

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en Santé Humaine

**EFFETS D'UN MÉLANGE DE BPC SUR LA COMMUNICATION
INTERCELLULAIRE DANS LE FOIE CHEZ LE RAT**

Par
Patrick Gauvin

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès science (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur interne

Dr Michel Fournier
INRS –Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en Santé Humaine

Examineur externe

Dr. Gaétan Carrier
Département de santé environnementale
et santé au travail
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr Michel Charbonneau
INRS –Institut Armand-Frappier
INRS-Université du Québec

Codirecteur de recherche

Dr Daniel G. Cyr
INRS –Institut Armand-Frappier
INRS-Université du Québec

RÉSUMÉ

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des carcinogènes fortement rejetés dans l'environnement, principalement dans les milieux aquatiques. Depuis leur première utilisation en 1930, les diverses et multiples applications industrielles des BPC, de concert avec leur stabilité exceptionnelle, en font des produits considérablement bioaccumulables dans l'environnement, car ils se dégradent difficilement. Ces polluants, dits épigénétiques, causent plusieurs effets biologiques chez les organismes vivants. Le développement de cancer, par la modulation de la communication entre les cellules au niveau des jonctions lacunaires, en est un exemple.

Les travaux de ce mémoire visent à caractériser et à définir les effets d'un mélange de six congénères de BPC au niveau de la communication intercellulaire par l'étude de l'expression de la connexine 32 (Cx32) dans le foie de rats femelles. De plus, les travaux veulent caractériser l'impact du mélange de BPC sur la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires et sur les protéines de ces jonctions intervenant dans cette communication, notamment par des analyses immunohistochimiques chez les lignées cellulaires MH1C1, MCF-7 et MCF-10A.

La sélection des BPC utilisés pour les études chez le rat Spragues-Dawley femelle se base sur des études épidémiologiques de consommateurs de poissons contaminés. La durée des traitements des rats au mélange de BPC est de 41 et 90 jours, soit la durée typique d'une étude sous-chronique. Cependant, les résultats présentés dans ce manuscrit ne reflètent que le traitement des rats avec le mélange durant 90 jours. Une analyse des foies prélevés chez ces animaux a permis de déterminer par immunobuvardage de type Northern le niveau d'expression de la Cx32 des hépatocytes. Les résultats ont démontré une baisse significative de l'expression de l'ARNm de la Cx32 chez les hépatocytes des animaux traités quotidiennement durant 90 jours avec une dose totale de 3000 µg/kg (6 x 500 µg/kg) du mélange de BPC.

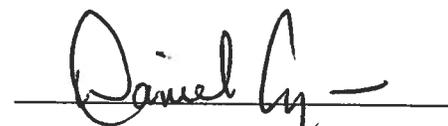
L'étude *in vitro* des effets du mélange de BPC sur la communication intercellulaire a été effectuée à l'aide d'une lignée d'hépatocytes exprimant la Cx32 (MH1C1) et deux lignées de cellules mammaires exprimant la Cx43 (MCF-7 et MCF-10A). Les résultats obtenus par la technique du «Scrape loading dye transfert» (SLDT) ont démontré une perte de communication pour les cellules mammaires saines MCF-10A ayant subies une exposition au mélange de BPC. Les analyses immunohistochimiques ont révélé que le mélange de BPC est en mesure de changer la localisation intracellulaire de la Claudine-1 et de la Cx43, deux protéines de jonctions impliquées dans la communication intercellulaire. Les résultats démontrent que la délocalisation des protéines de la membrane vers le cytoplasme de la cellule dépend de la dose du mélange utilisée. Enfin, les résultats suggèrent que le mélange de BPC peut induire un changement du niveau protéique de la Cx43. Les modifications épigénétiques de ces protéines entraînées par la présence du mélange de BPC dans les cellules hépatiques et mammaires semblent donc venir moduler la communication intercellulaire. Ainsi, l'extrapolation des données mécanistiques recueillies dans ce travail, nous suggère que le mélange de BPC étudié peut engendrer une cancérogenèse de type épigénétique.



Étudiant



Directeur de recherche



Co-directeur de recherche

AVANT-PROPOS

Les biphényles polychlorés, couramment appelés BPC, sont des contaminants faisant partie de la famille des organochlorés qui sont largement répandus dans l'environnement. Les BPC n'existent pas à l'état naturel. Bien qu'ils furent synthétisés pour la première fois en Allemagne en 1881, ils n'ont été introduits sur le marché qu'en 1929 par une compagnie américaine. Entre 1929 et 1977, ces produits ont été fabriqués et vendus par différentes sociétés dans le monde sous plusieurs noms commerciaux. L'Aroclor, un produit utilisé au Canada et regroupant différents types de BPC, en est un exemple. Depuis leur première utilisation en 1930 comme solvants pour l'épandage d'insecticides, les applications industrielles des BPC ont beaucoup varié en raison de leurs propriétés physico-chimiques particulières (Twaroski et al., 2001.). Cependant, la stabilité exceptionnelle des BPC provoque leur bioaccumulation dans l'environnement et chez les organismes vivants. De plus, puisque les BPC sont difficilement dégradables, plusieurs effets biologiques néfastes surviennent chez l'homme et chez les animaux suite à leurs expositions. La persistance des BPC dans l'environnement entraîne alors un arrêt de la production commerciale contenant des BPC en 1977. Le 23 août 1988, à Saint-Basile-Le-Grand, un incendie survenu dans un entrepôt de déchets dangereux contenant des BPC a rappelé à la population les risques liés à la pollution industrielle par les BPC et depuis, plusieurs recherches scientifiques tentent d'évaluer les effets biologiques de ces contaminants sur l'homme et l'environnement.

Certaines données préliminaires concernant la consommation de poissons ont démontré la présence de composés liposolubles tels que les BPC chez des pêcheurs sportifs. Suite à ces observations, il était donc important d'évaluer le risque de toxicité et les effets de ces organochlorés sur la santé des consommateurs de poissons contaminés (Gouvernement du Canada., 1998.). Différentes habitudes de consommation et degrés d'exposition ont été testés chez les rats femelles, plus sensibles aux BPC que les rats mâles. Les organochlorés rejetés dans l'environnement sont liés à la perte ou à la modulation de mécanismes de communication intercellulaire (Trosko et Ruch., 1998.;

Trosko et Chang, 2000.). Ils semblent être de bons promoteurs dans le développement de tumeurs (MillsJ.J., 1995.; Holder et al., 1993.). D'ailleurs, certaines études ont démontré qu'il se produit une perte de communication intercellulaire chez les cellules cancéreuses ou lors du développement de tumeurs (Krutovskikh et al., 1994.; Yamasaki et al., 1999.). Depuis quelques années, plusieurs chercheurs associent la formation et la promotion de tumeurs à un problème de communication entre les cellules via les jonctions lacunaires (Mesnil., 2002.; Krutovskikh et Yamasaki., 1997.).

La contamination directe de l'homme et des animaux domestiques par les BPC peut survenir de façon accidentelle ou être d'origine alimentaire. En effet, une intoxication massive des habitants de la ville de Fukuoka et Nagasaki au Japon ont été provoquée par une contamination de l'huile de riz (maladie de Yusho). Les principales sources de contamination connues sont les rejets industriels et la diffusion progressive des BPC dans l'environnement à partir des matériaux qui en contiennent. En raison de leur caractère liposoluble, les BPC s'accumulent très rapidement dans les tissus riches en lipides comme les graisses et les tissus nerveux. Le foie et les glandes mammaires sont aussi des organes ciblés par les BPC. Ils possèdent des propriétés estrogéniques et anti-estrogéniques. Ils provoquent alors des perturbations de l'équilibre hormonal autant chez l'homme que chez la femme. Ils peuvent donc être impliqués dans le cancer du sein. Ces substances sont appelées contaminants épigénétiques puisqu'ils altèrent l'homéostasie cellulaire via la modulation de l'expression de gènes et de protéines, mais ne sont pas génotoxiques, car ils ne réagissent pas directement avec l'ADN.

Ce manuscrit se divise en quatre sections distinctes. Il débute par une revue de littérature sur les BPC quant à leurs effets sur la santé, leurs rôles dans la cancérogenèse et leurs effets sur la communication cellulaire. Cette section se termine par la présentation des buts et objectifs du projet de recherche. La seconde partie présente de façon détaillée le matériel et les techniques employées. Les résultats et les différentes observations obtenus lors des expériences menées sur les effets du mélange de congénères de BPC sur l'expression de l'ARNm de la Cx32 chez les hépatocytes ainsi que sur certaines protéines impliquées dans la communication intercellulaire dans

différents types de cellules sont rapportés à la troisième section. Enfin, une discussion de l'impact des résultats quant aux effets des BPC impliqués dans un processus de cancérogenèse par la modulation de la communication intercellulaire est présentée à la dernière section.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Michel Charbonneau pour son accueil, son appui et ses encouragements tout au long de ma maîtrise qui m'ont permis d'orienter mon projet de recherche.

Merci à mon co-directeur Daniel G. Cyr, qui m'a offert un soutien logistique et qui a su me faire poser les bonnes questions.

Merci aussi à Guylaine Lassonde, technicienne du Dr. Charbonneau, qui m'a toujours aidé et donné de judicieux et précieux conseils.

Merci à mes collègues de laboratoire et amis Noël, Robert, Mary, Pan, Ben pour leurs conseils, leur aide et leur bonne humeur. Merci à mes amis d'en face et d'ailleurs. Un merci spécial à Isabelle, Valérie P, Julie D et Johanna B pour leurs bons conseils techniques et avec qui j'ai eu du bon temps.

Merci à toute ma famille, ma mère Lise, mon père Pierre et mon frère Alexandre qui ont toujours eu confiance en moi, qui m'ont soutenu et encouragé lors de ma maîtrise.

Merci à Catherine Charbonneau pour son amour, pour son soutien dans cette aventure et pour son encouragement.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
AVANT-PROPOS.....	iv
REMERCIEMENTS	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 Les biphényles polychlorés (BPC).....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Fabrication des BPC.....	2
1.1.3 Distribution environnementale des BPC.....	3
1.1.4 Exposition aux BPC.....	4
1.1.5 Métabolisme des BPC.....	5
1.1.6 Effets des BPC.....	7
1.2 La Cancérogenèse.....	10
1.2.1 Cancérogenèse génotoxique et épigénétique.....	10
1.2.2 Prolifération cellulaire et cancer.....	11
1.2.3 Cancérogenèse des BPC.....	13
1.3 Le Foie.....	14
1.3.1 Cancer du foie.....	14
1.3.2 Hépatocancérogenèse des BPC.....	15
1.4 Le Sein.....	16
1.4.1 Cancer du sein.....	16
1.4.2 Cancérogenèse des BPC : Les cellules mammaires.....	16
1.5 La communication intercellulaire et les types de jonctions.....	18
1.5.1 Les cadhérines.....	18
1.5.2 Les claudines.....	19
1.5.3 Les connexines.....	21
1.5.3.1 Les jonctions lacunaires.....	24
1.5.3.2 Structure des jonctions lacunaires.....	25
1.5.3.3 Le rôle des jonctions lacunaires.....	26
1.6 La communication intercellulaire dans le foie et le sein.....	27
1.6.1 La GJIC et les cellules du foie.....	27
1.6.2 La GJIC et les cellules mammaires.....	28
1.6.3 Les jonctions lacunaires et le cancer.....	29
1.6.4 Les jonctions lacunaires et les BPC.....	30

1.7 Les jonctions lacunaires et les autres xénobiotiques.....	32
1.7.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	32
1.7.2 Les polluants organiques persistants	34
1.7.3 Le phénobarbital.....	35
1.7.4 L'hexachlorobenzène et autres organochlorés	36
1.7.5 Les métaux et les jonctions lacunaires	38
1.8 Buts et Objectifs.....	40
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	41
2.1 BPC utilisés pour le traitement des animaux	41
2.2 Immunobuvardage de type Northern de la Cx 32	43
2.2.1 Isolation de l'ARN	43
2.2.2 Sonde de la Cx32 et sonde 18S	44
2.2.3 Analyse Statistique.....	45
2.3 Scrape Loading Dye Transfer	45
2.4 Immunohistochimie	46
CHAPITRE 3: RÉSULTATS	49
3.1 Effets du traitement par les BPC sur la communication intercellulaire.....	49
3.1.1 Analyse des effets physiques des BPC	49
3.1.2 Effet du mélange de BPC dans le foie au niveau de la Cx32	51
3.2 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MH1C1.....	53
3.3 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MCF-7	54
3.4 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MCF-10A	55
3.5 Étude des protéines de jonction chez les cellules MCF-10A	59
3.5.1 La connexine 43.....	59
3.5.2 La claudine-1	61
3.5.3 La E-cadhérine.....	61
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	64
4.1 Données préliminaires sur l'action biologique du mélange de BPC	64
4.2 L'expression de la Cx32 dans le foie suite au traitement avec le mélange de BPC	65
4.3 La communication intercellulaire par la GJC.....	66
4.4 L'immunohistochimie des MCF-10A traitées au mélange BPC	68
CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN Acide désoxyribonucléique
- ADNc Acide désoxyribonucléique complémentaire
- AhR Récepteur des hydrocarbures aromatiques
- AMPc Adénosine monophosphate cyclique
- ARN Acide ribonucléique
- ARNm Acide ribonucléique messenger
- ATPases Adénosine-5'-triphosphatase
- BPC Biphényles polychlorés
- Ca²⁺ Ion calcium
- Cx Connexine
- CYP-450 Cytochrome P-450
- DDT Dichlorodiphényltrichloroéthane
- DEN Diéthylnitrosamine
- DMSO Diméthylsulfoxyde
- E-Cad Cadherine E
- E₁ et E₂ Estrone (E₁) et 17β-estradiol
- ER Récepteurs aux estrogènes
- GJIC Communication intercellulaire via les jonctions lacunaires
(Gap Junctional Intercellular Communication)
- GSP Gluthatione-S-Peroxydase
- HAP Hydrocarbures polycycliques aromatiques
- HCB Hexachlorobenzène
- IP Intrapéritonéale
- K⁺ Ion potassium
- LY Jaune de Lucifer (*lucifer yellow*)
- MROD Méthoxyrésorufin-O-déméthylase
- PBS Solution de Phosphate-Borate

- PCT Porphyrie cutanée tardive
- PKC Protéine Kinase C
- POP Polluants organiques persistants
- ROS Réactifs oxygénés (*Reactive oxygen species*)
- SNC Système nerveux central
- T4 Thyroxine
- TCDD 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
- UROD Uroporphyrinogène décarboxylase

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 Structure chimique de la molécule de biphenyl polychloré	1
Figure 1. 2 Oxydation des BPC	6
Figure 1. 3 Réduction des BPC.....	7
Figure 1. 4 Stades de la cancérogenèse.....	11
Figure 1. 5 Représentation d'une cadhérine dans une cellule épithéliale.....	19
Figure 1. 6 Représentation d'une jonction serrée dans une cellule épithéliale.....	20
Figure 1. 7 Schéma structural d'une connexine	24
Figure 1. 8 Structure physique d'une jonction lacunaire.....	25
Figure 1. 9 Couplage cellulaire de connexines	26
Figure 3. 1 Effets du mélange de BPC dans le foie de rat	50
Figure 3. 2 Effet d'un mélange de BPC sur la Cx32 dans le foie de rat	52
Figure 3. 3 Communication intercellulaire des cellules MH1C1	54
Figure 3. 4 Communication intercellulaire des cellules MCF-7.....	55
Figure 3. 5 Effets des BPC sur la cytotoxicité et la viabilité des cellules MCF-10A.....	56
Figure 3. 6 Effet du mélange de BPC sur la communication des cellules MCF-10A	58
Figure 3. 7 Modification de la localisation de la Cx43 par les BPC chez les MCF-10A .	60
Figure 3. 8 Modification de la localisation et diminution de l'expression de la Claudine-1 par les BPC chez les MCF-10A	62
Figure 3. 9 Effet des BPC sur la E-cadhérine chez les MCF-10A.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 Demi-vies suggérées pour les biphényles polychlorés dans divers milieux naturels.....	3
Tableau 1. 2 Connexines identifiées chez les mammifères	22

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Les biphényls polychlorés (BPC)

1.1.1 Généralités

Les biphényls polychlorés (BPC) sont des composés chimiques de synthèse constitués d'atomes de chlore, de carbone et d'hydrogène qui ont fait l'objet de plusieurs études dans le milieu de l'écotoxicologie. La substitution d'un à plusieurs atomes d'hydrogène par un atome de chlore sur deux molécules de benzène crée les biphényls chlorés (**Figure 1.1**). Les BPC font partie de la famille des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés où l'on retrouve la 2,3-7,8-TCDD et l'hexachlorobenzène. Entre 1929 et 1977, les BPC ont été fabriqués et vendus par différentes compagnies sous plusieurs noms commerciaux tel l'Aroclor, produit le plus utilisé au Canada regroupant différents congénères de BPC. Il existe entre autres différents Aroclors dans lesquels les mélanges de BPC varient.

