellular invasion in glioblastoma multiforme. *Oncotarget.* 2016 Nov 29;7(48):79572-79583. doi: 10.18632/oncotarget.12840. PMID: 27788487; PMCID: PMC5346736.
4. Atwood CS, Hovey RC, Glover JP, Chepko G, Ginsburg E, Robison WG, Vonderhaar BK. Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J Endocrinol.* 2000 Oct;167(1):39-52. doi: 10.1677/joe.0.1670039. PMID: 11018751.
5. Baumgartner HK, Rudolph MC, Ramanathan P, Burns V, Webb P, Bitler BG, Stein T, Kobayashi K, Neville MC. Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2017 Jun;22(2):141-157. doi: 10.1007/s10911-017-9379-6. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28455726; PMCID: PMC5488167.
6. Banerjee D. Connexin's Connection in Breast Cancer Growth and Progression. *Int J Cell Biol.* 2016;2016:9025905. doi: 10.1155/2016/9025905. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27642298; PMCID: PMC5011527.
7. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Dec;2(12):a003178. doi: 10.1101/cshperspect.a003178. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20739412; PMCID: PMC2982168.
8. Brisken C, Hess K, Jeitziner R. Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology.* 2015 Oct;156(10):3442-50. doi: 10.1210/en.2015-1392. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26241069; PMCID: PMC4588833.
9. Busby M, Hallett MT, Plante I. The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 28;19(3):693. doi: 10.3390/ijms19030693. PMID: 29495625; PMCID: PMC5877554.

10. Bry C, Maass K, Miyoshi K, Willecke K, Ott T, Robinson GW, Hennighausen L. Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. *Dev Biol*. 2004 Mar 15;267(2):418-29. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.11.022. PMID: 15013803.
11. Capuco AV, Connor EE, Wood DL. Regulation of mammary gland sensitivity to thyroid hormones during the transition from pregnancy to lactation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Oct;233(10):1309-14. doi: 10.3181/0803-RM-85. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18641053.
12. Carystinos GD, Kandouz M, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Unexpected induction of the human connexin 43 promoter by the ras signaling pathway is mediated by a novel putative promoter sequence. *Mol Pharmacol*. 2003 Apr;63(4):821-31. doi: 10.1124/mol.63.4.821. PMID: 12644583.
13. Chung TH, Wang SM, Wu JC. 17beta-estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via the estrogen receptor. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Nov;37(5):1013-22. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.08.003. PMID: 15522278.
14. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003 Apr;8(2):205-14. doi: 10.1023/a:1025952924864. PMID: 14635795.
15. Da Costa TH, Taylor K, Ilic V, Williamson DH. Regulation of milk lipid secretion: effects of oxytocin, prolactin and ionomycin on triacylglycerol release from rat mammary gland slices. *Biochem J*. 1995 Jun 15;308 (Pt 3)(Pt 3):975-81. doi: 10.1042/bj3080975. PMID: 8948458; PMCID: PMC1136818.
16. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2011 May 1;6(3):359-369. doi: 10.1586/eem.11.25. PMID: 21857868; PMCID: PMC3156468.
17. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):561-70. doi: 10.1172/JCI27987. PMID: 16511588; PMCID: PMC2373424.
18. Dianati E, Poiraud J, Weber-Ouellette A, Plante I. Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and β -catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. *Dev Biol*. 2016 Aug 1;416(1):52-68. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.011. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27291930.
19. Di Renzo GC, Giardina I, Clerici G, Brillo E, Gerli S. Progesterone in normal and pathological pregnancy. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2016 Jul 1;27(1):35-48. doi: 10.1515/hmbci-2016-0038. PMID: 27662646.