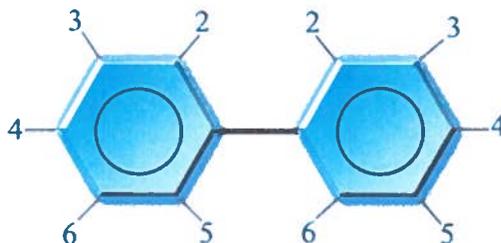


Figure 1. 1 Structure chimique de la molécule de biphenyl polychlorés

La molécule est composée de deux anneaux de benzènes reliés ensemble et où les atomes d'hydrogène sont substitués par des atomes de chlore.

Depuis leur première utilisation en 1930, diverses applications industrielles des BPC en ont été faites grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières.

Cependant, étant donné leur stabilité exceptionnelle, les BPC sont des composés qui se dégradent difficilement provoquant leur bioaccumulation dans l'environnement et dans les organismes vivants. Les BPC sont la cause de certains effets biologiques néfastes pour l'homme et pour les animaux. L'intérêt public a d'ailleurs été éveillé quant aux risques reliés à la pollution industrielle suite à l'incendie de déchets dangereux contenant des BPC survenu le 23 août 1988, à Saint-Basile-Le-Grand. Également, depuis cet événement, plusieurs recherches scientifiques tentent d'évaluer les effets biologiques de ces contaminants sur l'homme et l'environnement

1.1.2 Fabrication des BPC

Les BPC ont été synthétisés en Allemagne en 1881, mais introduits sur le marché industriel en 1929 aux États-Unis. Entre 1929 et 1977, leurs utilisations industrielles ont été très variées : fluides diélectriques, machineries hydrauliques, pompes à vide, turbines à gaz, fluides pour échangeurs de chaleur, lubrifiants, caoutchoucs et résines synthétiques, plastiques divers, peintures, abat poussière pour les routes de terre, solvants pour l'épandage d'insecticides (Twaroski et al., 2001.). Les BPC ont également eu diverses utilisations militaires dans l'équipement électrique et électronique. Avant l'instauration d'une réglementation sur les méthodes d'élimination de ces contaminants, les BPC ont surtout été introduits dans l'environnement par l'élimination non réglementée de produits tels les encres à papier, les agents d'étanchéité, les peintures et les huiles usées (Environnement Canada, résumé 2001). Dû à leur persistance dans l'environnement et à la découverte d'effets toxiques leur étant attribués, la production commerciale contenant des BPC est arrêtée, puis interdite en 1977. En 1996, le Canada, le Mexique et les États-Unis établissent un cadre de gestion écologique des BPC pour l'Amérique du Nord (Groupe d'étude sur les BPC, décembre 1996).

1.1.3 Distribution environnementale des BPC

Les contaminants organiques (biphényles polychlorés, insecticides, herbicides, hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc.) ont la capacité de voyager avec les particules minérales et les matières organiques en suspension dans l'eau. Selon les conditions hydrodynamiques, les matières en suspension se déposent, par la suite, sur le fond des cours d'eau pour former des sédiments (Saint-Laurent Vision 2000). La grande stabilité des BPC dans l'air favorise leur déplacement sur des milliers de kilomètres dans l'atmosphère (Sans-nom.,1994.) avant de tomber au sol. Cependant, ils demeurent volatiles jusqu'à leur destruction. Le **Tableau 1.1** répertorie la demi-vie suggérée des différents congénères de BPC dans l'environnement (Environnement Canada BPC, 1997; Mackay., 1992.).

Composés	Air	Eau	Sol	Sédiment
Monochlorobiphényl	~ 1 semaine	~ 8 mois	~ 2 ans	~ 2 ans
Dichlorobiphényl	~ 1 semaine	~ 8 mois	~ 2 ans	~ 2 ans
Trichlorobiphényl	~ 3 semaines	~ 2 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Tetrachlorobiphényl	~2 mois	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Pentachlorobiphényl	~ 2 mois	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Hexachlorobiphényl	~ 8 mois	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Heptachlorobiphényl	~ 8 mois	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Octachlorobiphényl	~ 2 ans	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Nonachlorobiphényl	~ 2 ans	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans
Decachlorobiphényl	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans	~ 6 ans

Tableau 1. 1 Demi-vies suggérées pour les biphényles polychlorés dans divers milieux naturels

En présence de rayons ultraviolets, les BPC peuvent se transformer en un autre congénère par un processus de photolyse. Dans un milieu aquatique, la photolyse peut être le seul processus efficace de la dégradation abiotique, l'hydrolyse et l'oxydation ne jouant pas de rôle important (Organisation Mondiale de la Santé, 1993). Les BPC sont insolubles dans l'eau. Par conséquent, les BPC s'adsorbent facilement aux particules. En

milieu aquatique, ils s'intègrent aux particules en suspension et aux particules de sédiments. Les BPC sont difficiles à détruire parce qu'ils sont très stables, mais il existe un centre spécial fixe canadien de traitement des déchets en Alberta près de Swan Hills qui incinère les déchets albertains.

1.1.4 Exposition aux BPC

La contamination directe à des niveaux élevés de l'homme et des animaux par les BPC peut survenir de façon accidentelle ou être d'origine alimentaire. L'intoxication massive des habitants de la ville de Fukuoka et Nagasaki au Japon qui a été provoquée par une contamination de l'huile de riz (maladie de Yusho) en est un exemple (Deml et Oesterle., 1987.). Des particules de BPC ont également été trouvées dans des oeufs de volailles nourries avec de la farine de poisson contaminée. Autres que les contaminations dites ponctuelles, il existe des contaminations constantes et insidieuses des milieux naturels par les BPC. La bioaccumulation des BPC dans l'environnement par les organismes vivants se fait davantage par les espèces aquatiques. En effet, les résidus de BPC peuvent pénétrer l'organisme par voie cutanée, mais surtout par voie brachiale en raison des échanges permanents des espèces aquatiques avec leur milieu (Portigal et al., 2002.). De plus, grâce à leur extrême stabilité et à leur solubilité dans les lipides tissulaires, les résidus de BPC se retrouvent en concentration croissante dans la chaîne alimentaire chez les organismes animaux. Les espèces au sommet de la pyramide alimentaire, comme l'homme, seront donc plus exposés aux BPC. Cependant, la plupart des Canadiens ne sont exposés qu'à de faibles niveaux (Santé Canada., 2003.).

La plupart des effets biologiques observés résultent d'une exposition répétée ou chronique aux contaminants. Les effets varient selon le nombre d'atomes de chlore substitués sur le congénère et l'espèce contaminée. Il peut donc y avoir une grande différence dans la réponse toxique selon les espèces. La réponse varie également entre les individus d'une même espèce en fonction du sexe, de l'âge, de la voie d'exposition, de la dose d'exposition et de la région de l'organisme où les BPC se sont concentrés. Les

effets néfastes sont nombreux et très variés. Des atrophies ou hypertrophies du foie, des pertes progressives de poids, des atrophies du thymus et de la rate, des atteintes immunologiques humorale et cellulaire, des porphyries, des éruptions cutanées appelées "chloracné", des dysfonctionnements du système reproducteur et des toux chroniques sont quelques-uns des symptômes retrouvés chez les personnes contaminées. Une des principales conséquences d'une contamination aux BPC est un oedème généralisé de l'organisme suggérant que les BPC augmentent la perméabilité cellulaire.

L'absorption quotidienne moyenne d'un adulte moyen (70 kg) s'établit à 3,3 µg et représente une dose journalière de 0,047 µg/kg lorsqu'elle est pondérée en fonction du poids corporel. Pour un nourrisson allaité d'un poids moyen de 5 kg, l'absorption quotidienne moyenne est de 2,6 µg ce qui correspond à une absorption estimée de 0,52 µg/kg (Santé Canada., 2003.; Newsome et al., 1998.). L'exposition aux BPC d'un adulte qui consomme un repas par jour de poisson peut être supérieure à 120 µg/jour, soit une dose journalière de 1,7 µg/kg. Une étude menée par Santé Canada sur différents groupes d'âge et de sexe a démontré que l'apport alimentaire en BPC varie de 20,3 ng/kg/jour pour un enfant de 0 à 6 mois et diminue progressivement jusqu'à 5-6 ng/kg/jour vers l'âge de 40 à 65 ans et plus (Santé Canada., 2003.) Les principales sources de contamination connues sont les rejets industriels et la diffusion progressive des BPC dans le milieu à partir des matériaux qui en contiennent.

1.1.5 Métabolisme des BPC

Les molécules de BPC sont absorbées par les trois voies d'entrée de l'organisme que sont la voie respiratoire, la voie digestive, la peau et les muqueuses (Newsome et al., 1998.). Le mode de pénétration d'une substance chimique dans l'organisme dépend des propriétés de cette substance et de la biologie de l'organisme. Les composés chimiques hydrophobes insolubles dans l'eau tels les BPC et le DDT peuvent être absorbés par la peau. De plus, comme d'autres composés chimiques volatiles qui existent à l'état gazeux, les BPC peuvent être inhalés. Le poisson est un exemple d'une espèce qui peut être

exposée à des substances chimiques pouvant s'introduire durant la respiration par ses branchies. Une fois absorbées, ces substances passent dans la circulation sanguine et se distribuent à travers les tissus. En raison de leur caractère liposoluble, les BPC s'accumulent très rapidement dans les tissus riches en lipides, comme les graisses et les tissus nerveux. Cependant, l'accumulation dans le foie, les reins, le coeur et les muscles se fait à des niveaux moins élevés (Casarett and Doull's., 2001.).

Une des modifications observées suite à la métabolisation des BPC par l'organisme consiste en une hydroxylation partielle d'une molécule de benzène par fixation de 1 ou 2 groupements OH. Cette modification est réalisée au niveau des microsomes hépatiques ou par d'autres mécanismes d'insertion (**Figure 1.2**). Dans l'environnement, les congénères de BPC qui portent moins de 4 molécules de chlore peuvent être dégradés par les cytochrome P-450 qui utilisent la voie oxydative, biodégradation aérobie (Harkness et al., 1993.), ou par la réduction d'un atome de chlore sur les congénères très substitués, réaction appelée biodégradation anaérobie (Abramowicz., 1995.) (**Figure 1.3**).

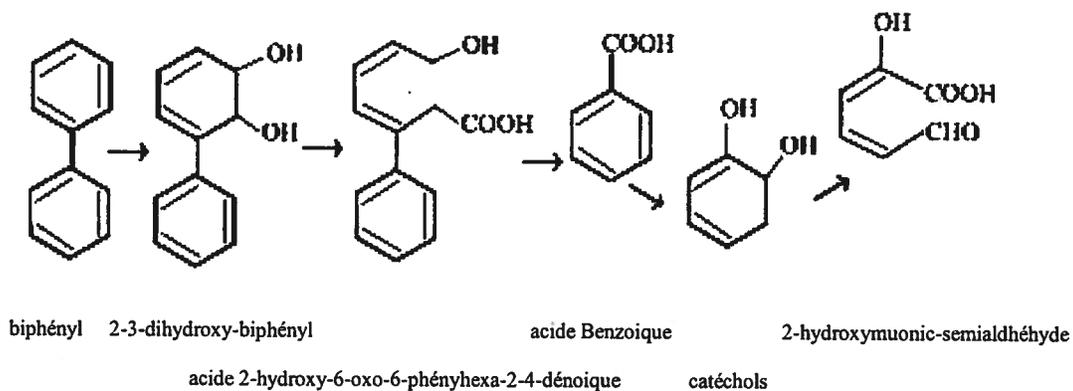


Figure 1. 2 Oxydation des BPC

Dégradation d'une molécule de BPC selon une réaction d'oxydation chimique.

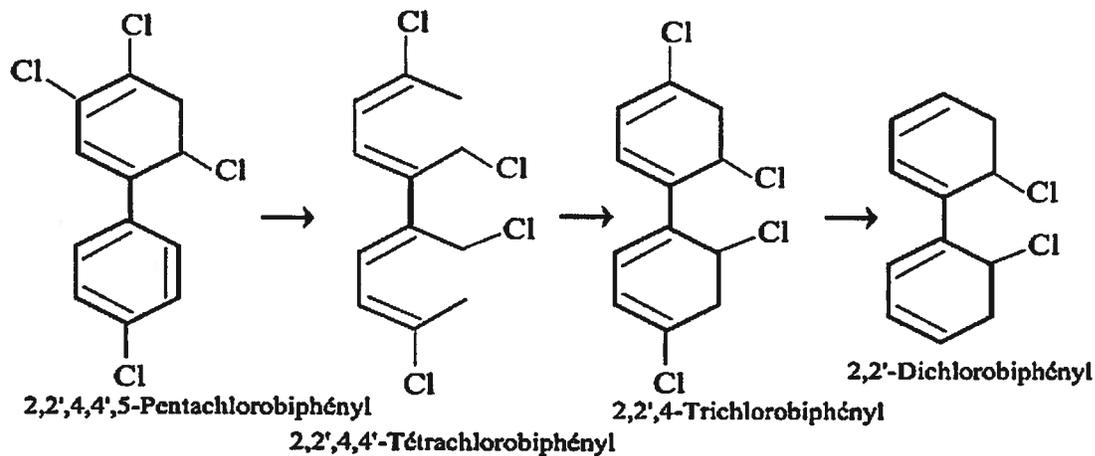


Figure 1. 3 Réduction des BPC

Dégradation d'une molécule de BPC selon une réaction de réduction chimique.

L'élimination, très limitée, des BPC par l'organisme se fait surtout sous forme hydroxylée par voie digestive, notamment par la bile, et à un moindre niveau par l'urine. L'élimination par voie mammaire existe également et pose un problème dans la surveillance hygiénique du lait bovin et également du lait humain (Kostyniak et al., 1999.). De plus, les BPC peuvent traverser la barrière placentaire et semblent se concentrer préférentiellement au niveau du fœtus chez les mammifères, (Lyche et al., 2004.).

1.1.6 Effets des BPC

Les polluants environnementaux tels les BPC affectent les mécanismes de métabolisation et peuvent devenir des substrats pour certains enzymes métaboliques (Twaroski et al., 2001.). Les BPC sont de puissants inducteurs des monooxygénases dépendantes du cytochrome P-450 (CYP-450) qui sont responsables de la métabolisation de plusieurs substances endogènes et exogènes à l'organisme (Dragnev et al., 1995.; Chu et al., 1995.; Sinclair et al., 1997.; Haag-Gronlund et al., 1997.; Hahn et Chandran.,

1996.; Franklin et al., 1997.). Ils causent aussi une augmentation de réactifs oxygénés (ROS) dans l'organisme qui endommagent l'ADN (McLean et al., 2000.). Les BPC fortement substitués en atomes de chlore génèrent un stress oxydatif altérant la régulation et l'activation de certains gènes (Morsi et al., 2003.; Senft et al., 2002.). La glutathione-S-peroxydase (GSP) est un enzyme capable de détoxifier l'organisme humain des ROS (Mylchreest et Charbonneau., 1997.), mais les BPC en répriment l'expression (Twaroski et al., 2001.). Le groupe de Lee et Tharappel a démontré que le BPC 77, un congénère des BPC, augmente la prolifération cellulaire et l'activité apoptotique des cellules hépatocytaires alors que le BPC 153, un autre congénère, inhibe les mécanismes d'apoptose de ces cellules d'environ 50% (Tharappel et al., 2002.). Les BPC 77 et BPC 126 semblent aussi responsables de l'inactivation de l'enzyme hépatique méthoxyrésorufin-O-déméthylase (MROD). En effet ces deux BPC causent la déméthylation de la MROD, enzyme important dans le processus de dégradation des BPC (Chen et al., 2002.).

Les BPC ont la capacité de modifier le système hormonal. Dues à leurs propriétés structurales, les BPC se lient au récepteur des hydrocarbures aromatiques («aryl hydrocarbon receptor» ou AhR), récepteur qui est un facteur de transcription distinct de la superfamille des récepteurs des stéroïdes. Il semble que les BPC présentant une structure coplanaire possèdent une grande affinité pour le récepteur Ah, alors que les BPC non-coplanaires aient peu d'affinité, mais provoquent une activité biologique plus importante (Fischer et al., 1999.). Il a été montré que les BPC induisent ainsi l'expression de certains gènes AhR-dépendants ou modifient l'expression de certains enzymes métaboliques (Denison et Whitlock., 1995.). Plusieurs études font référence à l'inductibilité des CYP-450 par les AhR (Besselink et al., 1998.; Hestermann et al., 2000.). De plus, une petite diminution de la concentration de l'hormone thyroïdienne, soit la thyroxine (T4), dans le plasma sanguin suite à l'exposition aux BPC a été observée (Morsi et al., 2003.; Kato et al., 1999.; Khan et al., 2002.). Portigal et collaborateurs (Portigal et al., 2002.) ont démontré que différents congénères de BPC (BPC 42, BPC 128 et BPC 138) favorisent aussi la diminution du taux de liaison des androgènes avec le récepteur aux androgènes (AR). Des mélanges commerciaux de BPC (Aroclor 1260,

1254 ou 1248) qui contiennent entre 50 et 70 différents congénères de BPC (BPC 118, BPC 138, BPC 154, BPC 170 et BPC 180 en autre) présentent aussi la possibilité d'inhiber l'activité de transcription du AR (Ulbrich et Stahlmann., 2004.). Il a également été démontré que certaines régions promotrices cibles des récepteurs aux estrogènes peuvent être modulées par les BPC (Kramer et Giesy., 1999.; Safe., 1998.; Layton et al., 2002.; Yamada-Okabe et al., 2004.).

Une étude effectuée chez des rats femelles (Long-Evans) en gestation a révélé une diminution du taux hormonal de l'estradiol (E2) et une augmentation de la testostérone suite au traitement par l'Aroclor 1254 (Kaya et al., 2002.). Les organismes femelles semblent donc plus susceptibles d'être affectées par les BPC (Haag-Gronlund et al., 1997.). Leur plus grand nombre de récepteurs aux estrogènes actifs pourrait en être la cause (Gallant et al., 2000.). Les effets significatifs enregistrés chez les rats mâles sont une hypersécrétion de l'hormone thyrotrophine (TSH) menant à une légère augmentation de la promotion de tumeurs thyroïdiennes (Gallant et al., 2000.). Des observations faites dans une clinique de fertilité humaine chez des femmes âgées de 28 à 32 ans ont montré que les BPC ne sont pas présents en concentration suffisante dans les fluides folliculaires pour causer des effets négatifs aux ovocytes et sur les capacités reproductrices suite à un traitement aux BPC (12 BPC- 1,25 ng/BPC) (De Felip et al., 2004.).

Les BPC altèrent aussi la synthèse de l'hème et provoque alors un accroissement de la porphyrie hépatique (Sinclair et al., 1997.; Hahn et Chandran., 1996.). La porphyrie est la résultante d'une excrétion massive de porphyrines fortement carboxylées dans l'urine. Celle-ci peut causer des lésions cutanées et des dommages au système nerveux. Hahn et Chandran ont proposé que les CYP-1A des microsomes hépatiques sont capables de catalyser l'oxydation des uroporphirinogènes (Hahn et Chandran., 1996.). Une inhibition de l'expression des CYP-1A via les AhR par les BPC conduit nécessairement à une accumulation d'uroporphyrines. D'autres études attestent que les BPC inhibent l'enzyme UROD (uroporphyrinogène décarboxylase) (Franklin et al., 1997.; Mylchreest et Charbonneau., 1997.) provoquant ainsi une accumulation d'uroporphyrine et d'heptacarboxylporphyrine responsable de l'uroporphyrine, une condition semblable à la

porphyrie cutanée tardive (Franklin et al., 2002.). En plus de ces effets biochimiques, une exposition aux BPC entraîne des effets cancérigènes, embryotoxiques, génotoxiques et tératogènes (Fischer et al., 1998.; McLean et al., 2000.; Dragan et al., 1998.).

1.2 La Cancérogenèse

1.2.1 Cancérogenèse génotoxique et épigénétique

Il existe de nombreuses formes de cancers provoquées par des agents chimiques dits cancérigènes. Les substances qui mènent au développement de tumeurs lors d'un cancer se divisent en deux classes.

Les substances génotoxiques induisent des mutations dans le matériel génétique d'un tissu cible ou interfèrent avec la réplication ou la réparation de l'ADN. Ces substances, comme le tamoxifène, le nickel, le cadmium et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) (Casarett and Doull's., 2001.), altèrent l'information génétique et modifient alors la structure et le fonctionnement de certaines molécules.

Des agents non-génotoxiques, appelés agents épigénétiques, contribuent aussi au développement du cancer bien qu'ils n'interagissent pas directement avec l'ADN. Ces agents affectent indirectement la cancérogenèse. Ils vont plutôt altérer l'expression de certains gènes qui eux stimulent la division cellulaire en plus d'inhiber la réparation d'un dommage potentiellement génotoxique et de moduler les interrelations cellulaires. Les substances telles les contraceptifs oraux, le DDT ou le phénobarbital se retrouvent dans cette catégorie (Casarett and Doull's., 2001.). Les BPC font partie de cette classe d'agents. Ils semblent avoir des effets modulateurs au niveau des promoteurs de gènes cibles et ce, notamment pour les enzymes hépatiques de biotransformation.

1.2.2 Prolifération cellulaire et cancer

Une propriété importante des cellules cancéreuses est leur prolifération incontrôlée dans un organisme. Les cellules normales en croissance forment une couche monocellulaire et cessent de se diviser par un processus appelé inhibition de contact. Les cellules malignes forment plutôt des couches multicellulaires n'ayant aucune limite quant au nombre de division cellulaire (Oliver et Roberts., 2002.). Les modèles expérimentaux ont permis d'établir que la cancérogenèse chimique est un processus dynamique comportant plusieurs phases (Dragan et Pitot., 1992., Pitot et Dragan., 1994.). La cancérogenèse se divise en trois stades distincts (**Figure 1.4**) soit l'initiation, la promotion et la progression (Mori et al., 1999.; Trosko et Ruch., 1998.).

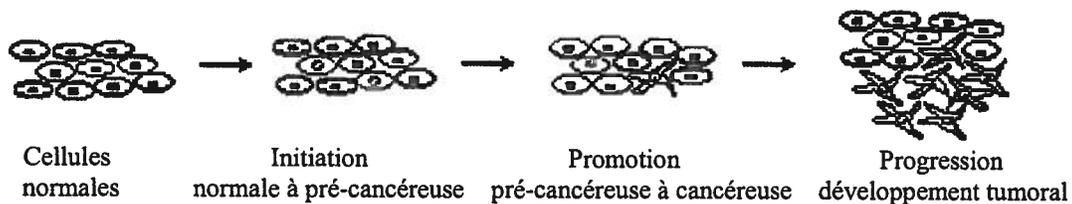


Figure 1. 4 Stades de la cancérogenèse

Transformation d'une cellule normale dans un processus de cancérogenèse (JE Moulder)

L'initiation est la première étape de la cancérogenèse. Une ou plusieurs cellules acquièrent certaines modifications génétiques irréversibles qui se transmettent lors de divisions cellulaires subséquentes et qui leur confèrent la propriété de proliférer sous l'effet d'agents promoteurs. L'avantage sélectif qu'a une cellule initiée par rapport aux cellules normales ne s'exprime qu'en présence d'agents promoteurs. Les promoteurs peuvent stimuler sélectivement la prolifération et/ou empêcher le déclenchement de l'apoptose des cellules initiées (Shrenk et al., 2004). Les hépatocytes initiés ne se distinguent pas des hépatocytes normaux sur le plan morphologique. Cependant, certains travaux ont montré que des hépatocytes initiés peuvent être détectés par la mise en

évidence histochimique de l'isoenzyme placentaire de la glutathione S-transférase (GST-P) (Pitot et al., 1989.). Ces expériences ont permis de démontrer que, sous l'effet d'un promoteur, seule une faible fraction des cellules GST-P sont capables de donner naissance à des foyers hépatocytaires altérés.

La promotion est un processus réversible qui permet la prolifération et l'expression sélective de cellules initiées. Au cours de la cancérogenèse hépatique, la phase de promotion se caractérise d'abord par l'apparition de foyers hépatocytaires altérés et ensuite de nodules hyperplasiques également appelés "adénomes", "nodules de régénération" ou "nodules néoplasiques". Ces nodules se détectent suite à un examen macroscopique de différents tissus tels les tissus hépatiques et les tissus mammaires. Certains marqueurs histochimiques précisent les caractéristiques phénotypiques et l'identification de ces foyers est alors possible dès qu'ils atteignent la taille de 3 à 5 cellules. Les modifications phénotypiques varient en fonction de la nature du promoteur utilisé et donnent un avantage sélectif aux cellules initiées par rapport aux cellules normales à survivre et à se répliquer sous l'effet d'un promoteur. Des promoteurs comme le diéthylnitrosamine (DEN) ou le phénobarbital induisent la formation de foyers hépatocytaires et affectent l'expression de plusieurs enzymes. En effet, l'expression de GST-P et de gamma-glutamyltransférase (GGT) augmente sous l'influence de ces promoteurs tandis que l'expression de l'adénosine-5'-triphosphatase (ATPase) diminue (Xu et al., 1990.). La réversibilité du processus de promotion engendre une régression de la croissance des foyers et/ou nodules lorsque l'administration du promoteur est interrompue (Schulte-Hermann et al., 1999.). Cependant, les cellules initiées conservent leur sensibilité à une stimulation par les promoteurs entraînant la réapparition des foyers et/ou nodules lors de la réintroduction du promoteur.

La phase de progression se définit par l'apparition irréversible de nodules hyperplasiques et de tumeurs malignes. Cette phase se caractérise par l'acquisition du phénotype malin classique c'est à dire de la capacité à envahir les tissus et à métastaser. L'entrée dans la phase de progression est spontanée dans les modèles expérimentaux d'initiation-promotion et est probablement la conséquence de mitoses anormales

favorisées par l'augmentation de la prolifération cellulaire. Cette phase se caractérise par une instabilité chromosomique menant à l'activation de proto-oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Trosko et Ruch., 1998.). Récemment, il a été évoqué que certains agents non mutagènes comme le benzène, structure chimique de base des BPC, peuvent sélectivement déclencher l'entrée de cellules dans la phase de progression (Pitot et Dragan., 1994.).

Les agents cancérigènes sont classés selon la phase dans laquelle ils interviennent soit en agent initiateur, promoteur ou déclenchant la progression. Les cancérigènes "complets" sont des agents capables d'induire à eux seuls le développement de cancers, c'est à dire qu'ils sont à la fois des initiateurs, des promoteurs et des agents déclenchant la progression.

1.2.3 Cancérogenèse des BPC

La tumorigenèse est souvent accompagnée de changements dans l'ADN chromosomique, de réarrangements génétiques, d'amplification ou de perte de loci chromosomaux ou de retard de développement (David J. Lockhart., 2000.). Mayes et collaborateurs ont évalué le potentiel des Aroclors (différents mélanges de BPC) à induire un effet cancérigène sur des rats mâles et femelles Spragues-Dawley (Mayes et al., 1998.). Les hydrocarbures polycycliques chlorés comme la dioxine TCDD, les biphényles polychlorés (BPC) ou polybromés (PBB), puissants inducteurs du CYP1A1, 1A2 et 1B1, se sont révélés être hépatocancérigènes chez le rat. Comme il a été établi que ces produits se fixent sur les récepteurs Ah, (Denison et Whitlock., 1995.), il est possible que leurs propriétés cancérigènes dérivent plus de leur capacité à stimuler la prolifération cellulaire hépatique que d'avoir un effet inducteur enzymatique (Huff et al., 1994.). Cependant, une métabolisation accrue des estrogènes endogènes par le CYP1A2 et le CYP1B1 peut conduire à la formation de dérivés catéchols et contribuer, de cette façon, à l'effet cancérigène de ces produits (Huff et al., 1994.). En effet, certains métabolites d'oxydation qui se fixent de façon covalente aux protéines ou à l'ADN comme les dérivés

catéchols déclenchent un stress oxydatif à l'origine de phénomènes de cytotoxicité et de génotoxicité.

1.3 Le Foie

1.3.1 Cancer du foie

Le foie pèse de 1 à 1,5 kg chez l'humain et est un organe important de l'organisme assurant de nombreuses fonctions métaboliques de régulation. Les hépatocytes, cellules hépatiques, et les cellules biliaires représentent les deux principaux types de cellules dans le foie et ils jouent un rôle essentiel de régularisation de la plupart des produits chimiques dans le sang. Le foie occupe plusieurs fonctions importantes, notamment l'entreposage du glucose et la synthèse de protéines, de facteurs de coagulation, du cholestérol et de la bile. Le foie sert aussi de système de nettoyage et libère le sang des toxines en altérant leur structure chimique et en les excréant dans la bile. Il procède à la dégradation des porphyrines, des xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme vivant) et des médicaments grâce à une série de réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de conjugaison et de méthylation (Biochimie, Voet and Voet, 1996, p 792). Lors de la filtration du sang, les cellules cancéreuses peuvent se fixer dans le foie et s'y développer en nodules métastatiques. Les cancers qui trouvent leurs origines dans les voies gastro-intestinales s'étendent souvent au foie. La remarquable capacité de régénération du foie peut également être liée au développement de cancer du foie. La prolifération néoplasique d'origine hépatocytaire en est la plus fréquente cause. Dans plus de 90 % des cas, le développement de cancer est relié à la cirrhose, une maladie hépatique, ou peut être lié aux différentes hépatites chroniques virales. Il peut aussi être favorisé par des carcinogènes chimiques comme l'aflatoxine (Coleman., 2003.) ou toutes autres substances qui changent l'homéostasie des gènes régulateurs du foie (Thorgerisson et Grisham., 2002.).

1.3.2 Hépatocarcinogénèse des BPC

Le mode primaire d'action des BPC dans un processus de carcinogénèse est relié à la promotion de tumeurs (Millis et al., 1985.). Au niveau du foie, plusieurs composés non carcinogènes le deviennent à la suite de diverses réactions de détoxification. Chez les rongeurs, l'apparition de tumeurs et les BPC a d'abord été démontré par (Kimbrough et al., 1975.; Mayes et al., 1998.). Leurs études ont démontré une augmentation de l'apparition de nodules néoplasiques menant à un effet carcinogène chez une population de rats Sherman suite à une exposition de 21 mois à l'Aroclor 1260. Des lésions préneoplasiques dans le foie ont également été observées par Schaeffer (Schaeffer et al., 1984.) chez un groupe de rats Wistar soumis à une diète au Clophen A30 ou A60 (mélanges de BPC). pour un dosage variant de 5 à 60 mg/Kg/jour durant 25 à 110 semaines. Lors d'une étude sur la promotion de tumeurs, il a été observé que le BPC 156, dont les atomes de chlore sont substitués en position mono et ortho sur le biphenyl, induit la croissance de foyers de cellules dans le foie de rats (Haag-Gronlund et al., 1997.). Les effets des Aroclors, quant à eux, se sont manifestés surtout au niveau du foie des rats femelles par une diminution de leur poids corporel, une hypertrophie hépatocellulaire (van der Plas et al., 1999.), une augmentation des enzymes cellulaires et une altération du métabolisme des lipides notamment au niveau du cholestérol (Mayes et al., 1998.). Les enzymes hépatiques transforment les BPC en métabolites hydroxylés. Cependant, les inductions hépatiques continues des cytochromes P-450, en absence de xénobiotiques oxydables, peuvent générer des réactifs oxygénés (ROS) tel que le peroxyde (H_2O_2) et ainsi mener à la peroxydation des lipides, à certains dommages à l'ADN (McLean et al., 2000.; Twaroski et al., 2001.) et à une hypertrophie du foie (Silberhorn et al., 1990.). Les résultats de Fadhel et collaborateurs (Fadhel et al., 2002.) ont en effet indiqué que les BPC 77 (Chu et al., 1995.) et BPC 153 (30 et 150 $\mu\text{mol/kg}$) induisent les enzymes du cytochrome P-450 causant la peroxydation des lipides dans le foie. D'ailleurs, la GST est un enzyme marqueur de cellules tumorales dont l'expression est influencée par les BPC (Tanno et Aoki., 1996.). Enfin, l'étude de Gallant et collaborateurs a révélé que le BPC 118 provoque des changements ultrastructuraux lipidique et mitochondrial au niveau du foie des rats traités (Gallant et al., 2000.).