20. Dong X, Yu C, Shynlova O, Challis JR, Rennie PS, Lye SJ. p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gja1). *Mol Endocrinol*. 2009 Aug;23(8):1147-60. doi: 10.1210/me.2008-0357. Epub 2009 May 7. PMID: 19423654; PMCID: PMC5419194.
21. Dressing GE, Lange CA. Integrated actions of progesterone receptor and cell cycle machinery regulate breast cancer cell proliferation. *Steroids*. 2009 Jul;74(7):573-6. doi: 10.1016/j.steroids.2008.12.001. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19118566; PMCID: PMC4871707.
22. El-Sabban ME, Abi-Mosleh LF, Talhouk RS. Developmental regulation of gap junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003 Oct;8(4):463-73. doi: 10.1023/B:JOMG.0000017432.04930.76. PMID: 14985641.
23. Essenfelder GM, Bruzzone R, Lamartine J, Charollais A, Blanchet-Bardon C, Barbe MT, Meda P, Waksman G. Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity. *Hum Mol Genet*. 2004 Aug 15;13(16):1703-14. doi: 10.1093/hmg/ddh191. Epub 2004 Jun 22. PMID: 15213106.
24. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1523-631. doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523. PMID: 11015620.
25. Gendoo DM, Ratanasirigulchai N, Schröder MS, Paré L, Parker JS, Prat A, Haibe-Kains B. Genefu: an R/Bioconductor package for computation of gene expression-based signatures in breast cancer. *Bioinformatics*. 2016 Apr 1;32(7):1097-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btv693. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26607490; PMCID: PMC6410906.
26. Ghali RM, Al-Mutawa MA, Al-Ansari AK, Zaied S, Bhiri H, Mahjoub T, Almawi WY. Differential association of ESR1 and ESR2 gene variants with the risk of breast cancer and associated features: A case-control study. *Gene*. 2018 Apr 20;651:194-199. doi: 10.1016/j.gene.2018.02.011. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29414691.
27. Goldenberg G, Harris TJ. Adherens junction distribution mechanisms during cell-cell contact elongation in *Drosophila*. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e79613. doi: 10.1371/journal.pone.0079613. PMID: 24223978; PMCID: PMC3817131.
28. Gorvin CM. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol*. 2015 May 16;2(3):85-91. doi: 10.1016/j.jcte.2015.05.001. PMID: 29204371; PMCID: PMC5685068.

29. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat.* 2013 Jan;26(1):29-48. doi: 10.1002/ca.22165. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22997014.
30. Hennemann H, Schwarz HJ, Willecke K. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur J Cell Biol.* 1992 Feb;57(1):51-8. PMID: 1322300.
31. Hennighausen L, Robinson GW. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell.* 2001 Oct;1(4):467-75. doi: 10.1016/s1534-5807(01)00064-8. PMID: 11703938.
32. Hens JR, Wysolmerski JJ. Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):220-4. doi: 10.1186/bcr1306. Epub 2005 Aug 10. PMID: 16168142; PMCID: PMC1242158.
33. Hirschi KK, Xu CE, Tsukamoto T, Sager R. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ.* 1996 Jul;7(7):861-70. PMID: 8809403.
34. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development.* 2015 Mar 15;142(6):1028-42. doi: 10.1242/dev.087643. PMID: 25758218.
35. Javed A, Lteif A. Development of the human breast. *Semin Plast Surg.* 2013 Feb;27(1):5-12. doi: 10.1055/s-0033-1343989. PMID: 24872732; PMCID: PMC3706056.
36. Joly-Pharaboz MO, Fei ZL, Bouillard B, Andre J. Estradiol stimulation and inhibition of cell growth in new estrogen-sensitive cell lines and tumors established from the MtTF4 tumor. *Cancer Res.* 1990 Jun 15;50(12):3786-94. PMID: 2340523.
37. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M. Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. *Oncology.* 2005;68(2-3):217-22. doi: 10.1159/000086777. Epub 2005 Jul 7. PMID: 16015037.
38. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene.* 1997 Oct 15;199(1-2):165-71. PMID: 9358053
39. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Nov 30;74(5):311-7. doi: 10.1016/s0960-0760(00)00108-4. PMID: 11162939.

40. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006 Mar 15;394(Pt 3):527-43. doi: 10.1042/BJ20051922. PMID: 16492141; PMCID: PMC1383703.
41. Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scimè A, Rudnicki MA. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009 Jun 5;4(6):535-47. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.013. PMID: 19497282; PMCID: PMC2743383.
42. Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS 3rd. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol.* 2009 Jun;88(2):127-51. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.001. Epub 2009 Apr 10. PMID: 19482229; PMCID: PMC2689929.
43. Lee KH. Modification of Gene Expression of Connexins in the Rat Corpus Epididymis by Estradiol Benzoate or Flutamide Exposure at the Early Neonatal Age. *Dev Reprod.* 2015 Jun;19(2):69-77. doi: 10.12717/DR.2015.19.2.069. PMID: 27004263; PMCID: PMC4801050.
44. Lerman B, Harricharran T, Ogunwobi OO. Oxytocin and cancer: An emerging link. *World J Clin Oncol.* 2018 Sep 14;9(5):74-82. doi: 10.5306/wjco.v9.i5.74. PMID: 30254962; PMCID: PMC6153127.
45. Locke D, Perusinghe N, Newman T, Jayatilake H, Evans WH, Monaghan P. Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. *J Cell Physiol.* 2000 May;183(2):228-37. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200005)183:2<228::AID-JCP9>3.0.CO;2-Y. PMID: 10737898.
46. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012 Jul-Aug;1(4):533-57. doi: 10.1002/wdev.35. PMID: 22844349; PMCID: PMC3404495.
47. Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Apr;68(7):1115-29. doi: 10.1007/s00018-010-0551-z. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20960023.
48. Mallepell S, Krust A, Chambon P, Brisken C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2196-201. doi: 10.1073/pnas.0510974103. Epub 2006 Feb 1. PMID: 16452162; PMCID: PMC1413744.
49. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics.* 2006;7(8):497-508. doi: 10.2174/138920206779315737. PMID: 18369406; PMCID: PMC2269003.

50. Marti A, Lazar H, Ritter P, Jaggi R. Transcription factor activities and gene expression during mouse mammary gland involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999 Apr;4(2):145-52. doi: 10.1023/a:1018721107061. PMID: 10426393.
51. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000 Apr;5(2):165-85. doi: 10.1023/a:1026491221687. PMID: 11149571.
52. McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9886-94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4302. PMID: 17047050.
53. McNeilly AS. Effects of lactation on fertility. *Br Med Bull*. 1979 May;35(2):151-4. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071562. PMID: 387162.
54. Mitchell JA, Lye SJ. Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun Adhes*. 2001;8(4-6):299-302. doi: 10.3109/15419060109080741. PMID: 12064606.
55. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22781841; PMCID: PMC3521964.
56. Munari-Silem Y, Guerrier A, Fromaget C, Rabilloud R, Gros D, Rousset B. Differential control of connexin-32 and connexin-43 expression in thyroid epithelial cells: evidence for a direct relationship between connexin-32 expression and histiotypic morphogenesis. *Endocrinology*. 1994 Aug;135(2):724-34. doi: 10.1210/endo.135.2.8033821. PMID: 8033821.
57. Musumeci G, Castrogiovanni P, Szychlinska MA, Aiello FC, Vecchio GM, Salvatorelli L, Magro G, Imbesi R. Mammary gland: From embryogenesis to adult life. *Acta Histochem*. 2015 May-Jun;117(4-5):379-85. doi: 10.1016/j.acthis.2015.02.013. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25800977.
58. Naoi Y, Noguchi S. Multi-gene classifiers for prediction of recurrence in breast cancer patients. *Breast Cancer*. 2016 Jan;23(1):12-18. doi: 10.1007/s12282-015-0596-9. Epub 2015 Feb 21. PMID: 25700572.
59. Neuhaus IM, Bone L, Wang S, Ionasescu V, Werner R. The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. *Biosci Rep*. 1996 Jun;16(3):239-48. doi: 10.1007/BF01207338. PMID: 8842374.
60. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002 Jan;7(1):49-66. doi: 10.1023/a:1015770423167. PMID: 12160086.