1.4 Le Sein

1.4.1 Cancer du sein

Au Canada en 2004, le cancer le plus fréquent chez les femmes demeurait le cancer du sein. Il est responsable d'environ 30 % des nouveaux cas de cancer chaque année. Le cancer du sein apparaît chez environ une Canadienne sur neuf au cours de la vie. Au Canada, on estime à 21 200 le nombre de personnes qui ont reçu un diagnostic de cancer du sein en 2003 et à 5 200 le nombre de celles qui en sont décédées (Statistique Canada., 2003.). De plus, l'incidence de ce type de cancer augmente depuis 20 ans au Canada et elle est maintenant environ 25 % plus élevée qu'au début des années 1980. Environ 0,6 % des cas surviennent chez les hommes, ce qui signifie qu'environ 145 hommes par année recevront un diagnostic de cancer du sein et 45 qui en mourront. De nombreux facteurs accroissent le risque de développer ce type de cancer. Le vieillissement, les grossesses ou premières grossesses après l'âge de 30 ans ainsi que les facteurs héréditaires jouent un rôle important. D'ailleurs, l'expression de certains gènes tels BRAC1 et BRAC2 est associée à l'augmentation du risque de cancer du sein (Miki et al., 1994.; Lancaster et al., 1996.; Coyle., 2004.). Par contre, des facteurs alimentaires comme l'ingestion de phytoestrogènes ou de produits de soja contribuent à la diminution du risque du cancer (Adlercreutz., 2002.). Finalement, les BPC possèdent des activités immunosuppressives et estrogéniques, ce qui pourrait contribuer au développement de tumeurs dans la glande mammaire (Connor et al., 1997.).

1.4.2 Cancérogénèse des BPC : Les cellules mammaires

Dans les tissus mammaires, l'estrone (E_1) et la 17β -estradiol (E_2) sont principalement métabolisés par les cytochromes P-450 1A1 et 1B1 (Haag-Gronlund et al., 1997.). Riches en tissus adipeux, le tissu mammaire favorise la bioaccumulation des substances lipophiles, tels les BPC et les dioxines. Les dioxines interfèrent avec les mécanismes hormonaux normaux et peuvent causer le cancer du sein de type hormono-

dépendant. Les mélanges de congénères de BPC possèdent des propriétés estrogéniques et anti-estrogéniques (Connor et al., 1997.; van Duursen et al., 2003.). Il a été démontré que la forme hydroxylée de E₂, la 4-hydroxyestrogène, peut agir comme substance cancérigène. Celle-ci peut former des complexes capables d'affecter les purines de l'ADN, une cause potentielle de l'initiation de tumeurs lors l'apparition de cancer (Cavalieri et al., 1997.; Parham et al., 1997.). Les MCF-10A, une lignée humaine de cellules mammaires épithéliales non-cancéreuses et les MCF-7, une lignée cellulaire humaine tumorale, expriment toutes deux les récepteurs aux estrogènes (ER) et le récepteur Ah sensible à l'action des dioxines et des BPC (Spink et al., 1998.). Des études réalisées par l'équipe de van Duursen (van Duursen et al., 2003.) sur ces types cellulaires ont permis d'observer que les formes hydroxylées de E₁ et E₂, par deux voies métaboliques distinctes, possèdent des effets inverses quant à la promotion de tumeurs suite à des traitements avec les dioxines (van Duursen et al., 2003.). Il a aussi été constaté que la stimulation de la croissance cellulaire, le nombre de molécules de liaison affectant l'ADN et la quantité d'autres métabolites de E₂ potentiellement cancérigènes augmente selon les dioxines et BPC employés (TCDD > PCB169 > PCB126). D'autres études ont cependant démontré qu'une des formes métabolisées de E₂, la 2-méthoxyestrogène, inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose cellulaire (LaVallee et al., 2002.; Russo et al., 2002.) réduisant ainsi les risques de développer des cellules cancéreuses. Par ailleurs, une plus grande activité métabolique de l'estradiol chez les MCF-10A que chez les MCF-7 occasionnée par l'enzyme 17β-hydroxy-stéroïde-déshydrogénase (17β-HSD) survient suite à l'influence des BPC (Parham et al., 1997a.). De plus, une diminution de la quantité de E₂ et d'autres métabolites produits a été observée réduisant ainsi les risques de d'une transformation oncogénique pour les cellules normales.

Les BPC affectent aussi les différentes protéines impliquées dans les échanges intercellulaires. Les promoteurs des gènes des connexines, protéines impliquées dans la communication intercellulaire dont nous parlerons à la section suivante, sont modulés par les BPC (Locke., 1998.).

1.5 La communication intercellulaire et les types de jonctions

Il existe différents types d'interactions entre les cellules. Ces interactions permettent aux cellules de réguler leur différenciation, prolifération et communication. Le rôle des jonctions cellulaires est d'assurer une protection tout en formant un environnement favorable aux échanges et aux interactions entre les cellules en développement. Des protéines, dont notamment trois types importants, soit les cadhérines, les claudines et les connexines sont impliquées dans la formation des jonctions cellulaires. Ces protéines qui jouent un rôle dans l'adhésion, l'étanchéité de la membrane cellulaire et la communication peuvent se retrouver à la surface d'une même cellule dans la majorité des tissus épithéliaux.

1.5.1 Les cadhérines

Les cadhérines forment une famille de molécules d'adhésion intercellulaire dépendante du calcium qui sont importantes pour la différenciation, la structure tissulaire et qui sont impliquées dans la signalisation cellulaire (Takeichi., 2002.; Fujimoto et al., 1997.). Ces glycoprotéines transmembranaires d'environ 720 à 750 acides aminés sont en contact avec les autres cellules. Leur domaine cytosolique est généralement uni aux éléments du cytosquelette pour former des structures différenciées. Ce segment extracellulaire se compose de cinq domaines homotypiques, dont quatre fixant le Ca^{2+} . Il comporte aussi un site de reconnaissance spécifique et de liaison dans la portion N-terminale (**Figure 1.5**; tirée de la p1151, Lodish et al., 1997.). Il existe trois types de cadhérines (cadhérines E, P et N), mais la Cadhérine dite épithéliale, E-Cad, constitue la plupart des couches épithéliales au niveau des points de contact entre les faces latérales des cellules polarisées. L'inhibition d'adhérence intercellulaire que peut causer la E-Cad empêche la formation subséquente de certains types de jonctions cellulaires, comme les desmosomes ou les jonctions lacunaires (Gumbiner., 1988.). Des études ont démontré que la modulation de la voie de signalisation et l'attachement au cytosquelette par les

Cadhérines impliquent une interaction entre la région intracellulaire des cadhérines et les Caténines. Les caténines sont impliquées dans la régulation fonctionnelle de la voie de signalisation des cadhérines lors du développement embryonnaire et de la tumorigenèse. De plus, il semble que l'activation des cadhérines dépend de l'état de phosphorylation de la β -Caténine (Takeichi., 1991.; Gumbiner et McCrea., 1993.; Gumbiner., 1988.; Gumbiner., 2000.).

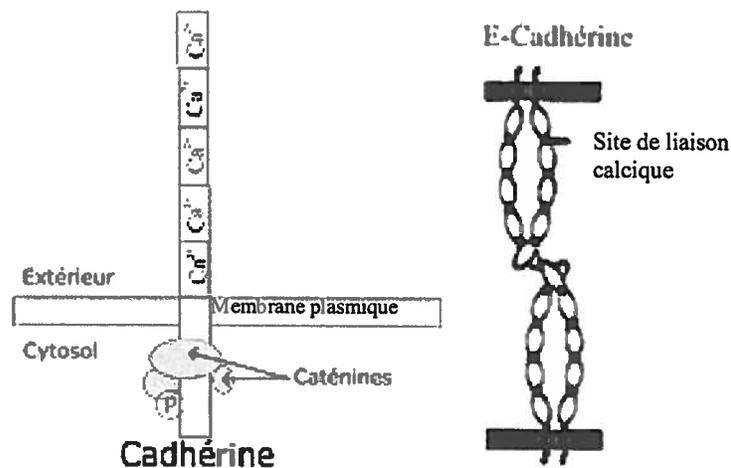


Figure 1. 5 Représentation d'une Cadhérine dans une cellule épithéliale

La liaison cellule-cellule se fait dans le premier domaine. La portion intracellulaire interagit avec le cytosquelette, est impliquée dans les voies de signalisation et se lie aux Caténines (basé selon Gumbiner., 2000.)

1.5.2 Les claudines

Les jonctions serrées ou "tight junctions", réalisent la fusion des feuilletts externes des membranes de deux cellules voisines et les unissent solidement. Elles marquent la frontière entre deux zones de la membrane plasmique, la membrane apicale et la membrane basale, fonctionnellement très différentes. La lame basale possède des invaginations qui pénètrent à l'intérieur du tissu conjonctif nécessaires à la nutrition de la cellule. Le réticulum endoplasmique et une certaine concentration de mitochondries se

trouvent au niveau du pôle basal.

Les claudines et les occludines, des protéines transmembranaires, constituent majoritairement les jonctions serrées et sont spécifiques des tissus épithéliaux (Fanning et al., 1999.; Mitic et al., 2000.). Les claudines forment un chapelet ou une bande en forme d'anneau ceinturant complètement la cellule localisée à l'apex des cellules épithéliales (**Figure 1.6**). Les structures spécifiques du tissu apparaissent au pôle apical des cellules épithéliales où se situent l'appareil de Golgi ainsi que plusieurs mitochondries. Les jonctions serrées sont aussi formées de protéines extrinsèques qui interagissent avec les filaments d'actine. Il a été démontré que les claudines et les occludines forment un complexe avec des protéines cytoplasmiques comme les zona occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (Parham et al., 1997.; Haag-Gronlund et al., 1997.; Naiki et al., 2002.). De cette façon, elles bloquent totalement la circulation des fluides entre les cellules et assurent l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires. Elles empêchent, par exemple, les enzymes digestifs et les microorganismes présents à l'intérieur de l'intestin de passer à l'extérieur dans la circulation sanguine. Le maintien de la polarité des cellules endothéliales est aussi assuré par les jonctions serrées.

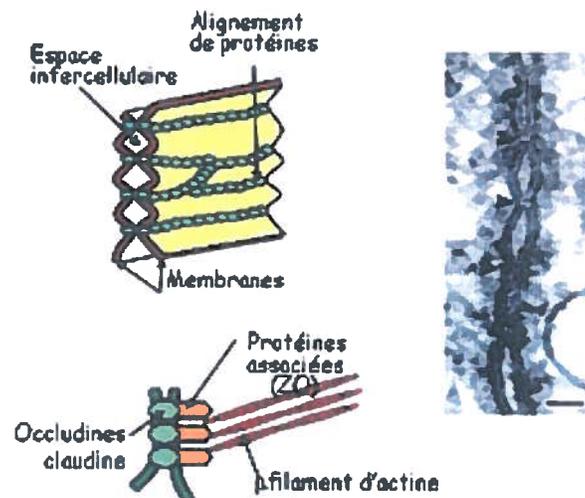


Figure 1. 6 Représentation d'une jonction serrée dans une cellule épithéliale

La liaison cellule-cellule se fait dans le premier domaine. La portion intracellulaire interagit avec le cytosquelette et est impliquée dans les voies de signalisation. Les flèches de la figure de microscopie (Nature Reviews Molecular Cell Biology 2, 285-293,

2001) montre les jonctions entre les membranes de deux cellules.

1.5.3 Les connexines

Les connexines (Cx) sont des protéines intégrales membranaires exprimées dans plusieurs types cellulaires et chez toutes les espèces animales. Les différentes Cx (**Tableau 1.2**) possèdent un aspect morphologiquement identique entre elles. Elles possèdent une extrémité amine (NT) et une extrémité carboxyle (CT) qui se localisent dans le cytoplasme (**Figure 1.7**). Deux domaines extracellulaires (E1 et E2) constitués de trois cystéines les composent et leur permettent de maintenir leur conformation par la formation de ponts disulfures intramoléculaires. Elles contiennent aussi un domaine cytoplasmique en boucle (CL). Les Cx effectuent quatre passages dans la membrane plasmique et ces domaines polypeptidiques sont alors nommés M1, M2, M3 et M4. Une de ces hélices alpha transmembranaire (M3), plus hydrophile que les trois autres et ayant une séquence bien conservée entre les différentes connexines, borde la paroi du pore central lors de la formation des jonctions (Yamasaki et al., 1993.; Holder et al., 1993.). Les homologues de séquence entre les différentes Cx sont assez élevées. Cependant, elles varient au niveau de leur taille et de la séquence de l'extrémité C-terminale présente dans le cytosol. Ce segment, dans la région C-terminale, confère une spécificité fonctionnelle de chaque Cx due à la présence de résidus pouvant être phosphorylés (porosité des canaux des jonctions) et de sites possibles d'interaction avec d'autres protéines (Bruzzone et al., 1996.; Bruzzone., 2001.). Les Cx sont nommées d'après leur poids moléculaire (Cx26, Cx32, Cx43, etc.).

La protéine traduite de l'ARNm codant pour les Cx passe par l'appareil de Golgi. Un hexamère de connexines est alors formé, donnant naissance, par la suite, à la création de connexons (Musil et Goodenough., 1993.). Ce phénomène est appelé couplage cellulaire. Les connexons sont alors transportés par les vésicules à la membrane plasmique pour former des canaux intercellulaires, appelés jonction lacunaire ou "gap", au travers desquels les cellules échangent des ions et des métabolites cytoplasmiques, par un processus identifié comme GJIC ("gap junctional intercellular communication") (Segretain et Falk., 2004.). La structure primaire et la topographie de ces canaux sont

très conservées au cours de l'évolution. Chez les mammifères, ces protéines forment une famille multi-génique comprenant une vingtaine d'isoformes.

Connexine	Source	Tissu	Références
Cx26	rongeur, humain	foie, glande mammaire, intestin, pancréas, épидидyme, cochlée	(Parham et al., 1997.; Haag-Gronlund et al., 1997.; Monaghan et al., 1996.; Hahn et Chandran., 1996.; Mylchreest et Charbonneau., 1997.; McLean et al., 2000.; Gregory et al., 2001.; Naiki et al., 2002.; Parham et al., 1997.; Momiyama et al., 2003.)
Cx30	rongeur	cerveau, peau, cochlée (souris)	(Schielen et al., 1995.; Bouthillier et al., 1996.; Franklin et al., 1997.; Twaroski et al., 2001.; Parham et al., 1997.)
Cx30.3	rongeur	rein, peau	(Mayes et al., 1998.; Yamazaki et al., 2002.)
Cx31	rongeur	rein, peau, placenta	(Mayes et al., 1998.)
Cx31.1	rongeur	peau, épithélium	(Budunova et al., 1996.; Goliger et Paul, 1994.; Hennemann et al., 1992.)
Cx32	rongeur, humain	glande mammaire, foie, système nerveux, pancréas, thyroïde, rein, épидидyme	(Munari-Silem, 1996.; Pozzi et al., 1995.; Krutovskikh et al., 1995.; Bartosiewicz et al., 2000.; Waring et al., 2001.; Kuraoka et al., 1993.; Dufresne et al., 2001.; Naiki et al., 2002.; Plante et al., 2002.)
Cx33	rongeur	testicule	(Bednar., 2000.)
Cx36	rongeur, humain	œil, système nerveux central	(Shimkets et al., 1999.; Xu et al., 2001.; Parham et al., 1997.)

*Tableau inspiré de Cyr, Pillet et Nicholas., 2001

Tableau 1.2 Connexines identifiées chez les mammifères

Cx37	rongeur, humain	cœur, endothélium, estomac, testicule, ovaire, peau, poumon	(Pritchard et al., 2001.; Gibson., 2002.; Twaroski et al., 2001.; Michael D. Kane., 2000.; Willecke et al, 1991.;
Cx40	rongeur, oiseau, bovin, humain	cœur, endothélium, muscles lisses, poumon, rétine	(Young., 2000.; Gerhold et al., 2001.; Yue et al., 2001.; Dragnev et al.; 1995.; Parham et al., 1997.)
Cx43	rongeur, oiseau, humain	cœur, endothélium, œil, cellules immunitaires, épидидyme, glande mammaire, ovaire, utérus, pancréas, thyroïde, peau	(Fischer et al., 1998.; Monaghan et al., 1996.; Portigal et al., 2002.; Hahn et Chandran., 1996.; Twaroski et al., 2001.; Tharappel et al., 2002.; Yue et al., 2001.)
Cx45	rongeur, humain	cerveau (embryonnaire), cœur, intestin, rein, poumon, peau, système olfactif	(Gould et al., 1999.; Tharappel et al., 2002.; Besselink et al., 1998.; David J. Lockhart., 2000.; Parham et al., 1997.; Bouthillier et al., 1996.)
Cx46	rongeur	cœur, rein, œil, poumon	(Hestermann et al., 2000.; Gould et al., 1999.; Bouthillier et al., 1996.)
Cx50	rongeur, humain	cœur, œil	(Hestermann et al., 2000.; Zampighi et al., 1999.; Duggan et al., 1999.)
Cx57	rongeur	peau, cœur, rein, testicule, ovaire. Intestin	(Scherf et al., 2000.)

*Tableau inspiré de Cyr, Pillet et Nicholas., 2001

Tableau 1. 2 (suite) Connexines identifiées chez les mammifères

D'un pore d'environ 1,5 à 2 nanomètres de diamètre, les jonctions lacunaires permettent les échanges biochimiques de petites molécules et de seconds messagers ayant moins de 1 kD (Ruch et al., 1994.). Il se crée généralement des agglomérats de canaux (100-1000) à la surface membranaire des cellules formant ainsi des plaques dites jonctionnelles (Yeager et al., 1998.). La perméabilité de chaque type de Cx étant sélective, elles contrôlent le passage d'informations spécifiques pouvant influencer sur l'état de différenciation des cellules. La distribution de chaque type de Cx est donc spécifique aux différents tissus chez l'adulte et elle est régulée étroitement lors de l'embryogenèse. Les jonctions lacunaires ont une demi-vie très courte, soit de 1,5 à 5 heures (Laird et al., 1995.; Goodenough et al., 1996.). La synthèse et la dégradation régulière des jonctions

par les lysosomes ou le protéasome sont responsables de la modulation de la communication cellulaire de différents tissus (Laird., 1996.; Laing et al., 1997.; Windoffer et al., 2000.; Falk., 2000.; Haag-Gronlund et al., 1997.; Segretain et Falk., 2004.) .

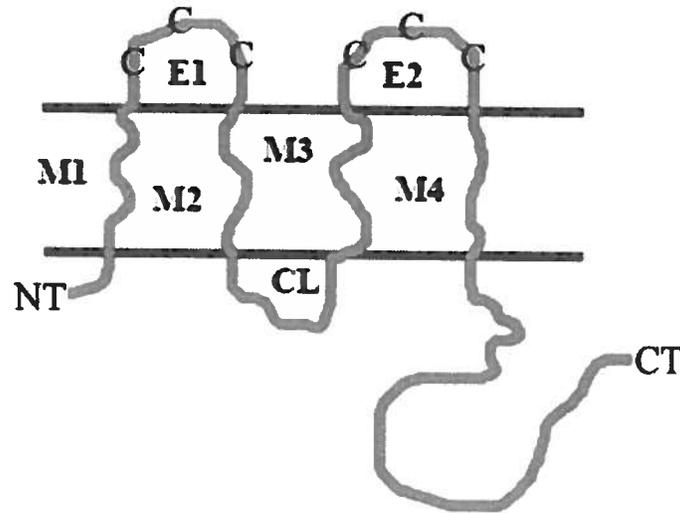


Figure 1. 7 Schéma structural d'une Connexine

NT : N-terminal ; M1 à M4 : domaines transmembranaires ; E1 et E2: domaines extracellulaires ; C : cystéines ; CL : boucle cytoplasmique ; CT : C-terminal.

Inspiré de (Bruzzone et al., 1996.)

1.5.3.1 Les jonctions lacunaires

Les cellules peuvent échanger des ions, des petites molécules et des messagers par des canaux. Ces canaux permettent aux cellules de communiquer entre elles et de reconnaître les autres cellules d'un même tissu. Les communications intracellulaires, intercellulaires et extracellulaires assurent un contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire. Dans certains cas, lorsque l'homéostasie régnant entre les cellules d'un tissu est modifiée ou interrompue, des tumeurs peuvent se développer et mener à divers types de cancer. Récemment, la formation et la promotion

de tumeurs ont été associées à une lacune dans la communication cellulaire via les jonctions lacunaires qui permettent la GJIC (Mesnil., 2002.; Ruch et Trosko., 2001.; Krutovskikh et Yamasaki., 1997.; Krutovskikh et Yamasaki., 1997.).

1.5.3.2 Structure des jonctions lacunaires

La communication entre deux cellules se fait par le biais de canaux transmembranaires. La juxtaposition de deux connexons forme ces canaux appelés jonctions lacunaires et relie deux cellules voisines (**Figure 1.8**). Un canal peut se composer de connexons identiques (canal homotypique) ou différents (canal hétérotypique). De plus, il peut être homomérique s'il se constitue d'un seul type de Connexine ou hétéromérique s'il s'agit de différents types de Connexines (**Figure 1.9**) (Goodenough et al., 1996.; Parham et al., 1997.). Les connexons ont une forme cylindrique mesurant 7,5 nm de long et 7 nm de diamètre.

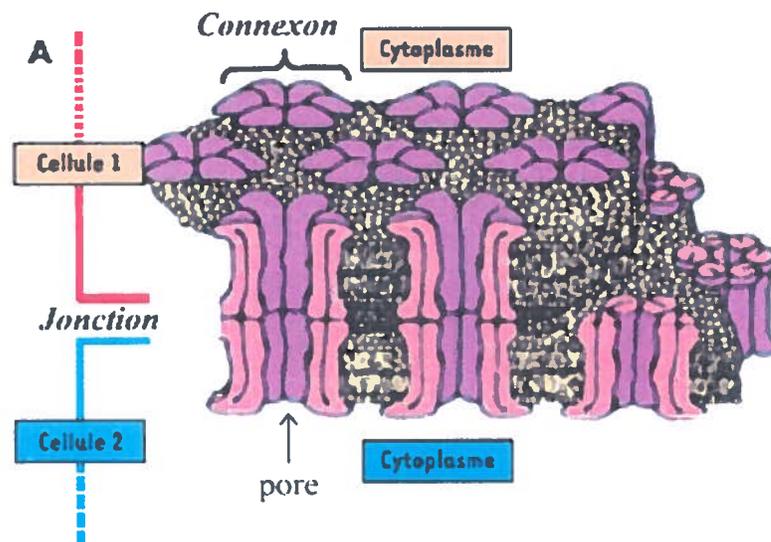


Figure 1. 8 Structure physique d'une jonction lacunaire

Arrangement de connexons formant les jonctions lacunaires.

Tiré de (Mesnil., 2004.)

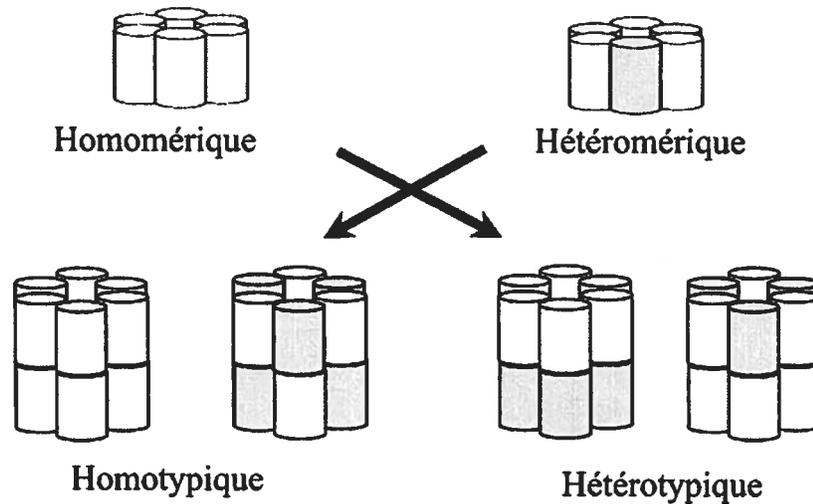


Figure 1. 9 Couplage cellulaire de Connexines

Les jonctions lacunaires sont constituées de deux connexons eux-mêmes formés de six sous-unités appelées connexines. (Inspiré de Goodenough et al., 1996.)

1.5.3.3 Le rôle des jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires assurent l'homéostasie entre les cellules d'un tissu en permettant l'échange de petits médiateurs (<1kD) (Bruzzone., 2001.) comme l'AMPC et de petits composés nécessaires à la formation des molécules d'ADN et d'ARN. Ces échanges permettent aux cellules de partager un réservoir commun de métabolites, rendant solidaires les activités métaboliques de toutes les cellules d'un tissu. La grosseur de leurs pores forme une barrière contre les macromolécules telles les protéines ou l'ARN assurant une intégrité fonctionnelle aux cellules. Il existe plusieurs méthodes d'isolation et de caractérisation des jonctions lacunaires (Hertzberg et Gilula., 1979.).

Les jonctions communicantes ont deux fonctions au sein des tissus. Elles effectuent un couplage métabolique et un couplage électrique entre deux cellules voisines. Les fonctions physiologiques du couplage cellulaire sont encore peu comprises.

Cependant, l'observation de la modification de diverses connexines chez des animaux transgéniques (rongeurs) occasionne de multiples et sévères phénotypes, indique que ce couplage assure des rôles importants dans la régulation du fonctionnement cellulaire. Les jonctions lacunaires sont aussi impliquées dans la régulation du potentiel membranaire d'une cellule à une autre dans les synapses électriques. Celles-ci facilitent la propagation plus rapide et plus fidèle des potentiels d'action dans les cellules excitables que ne le permet la synapse chimique. Elles sont essentielles pour une contraction coordonnée lors de l'échange de Ca^{2+} cytosolique (Lodish., 1997.) chez les cellules cardiaques et pour les contractions cellulaires de la paroi intestinale ou de l'utérus lors d'un accouchement. Au niveau des neurones du cerveau, les jonctions lacunaires permettent un largage rapide des neurotransmetteurs dans les parties pré et post-synaptique. Les jonctions lacunaires jouent d'autres fonctions indispensables dans la régulation du développement embryonnaire du rein, du pancréas et du poumon et dans le transport de nutriments dans les tissus non-vascularisés.

1.6 La communication intercellulaire dans le foie et le sein

1.6.1 La GJIC et les cellules du foie

Le foie est composé de plusieurs cellules ayant diverses fonctions comme les hépatocytes qui produisent la bile et emmagasinent le glycogène. Les cellules de Kupffer, des macrophagocytes, les cellules épithéliales biliaires et les lipocytes, des lymphocytes granulaires, quant à elles, possèdent des fonctions anti-tumorales (Kmiec., 2001.). Deux types de Cx, la Cx32 et la Cx26, forment majoritairement les jonctions lacunaires dans le foie des mammifères (Ruch., 1994.; Krutovskikh et Yamasaki., 1997.; Yamasaki et al., 1993.; Bryant, 1997.; Mesnil., 2002.; Stoehr et Isom., 2003.) . La Cx 43 est présente dans le tissu épithélial et conjonctif du foie ainsi que dans les cellules souches des hépatocytes encore non différenciées (Ma et al., 2003.).

1.6.2 La GJIC et les cellules mammaires

Le sein se compose principalement de cellules mammaires (épithéliale, myoépithéliale, fibroblaste) et de cellules adipeuses. La glande mammaire est subdivisée en plusieurs lobes qui contiennent le tissu glandulaire proprement dit (épithélium). Ce dernier est formé d'une série de tubes microscopiques convergeant vers quinze à vingt canaux galactophores qui conduisent aux cellules alvéolaires. Chez les rongeurs, trois types de Cx sont présents, soit les Cx26, Cx43 et Cx32 (Monaghan et al., 1996.). Les recherches de Monaghan et collaborateurs ont démontré que l'expression de la Cx26 se fait lors de la gestation et de la lactation dans les cellules luminales (Monaghan et al., 1996.). La Cx43 est plutôt exprimée dans les cellules basales et l'expression de la Cx32 survient dans les cellules des glandes mammaires de souris, mais pas dans celles de l'humain. D'autres études ont permis d'observer une expression différentielle des Cx26 et Cx32 chez les femmes enceintes et lors de la lactation dans les cellules alvéolaires (Locke., 1998.). Deux types de cellules mammaires ont été utilisés, soit les MCF-7 (lignée cancéreuse) et les MCF-10A (lignée normale) capable de respectivement exprimer la Cx43 et les Cx26 et Cx43.

Le niveau de jonction lacunaire est contrôlé par les hormones dans les glandes mammaires (Laird et al., 1999.) (Saez et al., 2003.) (van Duursen et al., 2003a.). En effet, une élévation du taux d'estrogènes augmente l'expression de la Cx43 des cellules utérines de rats après la naissance (Locke., 1998b.). Chez ces animaux, une baisse d'expression de la Cx43 après l'ovulation s'explique par une diminution du niveau d'estrogènes et une élévation de l'hormone lutéinisante (LH) (Locke., 1998.). Par ailleurs, la perte de communication entre des cellules mammaires modulée par les jonctions lacunaires semble reliée à la phosphorylation des Cx43 et Cx32 par certains oncogènes (Locke., 1998.). L'adhérence jouant un rôle important sur la communication cellulaire, les cadhérines maintiennent l'intégrité de la couche de cellules épithéliales chez les cellules des glandes mammaires.

1.6.3 Les jonctions lacunaires et le cancer

Certains contaminants retrouvés dans l'environnement sont reliés à la perte ou à la modulation de mécanismes régulateurs des jonctions lacunaires (Trosko et Ruch., 1998.; Trosko et Chang., 2000.) et peuvent induire l'apparition de tumeurs (Holder et al., 1993.; Krutovskikh et Yamasaki., 1997.). Ces contaminants peuvent être génotoxiques, mais également épigénétiques et altérer ainsi certains mécanismes de transcription de l'ADN entraînant l'inhibition de la synthèse des composés constituant les jonctions lacunaires. Plus d'échange de métabolites, d'hormones ou de seconds messagers n'est pas possible sans ces jonctions venant ainsi perturber l'homéostasie entre les cellules et l'inhibition de contact impliquées dans la croissance cellulaire (McLean et al., 2000.). La perte de communication des jonctions lacunaires dans un processus de cancérogenèse ne résulte pas nécessairement de la diminution de l'expression d'une Cx spécifique ou de son niveau d'ARNm. Elle est aussi influencée par l'activation d'oncogènes et la perte d'adhésion cellulaire des cadhérines entraînant généralement l'augmentation d'un phénotype de cancer plus agressif ou malin (Locke., 1998.). Comme l'expression de la Cx43 diminue lors d'un cancer du sein, elle devient alors un bon marqueur de diagnostic (Laird et al., 1999.). Il a aussi été établi que l'expression de la Cx26 est proportionnelle à l'agressivité d'un cancer et peut être efficace dans l'inhibition de la croissance des cellules MCF-7 et dans leur capacité à devenir invasive (Momiyama et al., 2003.).