61. Norris RP, Baena V, Terasaki M. Localization of phosphorylated connexin 43 using serial section immunogold electron microscopy. *J Cell Sci.* 2017 Apr 1;130(7):1333-1340. doi: 10.1242/jcs.198408. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28202692.2017
62. Oakes SR, Rogers RL, Naylor MJ, Ormandy CJ. Prolactin regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008 Mar;13(1):13-28. doi: 10.1007/s10911-008-9069-5. Epub 2008 Jan 25. PMID: 18219564.
63. Ormandy CJ, Sutherland RL. Mechanisms of prolactin receptor regulation in mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 1993 Feb;91(1-2):C1-6. doi: 10.1016/0303-7207(93)90247-h. PMID: 8472840.
64. Orsino A, Taylor CV, Lye SJ. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology.* 1996 May;137(5):1545-53. doi: 10.1210/endo.137.5.8612484. PMID: 8612484.
65. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 20;1719(1-2):6-23. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.11.002. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16359940.
66. Park DS, Lee H, Frank PG, Razani B, Nguyen AV, Parlow AF, Russell RG, Hult J, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol Biol Cell.* 2002 Oct;13(10):3416-30. doi: 10.1091/mbc.02-05-0071. PMID: 12388746; PMCID: PMC129955.
67. Perks CM, Keith AJ, Goodhew KL, Savage PB, Winters ZE, Holly JM. Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2004 Jul 19;91(2):305-11. doi: 10.1038/sj.bjc.6601947. PMID: 15213724; PMCID: PMC2409804.
68. Petrocelli T, Lye SJ. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology.* 1993 Jul;133(1):284-90. doi: 10.1210/endo.133.1.8391423. PMID: 8391423.
69. Subbannayya T, Balakrishnan L, Sudarshan G, Advani J, Kumar S, Mahmood R, Nair B, Sirdeshmukh R, Mukherjee KK, Umathe SN, Raju R, Prasad TS. An integrated map of corticotropin-releasing hormone signaling pathway. *J Cell Commun Signal.* 2013 Dec;7(4):295-300. doi: 10.1007/s12079-013-0197-3. Epub 2013 Mar 16. PMID: 23504413; PMCID: PMC3889255.

70. Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000 Apr;5(2):227-41. doi: 10.1023/a:1026499523505. PMID: 11149575.
71. Ruan W, Fahlbusch F, Clemmons DR, Monaco ME, Walden PD, Silva AP, Schmid HA, Kleinberg DL. SOM230 inhibits insulin-like growth factor-I action in mammary gland development by pituitary independent mechanism: mediated through somatostatin subtype receptor 3? *Mol Endocrinol*. 2006 Feb;20(2):426-36. doi: 10.1210/me.2005-0283. Epub 2005 Oct 13. PMID: 16223973.
72. Sachdeva, G., Desouza, J., Gadkar, S., & Jagtap, D. (2019). Size, site, and signaling: Three attributes of estrogen receptors. *Biomedical Research Journal*, 6(2), 37. DOI: 10.4103/BMRJ.BMRJ_24_19
73. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010 Apr;1(2):109-26. PMID: 22247839
74. Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):337-42. doi: 10.1073/pnas.97.1.337. PMID: 10618419; PMCID: PMC26664.
75. Stelwagen K, Singh K. The role of tight junctions in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014 Mar;19(1):131-8. doi: 10.1007/s10911-013-9309-1. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24249583.
76. Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(1):201. doi: 10.1186/bcr1368. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16524451; PMCID: PMC1413974.
77. Stewart MK, Simek J, Laird DW. Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. *Reproduction*. 2015 Jun;149(6):R279-90. doi: 10.1530/REP-14-0661. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25792566.
78. Schueler PA, Schwartz HL, Strait KA, Mariash CN, Oppenheimer JH. Binding of 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and its analogs to the in vitro translational products of c-erbA protooncogenes: differences in the affinity of the alpha- and beta-forms for the acetic acid analog and failure of the human testis and kidney alpha-2 products to bind T3. *Mol Endocrinol*. 1990 Feb;4(2):227-34. doi: 10.1210/mend-4-2-227. PMID: 2158622.
79. Sweeney, M.F., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int* 18, 43 (2018). DOI: 10.1186/s12935-018-0534-y