La plupart des polluants environnementaux promoteurs de tumeurs sont majoritairement épigénétiques. Récemment, la découverte de diverses maladies humaines héréditaires dues à des mutations sur des Cx indique que celles-ci jouent un rôle crucial dans certains organes (Krutovskikh et Yamasaki., 1997.; Evans et Martin., 2002.).

1.6.4 Les jonctions lacunaires et les BPC

Certains biphényles polychlorés (BPC) semblent impliqués dans la perte de la communication intercellulaire surtout au niveau du foie selon plusieurs mécanismes. Les études effectuées sur les effets des BPC rapportent une inhibition réversible des jonctions lacunaires *in vivo* (Bager et al., 1997.; Haag-Gronlund et al., 1998.; van der Plas et al., 2000.; Dean et al., 2002.) et *in vitro* (Hemming et al., 1991.; Kang et al., 1996.) dépendante de la dose entraînant la promotion de tumeurs (Bager et al., 1994.; Kolaja et al., 2000.; Rivedal et al., 2000.; Espandiari et al., 2003.; Krutovskikh et al., 1994.). Dans certains tissus tumoraux de foie, une perte de couplage et une localisation aberrante de la Cx32, en plus d'une expression anormale et cytoplasmique de la Cx43 ont été constatées (Krutovskikh et al., 1994.). D'autres études ont aussi identifié un changement de localisation des Cx de la membrane plasmique vers le cytoplasme, ainsi que des changements post-traductionnels dans leur régulation (Krutovskikh et al., 1995.; Bager et al., 1994.; Warngard et al., 1996.; Mesnil., 2002.).

Différents mélanges de BPC, appelés Aroclors, causent une inhibition de l'expression de l'ARNm de la Cx26, mais n'affectent que peu l'expression de la Cx32 (Krutovskikh et al., 1995.; Bager et al., 1997.). Un traitement de 100 ppm d'Aroclor 1254 provoque une diminution de 30 à 40% de la GJIC, une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération des hépatocytes (Kolaja et al., 2000.). Des 209 congénères de BPC, seuls les congénères 118, 126 et 153 ont fait l'objet d'étude. Il semble que l'ARNm de la Cx32 ne soit que peu affecté par le BPC 126, mais que l'expression de sa protéine soit dépendante de la dose (Bager et al., 1994.; Bager et al., 1997.). Les BPC 118 et 153 peuvent inhiber complètement les GJIC dans des cellules épithéliales de foie de rat après une heure de traitement (Warngard et al., 1996.). Le BPC 153, mais pas le BPC 126, peut diminuer la GJIC à long terme (48h) et influencer sur l'activation de protéines kinases responsables de la phosphorylation des connexines formant les GJIC (Machala et al., 2003.). Une observation portant sur les effets d'un mélange de BPC et de dieldrine a révélé une déphosphorylation de la Cx43 (Kang et al., 1996.; Matesic et al., 1994.). De plus, il a été démontré que le 2,4,5-hexachlorobiphényle

inhibe les jonctions lacunaires des cellules souches neurales et réduit l'expression de la Cx43 en modulant le niveau de Ca^{2+} . Cette inhibition vient alors bloquer les signaux nécessaires à la croissance des cellules du système nerveux (Kang et al., 2001.).

Les BPC affectent la GJIC chez plusieurs types cellulaires. Une étude a permis de remarquer qu'une diminution de l'expression de la Cx43 entraînant une perte d'environ 50% des jonctions lacunaires se produit chez des cellules épithéliales de seins traitées par le 2,4,5-hexachlorobiphényle (Kang et al., 1996.). Le BPC 118 augmente de 95% l'incidence d'apparition de tumeurs et de cancer du sein (Yamasaki et al., 1993.). Spink et collaborateurs ont démontré que les cellules mammaires MCF-10A expriment le ER et le AhR, récepteurs pouvant être modulés par les BPC (Spink et al., 1998.; Krishnan et Safe., 1993.; Connor et al., 1997.; Machala et al., 2004.). Gozgit et collaborateurs ont ensuite suggéré que les HAPs et certains métabolites des BPC agissent sur l'activité du AhR et modulent ainsi la transcription des gènes des Cx (Gozgit et al., 2004.). Ces substances provoquent l'apparition d'un phénotype anti-estrogénique pouvant affecter la GJIC chez les cellules mammaires. Certains congénères de BPC dont le BPC 54 et le BPC 169 affectent le métabolisme des estrogènes chez les MCF-10A et MCF-7 (Arcaro et al., 1999.; van Duursen et al., 2003.). La métabolisation accrue des estrogènes endogènes par les BPC produit plus de dérivés catéchols inhibant les GJIC et contribuent à leur effet cancérigène (Huff et al., 1994.). Certains BPC sont capables d'affecter le métabolisme des cytochromes P-450 des cellules de glandes mammaires. van Duursen, et collaborateurs ont d'ailleurs observé que l'activité des cytochromes P450 1A1 et 1B1 sont inductibles par les dioxines dans les cellules MCF-10A, mais moins chez les MCF-7 (van Duursen et al., 2003.). Les congénères tels que le BPC39, le BPC81, le BPC126 et le BPC169 ont aussi le potentiel d'induire une hausse de l'expression de l'ARNm des CYP450 1A1 et 1B1 des cellules mammaires (Pang et al., 1999.).

1.7 Les jonctions lacunaires et les autres xénobiotiques

1.7.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) sont des polluants environnementaux possiblement cancérigènes et mutagènes pour les humains. Ils possèdent une forte liposolubilité. Ils se retrouvent dans les aliments contaminés et surtout dans les produits de combustion incomplète de matériaux organiques (Till et al., 1999.) comme les produits pétroliers et la fumée de cigarette (Blaha et al., 2001.); (Upham et al., 1996.). Ils affectent l'activité du AhR et perturbent le niveau de Ca^{2+} et l'activation de protéines kinases (MAPK, PKC) impliquées dans la signalisation intracellulaire (Warn-Cramer et al., 1998.; Cruciani et Mikalsen., 2002.). Ils sont aussi de bons inducteurs de cytochrome P-450, lesquels peuvent produire des réactifs oxygénés affectant la GJIC. Les HAP, métabolisés et accumulés en grande partie au niveau du foie, causent la prolifération cellulaire et la promotion de tumeurs via l'inhibition de la GJIC (Upham et al., 1998.). Une étude sur 35 HAP potentiellement inhibiteurs de GJIC faite par Blaha et collaborateurs (Blaha et al., 2002.) a fait ressortir deux groupes de produits qui affectent fortement la GJIC.

Le premier groupe comprend des molécules comme le fluorane, le phénanthrène et le fluoranthène qui augmentent l'inhibition de la GJIC de plus de 70%, alors que le second regroupe des molécules telles que le benzopyrène qui accroissent l'inhibition de la GJIC de 25-50% (Blaha et al., 2002.). Il a aussi été démontré que l'anthracène et sa forme méthylée sur une des neuf positions possibles, peuvent engendrer respectivement une inhibition de la GJIC à des concentrations de 350 μ M et 25-40 μ M (Upham et al., 1996.). La méthylation de l'anthracène forme une poche angulaire sur l'anneau de benzène nommée «bay-like region» similaire à celle que possède le phénanthrène, un puissant inhibiteur de la GJIC (Upham et al., 1994.; Upham et al., 1996.; Rummel et al., 1999.). Les effets des HAP semblent être de nature post-traductionnelle pour les Cx impliquant des mécanismes de phosphorylation par les MAPK et la PKC (Blaha et al., 2002.). Certains HAP présentant une structure similaire à l'anthracène méthylé jouent

aussi un rôle significatif dans la perte de la GJIC par un processus non-génotoxique de promotion de tumeurs menant au cancer (Upham et al., 1996.; Weis et al., 1998.).

Le TCDD ou la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) est la plus toxique des polychloro-dibenzo-dioxines (PCDD). Elle fait partie de la grande famille des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) comprenant les PCDD, PCDF, BPC etc. La toxicité du PCDD varie selon les isomères qui peuvent comporter de 4 à 6 atomes de chlore et ont en communs des substitutions aux positions 2, 3, 7, et 8. La TCDD est stable dans l'environnement, très liposoluble et considérée comme ayant la plus grande activité biologique et la toxicité la plus aiguë des dioxines. Chez l'humain, elle cause des altérations métaboliques, des perturbations du système immunitaire, endocrinien et cellulaire menant à la néoplasie. Les effets de la TCDD se manifestent par l'induction du récepteur Ah et des cytochromes P-450 1A1 et 1A2. Warngard et collaborateurs ont rapporté qu'un traitement au TCDD de 48 heures cause une faible inhibition de la communication intercellulaire chez les cellules IAR20 (cellules épithéliales du tissu de foie de rat) *in vitro* et qu'un recouvrement de la GJIC survient 1 heure après avoir retiré la TCDD (Warngard et al., 1996.). De plus, lors d'une autre étude, il a été montré que 10 ppm de TCDD inhibe faiblement l'expression de la Cx32 dans le foie alors qu'une perte totale de la Cx32 survient pour une concentration de 100 ppm (Warngard et al., 1996.). Les travaux de Mally et collaborateur chez des rats mâles et femelles F344 démontrent qu'un traitement de 3 jours au TCDD (0,25 µg/kg) peut causer une réduction de la Cx32, mais en inhibe significativement l'expression après 28 jours d'exposition (Mally et Chipman., 2002.). La Cx26, quant à elle, est moins exprimée lors de traitements à plus faible dose (0,0025 µg/kg) et plus exprimée à des doses plus fortes. L'apparition d'un phénomène d'adaptation des cellules, indépendamment du fait que des signes d'inflammation soient toujours apparents chez les animaux, expliquerait ces résultats. D'autres études suggèrent qu'une augmentation de la Cx26 chez des cellules néoplasiques d'hépatocytes dépend de la nature de l'agent promoteur utilisé (Neveu et al., 1994.).

1.7.2 Les polluants organiques persistants

Le DDT fait partie des polluants organiques persistants (POP) qui causent des changements significatifs au niveau du foie. Le DDT est un insecticide qui a été couramment utilisé pour enrayer la présence d'insectes transmettant de graves maladies tropicales comme le paludisme (malaria). Absorbé par les plantes et les animaux, il s'accumule dans les tissus adipeux et est de plus en plus présent dans les organismes biologiques au fur et à mesure que la chaîne alimentaire est remontée.

Le DDT est impliqué dans le développement du cancer du foie et agit comme inhibiteur de la GJIC de manière dose et temps-dépendants (Ren et al., 1998.; Guan et Ruch., 1996.). D'ailleurs, un traitement de 2 semaines (5-50 mg/kg/jours) au DDT diminue la GJIC jusqu'à 60% chez les hépatocytes de rats qui se rétablissent après 6 semaines suite à un traitement à 50 mg/kg/jour (Tateno et al., 1994.). Une perturbation dans la régulation des Cx32 et Cx26 peut modifier le nombre de jonctions lacunaires. En effet, le DDT inhibe l'expression de la Cx32 alors qu'il délocalise la Cx26 de la membrane plasmique. Mesnil et son équipe (Krutovskikh et al., 1995.) ont montré que la continuité d'un traitement au DDT prolonge l'inhibition de la GJIC jusqu'à 5 semaines. Ces effets semblent être post-transcriptionnels, car le DDT n'affecte pas le taux d'ARNm des Cx dans le foie (Guan et Ruch., 1996.; Kang et al., 1996.; Ruch et al., 1994.; Leibold et Schwarz., 1993.). De plus, un traitement de 2h à une concentration de 20 μM de DDT réduit la Cx43 dans les cellules de foie des rats WB-F344, sans toutefois altérer l'expression des Cx43 et Cx32 dans les autres types cellulaires (Ren et al., 1998.). L'équipe de Ruch a aussi démontré que la Cx43 est indétectable à la membrane plasmique et dans le cytoplasme suite à un traitement de quatre heures au DDT (25 μM) (Ruch et al., 1990.). Il a alors été suggéré que l'inhibition de la GJIC se fait par un dérèglement du métabolisme de l'AMPc ou par l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire diminuant alors la formation des jonctions lacunaires et la perméabilité de la Cx43 et de la Cx32 les constituants. La phosphorylation des connexines par la PKC peut aussi être à l'origine de cette inhibition (Cruciani et

Mikalsen., 2002.). Il a d'ailleurs été rapporté que le DDT induit l'internalisation et la dégradation des formes phosphorylées de la Cx43 (Cx43-P2) dans les lysosomes entraînant une disparition des plaques jonctionnelles (Ruch et al., 1990.; Ruch et al., 1994.; Ren et al., 1998.).

Le lindane fait également partie des POP. Cet insecticide non mutagène favorise la formation de tumeurs dans le foie. Le lindane possède des effets semblables au DDT quant à l'inhibition de la GJIC. Chez des cellules épithéliales de foie de rat, un changement structurel des plaques jonctionnelles et de la quantité de Cx43 phosphorylées ont été observés suite à un traitement de 50µM de lindane à différents temps (Guan et al., 1995.). L'apparition de deux peptides de 22kDa et de 18kDa qui coïncide avec la perte de la Cx43-P2 et une diminution de l'ARNm de la Cx43 après une exposition au lindane de 1 à 4 heures a aussi été constatée. La perte de plaques jonctionnelles qui s'en suit semble être reliée à l'endocytose des jonctions lacunaires et à leur dégradation dans les lysosomes et elle est réversible 4 heures après le traitement (Ruch et al., 1994.). Le lindane peut aussi causer un stress oxydatif lorsqu'il produit le radical pentachlorocyclohexane. Cet insecticide affecte donc la communication intercellulaire via la formation de radicaux intermédiaires menant à la peroxydation des lipides. Cependant, cette perte de communication peut être évitée par des antioxydants tel que la vitamine E (Leibold et Schwarz., 1993.).

1.7.3 Le phénobarbital

Le phénobarbital (acide éthyl-5-phényl-5-barbiturique) était utilisé comme anti-convulsivant chez les personnes épileptiques et comme hypnotique et sédatif. Promoteur épigénétique de tumeurs surtout dans le foie, le phénobarbital inhibe la communication entre les cellules de 50% à 70% de manière dose-dépendante (Kolaja et al., 2000.; Ito et al., 1998.; Krutovskikh et al., 1995.; Leibold et Schwarz., 1993.). Un recouvrement de la GJIC est par ailleurs possible 24 heures après un traitement au phénobarbital (Warner et al., 2003.). Métabolisé au niveau hépatique, le phénobarbital induit les cytochromes

P450. L'activation de ces cytochromes provoque une augmentation des produits de dégradation du phénobarbital tels les radicaux d'anions superoxydes (réactifs oxygénés, ROS) qui causent un stress oxydatif (Neveu et al., 1994.; Ren et al., 1998.). L'élévation du nombre de ROS affecte la superoxyde dismutase (SOD), un enzyme impliqué dans l'élimination du radical superoxyde très réactif. L'ajout d'agents antioxydants, comme la SOD, la vitamine E ou la glutathione (GSH), permet de rétablir l'équilibre dans la cellule et les GJIC responsables de la communication intercellulaire (Leibold et Schwarz., 1993.).

Le phénobarbital modifie aussi les niveaux d'AMPc et de Ca^{2+} en les abaissant ce qui empêche l'expression des Cx43 et Cx32 constituant les GJIC dans les hépatocytes et les cellules WB, mais pas dans les cellules épithéliales de foie (Ren et al., 1998.). De plus, un traitement au phénobarbital par injection intra-péritonéale (0,1 mg/kg) ou par contamination de l'eau durant 14 jours (500 ppm) diminue de façon dose-dépendante et temps-dépendant, la connectivité des jonctions lacunaires chez des cellules hépatocytaires. Cependant, ce traitement n'affecte pas l'expression des Cx26 et Cx32 (Warner et al., 2003.). Il est possible qu'un traitement à plus long terme au phénobarbital engendre l'apparition d'un effet d'adaptation chez les cellules hépatocytaires abolissant ainsi les effets sur les jonctions lacunaires (Ren et al., 1998.). Le phénobarbital semble aussi provoquer une localisation cytoplasmique de la protéine Cx32 diminuant, par conséquent, la communication entre les jonctions lacunaires des cellules (Ito et al., 1998.; Krutovskikh et al., 1995.).