80. Talhouk RS, Elble RC, Bassam R, Daher M, Sfeir A, Mosleh LA, El-Khoury H, Hamoui S, Pauli BU, El-Sabban ME. Developmental expression patterns and regulation of connexins in the mouse mammary gland: expression of connexin30 in lactogenesis. *Cell Tissue Res.* 2005 Jan;319(1):49-59. doi: 10.1007/s00441-004-0915-5. Epub 2004 Oct 27. PMID: 15517403.
81. Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Braz J Med Biol Res.* 2018 Jan 23;51(3):1-7. doi: 10.1590/1414-431X20175612. PMID: 29513878; PMCID: PMC5912097.
82. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T. Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PLoS One.* 2014 Nov 10;9(11):e112541. doi: 10.1371/journal.pone.0112541. PMID: 25383624; PMCID: PMC4226536.
83. Tobin VA, Ludwig M. The actin filament and dendritic peptide release. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1243-6. doi: 10.1042/BST0351243. PMID: 17956322.
84. Tu ZJ, Kollander R, Kiang DT. Differential up-regulation of gap junction connexin 26 gene in mammary and uterine tissues: the role of Sp transcription factors. *Mol Endocrinol.* 1998 Dec;12(12):1931-8. doi: 10.1210/mend.12.12.0208. PMID: 9849966.
85. Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology.* 2006;73(5):213-23. doi: 10.1159/000098207. PMID: 17314492.
86. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol.* 2002 May;22(10):3316-26. doi: 10.1128/mcb.22.10.3316-3326.2002. PMID: 11971965; PMCID: PMC133778.
87. Veltmaat JM, Mailleux AA, Thiery JP, Bellusci S. Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation.* 2003 Jan;71(1):1-17. doi: 10.1046/j.1432-0436.2003.700601.x. PMID: 12558599.
88. Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhatsky A, Fujihara H, Katoh A, Ueta Y, Zingg HH, Chvatal A, Sykova E, Dayanithi G. REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther.* 2010 Oct;16(5):e138-56. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00185.x. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20626426; PMCID: PMC2972642.

89. Vuaroqueaux V, Urban P, Labuhn M, Delorenzi M, Wirapati P, Benz CC, Flury R, Dieterich H, Spyrtos F, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S. Low E2F1 transcript levels are a strong determinant of favorable breast cancer outcome. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R33. doi: 10.1186/bcr1681. PMID: 17535433; PMCID: PMC1929097.
90. Watson CJ. Post-lactational mammary gland regression: molecular basis and implications for breast cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2006 Dec 20;8(32):1-15. doi: 10.1017/S1462399406000196. PMID: 17178008.
91. Wei Q, Lu Y, Pan M, Shu Y, Cao X. Gene silencing of hPRLR mRNA by RNA interference in human breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2008 Jul-Aug;1(4):479-83. PMID: 21479435.
92. Worku D, Jouhra F, Jiang GW, Patani N, Newbold RF, Mokbel K. Evidence of a tumour suppressive function of E2F1 gene in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2008 Jul-Aug;28(4B):2135-9. PMID: 18751386.
93. Yamanaka I, Kuraoka A, Inai T, Ishibashi T, Shibata Y. Differential expression of major gap junction proteins, connexins 26 and 32, in rat mammary glands during pregnancy and lactation. *Histochem Cell Biol.* 2001 Apr;115(4):277-84. PMID: 9157013
94. Yoshida M, Takayanagi Y, Ichino-Yamashita A, Sato K, Sugimoto Y, Kimura T, Nishimori K. Functional Hierarchy of Uterotonics Required for Successful Parturition in Mice. *Endocrinology.* 2019 Dec 1;160(12):2800-2810. doi: 10.1210/en.2019-00499. PMID: 31517984; PMCID: PMC6887699.
95. You S, Tu ZJ, Kiang DT. Direct modulation of tumor suppressor connexin 26 gene by human chorionic gonadotropin in rat mammary glands. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1498-502. PMID: 9537254.