1.7.4 L'hexachlorobenzène et autres organochlorés

L'hexachlorobenzène (HCB), utilisé comme fongicide dans les années 60 et 70, est un produit cancérigène épigénétique qui induit la formation de tumeurs au niveau hépatique chez les rats femelles (Mylchreest et Charbonneau., 1997.; Plante et al., 2002.). Il provoque un déséquilibre de la voie de biosynthèse de l'hème du foie causant la porphyrie (Schielen et al., 1995.). Une diminution des Cx32 et 26 par le HCB est

impliquée dans la promotion de tumeurs (Charbonneau et al., 1997.; Plante et al., 2002.). Il a en effet été montré qu'un traitement quotidien de 5 jours au HCB (100mg/kg) sur une période totale de 50 jours entraîne une baisse significative du niveau de l'ARNm des Cx32 et Cx26 et que la perte de la GJIC qui s'en suit est spécifique aux femelles (Plante et al., 2002.).

Dans l'environnement, d'autres pesticides ou molécules organochlorés diminuent aussi la formation de GJIC. L'endosulfane (50-200 μ M) affecte les niveaux de GJIC de manière dose-dépendante sans toutefois modifier le niveau d'activité des cytochromes P-450 (Ruch et al., 1990.). Par contre, l'ajout d'un inhibiteur ne parvient pas à rétablir le taux de GJIC. L'endosulfane peut également perturber la différenciation et la prolifération des cellules souches neurales en diminuant de manière dose-dépendante l'expression de la Cx43 (Kang et al., 2001.). Il a aussi été observé que l'endosulfane (10 μ M), en présence d'estrogènes, inhibe la formation des jonctions lacunaires de l'utérus interrompant ainsi l'oscillation des contractions chez des rats femelles à la mi-gestation (Tsai et al., 1998.). L'heptachlor a également un effet inhibiteur sur la constitution des GJIC pour des concentrations utilisées non toxiques pour la cellule (10 μ g/ml) après une heure de traitement (Nomata et al., 1996.). Deux études effectuées avec le pentachlorophénol (PCP) montrent aussi que le taux de GJIC chute de manière dose-dépendant pour un traitement de 2 semaines à une concentration de 300 et 600 ppm chez des cellules épithéliales de foie de rat (Sai et al., 2000.). De plus, ces deux produits affectent post-traductionnellement la Cx43 dans des cellules épithéliales de glandes mammaires en modifiant les signaux intracellulaires de sa localisation et de son recyclage.

1.7.5 Les métaux et les jonctions lacunaires

Le cadmium (Cd) est un métal considéré comme cancérigène par l'IARC depuis 1993, mais ayant peu de propriétés mutagènes. Distribué dans l'environnement par le développement industriel, la principale source d'exposition de Cd sur les humains provient de la fumée de cigarette. Les organes cibles du Cd sont le foie et surtout les reins. Le Cd cause un stress oxydatif qui diminue la GJIC et provoque une altération du cytosquelette (Jeong et al., 2000.; Jeon et al., 2001.). L'inhibition de la GJIC par le Cd relève d'un mécanisme d'activation de la PKC (Yu et al., 1997.) et de la diminution de l'expression de la Cx43 à la membrane cellulaire. Les travaux de Fang montrent qu'un traitement à court terme au Cd augmente la quantité de Cx43 phosphorylée (Cx43 P2) et diminue la quantité de Cx32, sans toutefois altérer la forme non phosphorylée et la forme phosphorylée P1 de la Cx 43 (Fang et al., 2001.). La légère baisse de Cx32 est aussi dépendante du temps et de la dose utilisée dans le traitement (Fang et al., 2001.). Des souris injectées (IP) avec 5 à 60 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de Cd (Jeong et al., 2000.) exposent une inhibition significativement de la communication par les jonctions lacunaires et ce, probablement par la réduction de l'expression des Cx32 et Cx26. Au niveau des reins, il a été montré qu'une diminution de la communication intercellulaire se produit suite à un traitement de 100 μM au Cd durant 30 minutes (Fukumoto et al., 2001.). Une exposition de 20 minutes au Cd augmente la concentration intracellulaire de Ca^{2+} entraînant une perte de communication par les jonctions lacunaires. Cette hausse de Ca^{2+} est le fondement de la néphrotoxicité par le Cd, car elle entraîne la fermeture des GJIC des cellules épithéliales rénales et change ainsi la perméabilité de ces cellules. Le traitement au Cd à long terme cause une diminution des Cx43 et Cx32. Le Cd inhibe donc la GJIC des cellules rénales et hépatiques. Il induit l'apoptose, la nécrose et la prolifération cellulaire suite à une exposition aiguë ou chronique (Jeon et al., 2001.).

L'aluminium (Al) est un métal très utilisé dans le développement industriel, tel que la fabrication automobile. L'Al pourrait être impliqué dans le développement de désordres neurodégénératifs chez les humains tel l'Alzheimer et la maladie de Parkinson, (Sass et al., 1993.) par l'altération profonde du cytosquelette des neurones et des cellules

gliales. Il existe peu de travaux sur les effets de l'aluminium sur la GJIC, mais il semble que l'aluminium affecte les jonctions lacunaires des cellules gliales et l'homéostasie calcique du système nerveux central (SNC) (Kosatsky et al., 1999.; Theiss et Meller., 2001.). L'Al affecte l'état ou le maintien des jonctions lacunaires des astrocytes qui sont responsables de l'environnement extracellulaire et métabolique des neurones. Ce métal perturbe l'agrégation des neurofilaments et induit un couplage non fonctionnel dans le processus du transport axonal (Theiss et Meller., 2001.). De plus, les jonctions lacunaires des astrocytes servent à libérer les ions K^+ extracellulaires et les neurotransmetteurs de l'environnement local des neurones. Un traitement à court terme (1h) ne semble pas affecter la GJIC (Theiss et Meller., 2001.). Il faut de 24 à 41 jours pour voir une diminution, réversible après 7 jours, de la GJIC dans les cellules gliales. Cette diminution est due à une baisse de la Cx43 et mène à un mauvais couplage des jonctions lacunaires entre les astrocytes. Une intoxication à long terme par l'aluminium a des conséquences sur la fonctionnalité des astrocytes en affectant l'activité physiologique des neurones et pourrait ainsi conduire à une neurotoxicité.

Le plomb (Pb^{2+}) et différents types de composés comprenant du mercure (Hg^{2+}) se retrouvent dans l'environnement et sont capables de compétitionner avec le calcium (Ca^{2+}). Ils pénètrent dans la cellule par les mêmes canaux et viennent remplacer le calcium. Ils peuvent alors inhiber les systèmes de transport membranaire comme les pompes (ATPase- Ca^{2+}) et certains canaux calciques. Les jonctions lacunaires s'en trouvent affectés parce que la concentration intracellulaire de Ca^{2+} s'accroît. Ainsi, le plomb et le mercure remplacent le calcium dans la cellule, ferment les canaux voltage dépendants et inhibent la libération des neurotransmetteurs qui dépolarisent la terminaison présynaptique, empêchant ainsi la transmission synaptique (Schirmacher et al., 1998.). Schirmacher et collaborateurs ont démontré, dans une culture primaire de cellules osseuses «osteoblast-like», que le plomb (25 μM) perturbe la médiation du Ca^{2+} et autres signaux de traduction des jonctions lacunaires, sans toutefois jouer directement sur la communication entre ces cellules (Schirmacher et al., 1998.). Le plomb peut aussi bloquer l'action du Ca^{2+} dans la liaison intracellulaire aux protéines régulatrices telles que la PKC et la calmoduline. Cependant, le mercure et le méthylmercure, plus toxique,

diminuent le couplage électrique entre deux jonctions lacunaires de cellules nerveuses de 79.5% et de 62.4% respectivement en moins de 15 minutes. Un autre dérivé du mercure, le chlorure mercurique (HgCl_2), affecte le SNC et induit une néphrotoxicité. Il occasionne des dommages aux fonctions biochimiques mitochondriales et au métabolisme du calcium, et altère l'intégrité du cytosquelette et l'arrangement des cellules membranaires (Aleo et al., 2002.). Un traitement de $50\mu\text{M}$ de HgCl_2 sur des cellules MDKC (epithelial-Danby canine kidney cell) a un effet inhibiteur important sur la jonction lacunaire composés de Cx43. Le HgCl_2 semble agir indirectement sur la GJIC en changeant le taux d'antioxydants (GHS) responsables de la défense de la cellule contre les réactifs oxygénés.

1.8 Buts et Objectifs

Les travaux présentés dans ce mémoire visent à caractériser et à définir le rôle des BPC dans la promotion de tumeurs en étudiant un mélange de six congénères de BPC. Une étude de la transcription de la Cx 32 du foie de rats femelles impliquée dans la communication intercellulaire sera d'abord réalisée. Ensuite, une analyse de la GJIC sera effectuée. Enfin, une étude immunohistochimique de trois différentes protéines de jonctions dans deux différentes lignées cellulaires mammaires, les MCF-7 et MCF-10A, et dans une lignée d'hépatocytes, les MH1C1, permettra de déterminer les effets du mélange de BPC sur leur expression et sur leur localisation.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 BPC utilisés pour le traitement des animaux

Les congénères de BPC les plus prévalents en relation avec l'exposition humaine ont été utilisés pour constituer un mélange. Basés sur des études épidémiologique sur l'endométriose (Lebel et al., 1998.) ou chez de grands consommateurs de poissons (Mayes et al., 1998.; Kostyniak et al., 1999.), les congénères 118, 138, 153, 170, 180, 187 ont été choisis pour constituer un mélange type. Ces six BPC sont :

BPC 118 (2,3',4,4',5 - pentachlorobiphényl)

BPC 138 (2,2',3,4,4',5' - hexachlorobiphényl)

BPC 153 (2,2',4,4',5,5' - hexachlorobiphényl)

BPC 170 (2,2',3,3',4,4',5 - heptachlorobiphényl)

BPC 180 (2,2',3,4,4',5,5' - heptachlorobiphényl)

BPC 187 (2,2',3,4',5,5',6 - heptachlorobiphényl)

Les congénères de BPC qui ont été choisis en fonction d'observation faites chez les pêcheurs sportifs sont également ceux que l'on retrouve en plus grande concentration dans les tissus de tous les Canadiens et Canadiennes. Se sont ces congénères qui, en général, persistent le plus dans l'environnement, les autres congénères dont le degré de persistance est moins élevé sont pratiquement éliminés de l'environnement, il ne reste que des traces relativement aux congénères à l'étude. Le mélange contient une même concentration de chacun des six congénères de BPC. Le mélange 1 se compose de 5 µg/Kg de chaque BPC, le mélange 2 de 50 µg/Kg de chacun des BPC et le mélange 3 est constitué de 500 µg/Kg des différents BPC. Les trois mélanges ainsi formés ont respectivement des charges totales de BPC de 30, 300 et 3000 µg/Kg.

Des rats femelles Sprague-Dawley (Charles River Laboratoires, St. Constant, QC) ont été utilisés pour la réalisation des différentes expériences. Chaque groupe d'animaux (N=6) avait un accès illimité à l'eau et la nourriture durant les jours de traitements. Les conditions de l'animalerie sont les suivantes : une température de 70°F, une photopériode de 12h de lumière et 12h de noirceur et une humidité relative entre 30-70%.

Afin de reproduire une consommation de poisson, la durée du traitement était 90 jours, cette dernière étant la durée typique d'une étude sous-chronique. À partir des mélanges 1, 2 et 3 de BPC décrit précédemment, quatre différents protocoles d'administration dans les rats par gavage dans l'huile de maïs (4 ml/kg) ont été déterminés, soit :

Protocole A : consommation quotidienne ininterrompue; 90 jours

Protocole B : consommation hebdomadaire; 6 semaines et 13 semaines

Protocole C : consommation rapprochée; administration journalière durant 13 jours et abstinence de traitement par la suite.

Protocole D : consommation irrégulière; les rats Sprague-Dawley femelles ont reçu 6 (41 jours) et 13 (90 jours) administration de façon irrégulière.

Le gavage des animaux a été réalisé par les techniciens de laboratoire de l'animalerie du Centre Armand-Frappier de Laval. Il a été arrêté un jour avant le sacrifice et les animaux témoins ont reçu seulement le véhicule, soit de l'huile de maïs (4 ml/kg) selon le protocole d'administration A. Au total, 156 rats femelles, exposé à trois mélanges de BPC selon quatre protocoles d'administration et deux temps d'exposition ont été utilisés.

Suite à leur anesthésie, les animaux ont été sacrifiés par Guylaine Lassonde (technicienne de laboratoire) et Isabelle Plante (étudiante à la maîtrise), puis les foies et le plasma ont été récupérés pour les analyses. Les foies ont été pesés et taillés alors que le plasma a été obtenu par centrifugation du sang dans des tubes héparinés. Les différents échantillons de foie et de plasma ont été conservés à -80°C. La mesure de la

concentration plasmatique et hépatique du mélange des six congénères de BPC a été effectuée par le laboratoire du Dr. Jean-Philippe Weber au Centre de toxicologie du Québec (Institut National de la santé publique, Sainte-Foy, Québec).

2.2 Immunobuvardage de type Northern de la Cx 32

Afin de pouvoir caractériser les effets du mélange de congénères de BPC sur l'expression de l'ARNm de la Cx32 chez les hépatocytes, les groupes les plus différents ont été utilisés. Les échantillons (n=5 ou n=6) du protocole A (A1-A2-A3), constituent les animaux exposés alors que les échantillons de la plus faible concentration en BPC du protocole C (C1) et les échantillons de foies des rats témoins pour une période de 90 jours constituent les tissus de référence. Par conséquent, ce manuscrit ne présente que les résultats obtenus suite au protocole A d'administration des rats avec les mélanges 1, 2 et 3 de BPC durant 90 jours.

2.2.1 Isolation de l'ARN

À partir des échantillons de foie conservés à -80 °C, 100 mg de foie est pesé et homogénéisé dans une solution 4M de thiocyanate de guanidium contenant 1% de mercapto-éthanol. L'homogénéisation se fait à l'aide d'un broyeur de tissu de type Potter en s'assurant de garder l'échantillon sur glace. Des aliquots de 500 µl d'homogénats sont alors récupérés et conservés sur glace ou remisés à -80 °C. L'isolation de l'ARN total se fait par ultracentrifugation dans une solution 2M d'acétate de sodium pH 4 et de phénol-chloroforme-isoamyl (FisherBiotech BP- 1754, Nepean, Ontario). L'ARN isolé est resuspendu dans de l'eau sans RNase et conservé à -20 °C pour une courte période ou remisé à -80°C. Le calcul du rendement et de la pureté de l'isolation est effectué par densité optique (DO) en utilisant l'appareil (PowerWave X, Bio-Tek Instrument Inc, Winooski, Vermont). Les échantillons d'ARN sont ensuite déposés sur un gel d'agarose

dénaturant où seul l'ARN migre afin de vérifier le degré de pureté et de dégradation de l'ARN. Le gel est alors analysé à l'aide d'un Fluor-S (Fluor-STM Multimager, BioRad, Mississauga, ON). Les différents échantillons d'ARN déposés sur un autre gel d'agarose dénaturant sont subséquemment transférés sur membrane de nylon (GeneScreenPlus, PerkinElmer, Boston, Massachusset) à l'aide d'un appareil à transfert (VacuGene, Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC).

2.2.2 Sonde de la Cx32 et sonde 18S

La préparation de la sonde d'ADNc de la Cx32 débute par une culture bactérienne contenant un vecteur d'expression et un plasmide d'un clone de Cx32 (Dr D. Paul, Havard University, Cambridge, MA). Suite à la purification et à la digestion du plasmide par EcoRI, l'ADN codant pour la Cx32 a été obtenu. Une insertion au hasard d'oligonucléotides de 5 μ l de dCTP P³² (Amersham Bioscience, Baie d'Urfé, QC) (Cyr DG., 2001.) est alors ajouté à une solution contenant 50 μ g d'ADN de Cx32, à l'aide d'un ensemble "Ready-to-go" (Labelling Beads (-dCTP) Amersham Bioscience, Baie d'Urfé, QC). Après avoir conservé la fraction contenant l'ADN marqué par le radioisotope, un compte de la sonde est alors effectué à l'aide d'un compteur à isotopes radioactifs (LKB Wallac 1217 RackBeta, Markham, ON). De la même façon, une sonde pour l'ARN ribosomal 18S en présence de 5 μ l de γ ATP-P³² (Amersham Bioscience, Baie d'Urfé, QC) est produite avec l'ensemble "Ready-to-go" suivi d'un compte de la sonde par le compteur bêta. Les deux sondes sont alors conservées à une température de -20 °C.

Après le transfert des différents échantillons d'ARN du gel d'agarose dénaturant sur une membrane de nylon, le marquage de l'ARN à l'étude est effectué à l'aide de sondes radioactives. La membrane subit d'abord une pré-hybridation de 3 heures à 42°C à l'aide d'une solution contenant 10% de sulfate de Dextran (FisherBiotech, Nepean, ON), 10% de SDS, 2X d'une solution de citrate de sodium (SSC, citrate de sodium et chlorure de sodium, pH7) et 40% formamide à laquelle a été ajouté 300 μ l d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Par la suite, une quantité de sonde radioactive

correspondant à 500 000 dpm est ajoutée à la solution de pré-hybridation. La membrane est hybridée pour une période de 24 heures dans un four à hybridation (TEKSTAR Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) à une température de 42°C. Une fois l'hybridation terminée, la membrane subit deux lavages dans une solution de SSC 2X pendant 5 minutes pour éliminer les sondes radioactives non-hybridées. Ensuite, la membrane subit des lavages de 30 minutes dans une solution de SSC 2X contenant 1% de SDS à une température de 55°C jusqu'à ce que le compte radioactif soit inférieur à 200 comptes/seconde. La membrane est ensuite placée dans une cassette Phosphorimager (Molecular Dynamics, Baie d'Urfé, QC) pour une durée de trois jours. La cassette est alors visionnée par un Phosphorimager (PhosphorImager SI™ Molecular Dynamics, Baie d'Urfé, QC). Après avoir fait bouillir la membrane dans une solution de 0,1X SSC et 1% de SDS afin d'enlever la sonde d'ADNc de la Cx32, l'hybridation de la membrane avec la sonde 18S est réalisée pour vérifier la quantité d'ARN total transféré sur la membrane et pouvoir procéder à l'analyse statistique des résultats. L'intégration de l'aire sous la courbe pour chaque signal d'ARNm de Cx32 est donc ajustée en fonction des résultats obtenus avec la sonde d'ARNr 18S ce qui permet de déterminer les niveau relatif d'ARNm de Cx32.

2.2.3 Analyse Statistique

Les variations d'expression de la Cx32 enregistrées dans les différents tissus de foie traités au mélange de BPC sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SigmaStat 2.0 de Jandel Scientific, San Rafael, CA). Le test de Student (test de T) a permis de déterminer les changements dans l'expression de la Cx32. Le seuil de signification était de 0,05.

2.3 Scrape Loading Dye Transfer

Des cellules MH1C1, MCF-7 et MCF-10A ont étéensemencées à une densité de 1,2 million dans des pétris de culture cellulaire (Starstedt, Montréal, QC), puis incubées dans un milieu (MH1C1 dans F12K medium, Sigma, Mississauga, On) humidifié à 37°C

contenant 5% CO₂, supplémenté avec 2,5% de sérum foetal bovin (FBS, Gibco) et 15% de sérum de cheval (HS, Gibco, Burlington, ON). La croissance des cellules MCF-7 s'effectue dans du milieu RPMI (RPMI 1660 Medium, Sigma) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS). Les cellules MCF-10A sont maintenues dans du milieu DMEM-F12 (Sigma) supplémenté par 5% de sérum de cheval (HS) et 0,1% du facteur de croissance épidermique (EGF, Sigma). À 85 % de confluence cellulaire, les cellules sont exposées durant 24 heures à un mélange de six congénères de BPC contenant une charge totale de 50 µM ou de 100 µM, et au véhicule DMSO (Sigma) comme témoin. Le milieu est ensuite retiré, puis les cellules sont rincées par une solution de PBS à un pH de 7,4. À l'aide d'une lame de chirurgie, quelques incisions sont pratiquées dans les pétris en faisant rouler la lame doucement du bas vers le haut (el-Fouly et al., 1987.). Une solution fluorescente de migration constituée de 0,05% de jaune de Lucifer (LY, Sigma) et de 0,05% de Rhodamine-Dextran (RhD, Sigma) est ensuite ajoutée aux cellules pour une période de 5 à 10 minutes. Les cellules sont ensuite rincées par la solution de PBS, puis analysées à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence. En raison de leur poids moléculaires, soit 457 Dalton pour le jaune de Lucifer et 10 000 Dalton pour la Rhodamine-Dextran, seul le jaune de Lucifer migre aux travers des jonctions lacunaires. La distance parcourue par le colorant est alors mesurée à l'aide du logiciel informatique ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

2.4 Immunohistochimie

Les cellules MCF-7 et MCF-10A ont premièrement été cultivées dans des flacons T-75 (Starstedt) et incubées dans un milieu humidifié à 37°C contenant une atmosphère de 5% de CO₂. La croissance des cellules MCF-7 s'effectue dans du milieu RPMI (RPMI 1660 Medium) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS). La croissance des cellules MCF-10A s'effectue dans du milieu DMEM-F12 (Sigma) supplémenté par du sérum de cheval (HS) et du facteur de croissance épidermique (EGF, Sigma). La viabilité des cellules lors des différents passages cellulaires a été mesurée par

un décompte cellulaire au bleu de trypan. Ceci a permis de vérifier s'il y a de la cytotoxicité aux différentes concentrations des mélanges de BPC utilisées.

Les cellules MCF-7 et MCF-10A ont ensuite été incubées dans des lames à huit puits (Lab-Tek Chamber Slide System, Hatfield, PA) respectivement à une densité de 50 000 et 10 000 cellules par puits. Lorsqu'on obtient 75 à 80 % de confluence cellulaire, les cellules sont alors exposées à un mélange de BPC contenant une charge totale des différents congénères de 50 ou 100 μM et du véhicule DMSO comme témoin pour une période de 24 heures. Suite au traitement avec le mélange de BPC, les cellules sont lavées par une solution saline contenant du phosphate pH 7,4 (PBS) et fixées à l'aide de 500 μl de méthanol refroidit à -20°C et placé pour une période de 20 minutes à cette même température. Les lames sont ensuite rincées avec la solution de PBS et entreposées à 4°C avant leur hybridation avec les différents anticorps. Des lames à huit puits étaient premièrement bloquées une heure à 37°C par une solution de PBS pH 7.4 qui contenait 5% de sérum d'albumine de bovin (BSA Fraction V heat shock, Roche, Mississauga, ON). Après avoir rincé les lames avec une solution de PBS, l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS avec 5% BSA était ajouté à chacun des puits. Le puits témoin ne recevait aucun anticorps primaire. Les lames étaient alors entreposées à 4°C pour une période de 24 heures, puis les lames étaient par la suite lavées avec une solution de PBS et exposées à l'anticorps secondaire, le FITC, pendant 45 minutes à 37°C . Une fois les lames rincées par la solution de PBS, les noyaux cellulaires étaient marqués avec une solution de méthanol et de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Roche). Une fois les lames de nouveau rincées, celles-ci ont été fixées par une solution de Gel-Tol (Mounting Medium, ImmunonTM, Pittsburgh, PA). Le premier anticorps utilisé pour le marquage par immunofluorescence a été un anticorps contre la E-cadhérine (H-108, SC-7870, Santa Cruz, CA), un anticorps polyclonal de lapin contre la protéine du rat et la souris. Le second a été l'anti-connexine 43, un anticorps polyclonal de lapin (HS-150 9.3.4 Santa Cruz), alors que le troisième anticorps a été fait chez le lapin contre la Claudine-1 (Zymed, Mississauga, ON). Le deuxième anticorps contre le lapin, élevé chez la chèvre, était couplé à une molécule fluorescente soit l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Sigma).

Les résultats des cellules en immunohistochimie ont été observés à l'aide d'un microscope à fluorescence et du logiciel informatique ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring MD) pour gérer la captation des images. Selon les différentes images obtenues, une caractérisation visuelle de chacune des images selon les traitements nous a permis d'observer si les mélanges influençaient les protéines impliquées dans la communication intercellulaire.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1 Effets du traitement par les BPC sur la communication intercellulaire

3.1.1 Analyse des effets physiques des BPC

Afin de reproduire une consommation sous-chronique de BPC, la durée du traitement a été de 90 jours. Suite à l'administration des mélanges de BPC selon différents protocoles (A à D), les foies et la fraction plasmatique ont été prélevés chez les rats traités et témoins. La **Figure 3.1A** illustre le poids des foies extraits par rapport au poids totaux des animaux traités selon le protocole A durant 90 jours. Nous observons que plus la charge totale en BPC augmente, soit de 90 A1 (90 jours avec une charge de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en BPC) à 90 A3 (90 jours avec une charge de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en BPC), plus le poids du foie de l'animal tend à augmenter. Comme le poids total de l'animal ne varie que très peu selon les traitements, nous constatons principalement qu'il s'agit d'hypertrophie du foie dépendante de la dose de BPC.

Les **Figures 3.1B, 3.1C et 3.1D** représentent la concentration hépatique de BPC ($\mu\text{g}/\text{g}$ lipides), la concentration plasmatique de BPC ($\mu\text{g}/\text{g}$ lipides) ainsi que la concentration hépatique d'uroporphyrine (pmol/g) suite au traitement par les six congénères de BPC. Les résultats de la **Figure 3.1B** montrent une élévation de la concentration de BPC hépatiques par rapport aux témoins de 13,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ de lipide pour le groupe A1 à 112,0 pour le groupe A2 et 604,9 pour le groupe A3. Cette augmentation des niveaux hépatiques de BPC est proportionnelle à l'augmentation de la charge totale de mélange administré. En effet, pour une charge de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BPC, les niveaux hépatiques de BPC sont plus élevés que pour les charges de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en BPC. Les BPC tendent donc à s'accumuler au niveau du foie lorsqu'ils sont administrés. Nous remarquons également, à la **Figure 3.1C**, une augmentation de la concentration de BPC dans la fraction plasmatique en fonction de l'augmentation de la charge totale de BPC du mélange. La concentration de BPC dans le plasma s'accroît en présence du

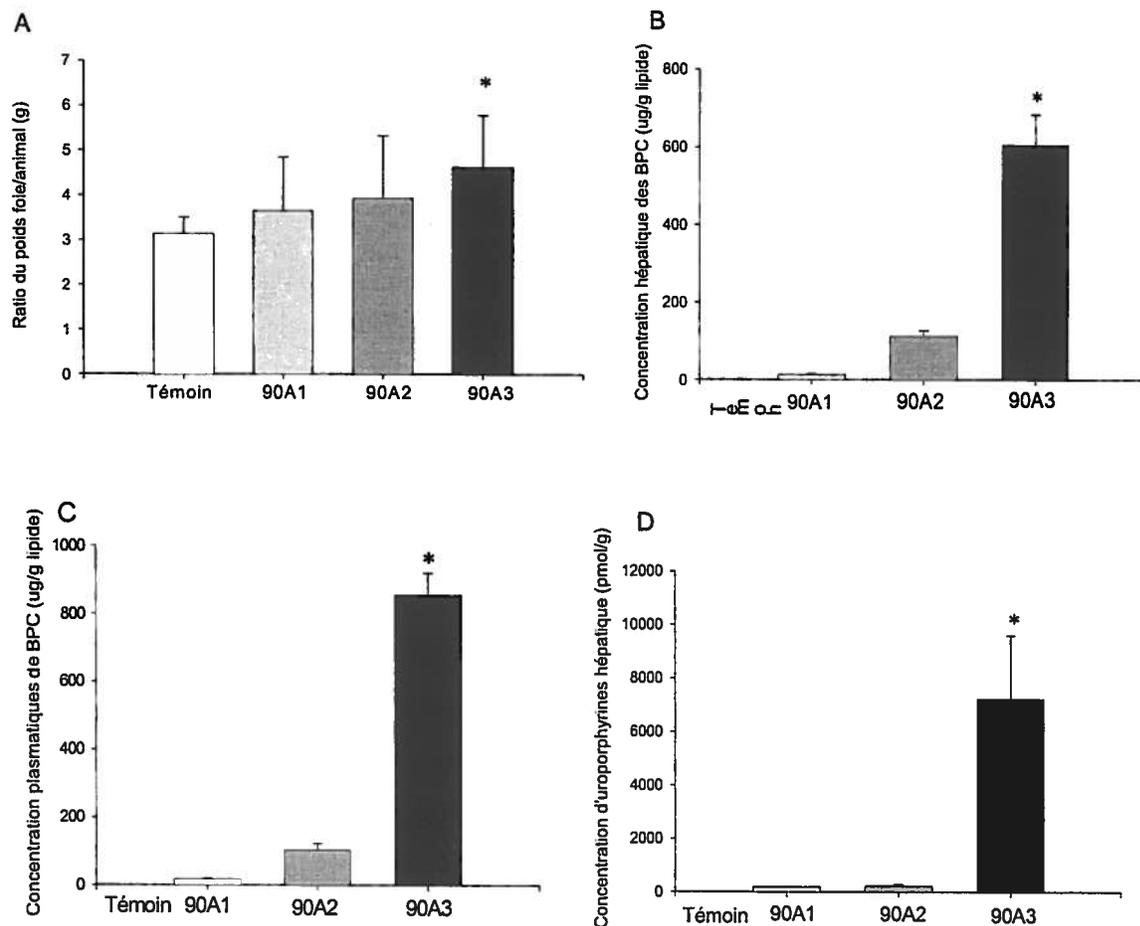


Figure 3. 1 Effets du mélange de BPC dans le foie de rat

Les groupes 90A1, 90A2 et 90A3 représentent respectivement des charges totales en BPC de 30, 300 et 3000 µg/kg. **A.** Poids du foie (g) de l'animal par rapport à son poids total après le traitement. **B.** Concentration de BPC hépatique (µg/g lipides) chez les différents groupes. **C.** Concentration de BPC plasmatique (µg/g lipides) chez les différents groupes. **D.** Concentration d'uroporphyrine hépatique (pmol/g).

* Statistiquement différent du groupe témoin, (Anova, significatif $\leq 0,05$)

mélange de BPC de 15,6 µg/g de lipide pour le groupe 90 A1 (30 µg/kg de BPC) à 102,8 µg/g de lipide pour le groupe 90 A2 (300 µg/kg de BPC) et 853,7 µg/g de lipide pour le groupe A3 (3000 µg/kg de BPC). Par conséquent, plus l'exposition aux BPC est

importante, plus il y a accumulation dans l'organisme. De plus, la **Figure 3.1D** illustre une très forte augmentation de la concentration d'uroporphyrine hépatique dans le foie des rats du groupe 90A traités avec le mélange 3 de BPC par rapport au foie des rats témoins. Cependant, dans le foie des rats des groupes A1 et A2, il y a une élévation nettement plus faible de cette concentration. La concentration d'uroporphyrine dans le foie du groupe A2 est environ 1,2 fois plus grande que celle du groupe A1 même si les foies sont traités avec un mélange de charge 10 fois plus élevée. Cependant, il y a une importante augmentation de la concentration du groupe 90 A3 de 37,5 fois par rapport aux rats du groupe 90 A1. Selon les résultats de la **Figure 3.1**, nous observons des effets plus marqués chez les animaux traités par le mélange ayant une charge de 3000 µg/kg de BPC selon le protocole A (90 A3) d'administration. Pour être en mesure de mieux cerner les effets des BPC dans le foie de rat, le groupe d'animaux choisi pour les expériences ultérieures est le groupe 90 A3.

3.1.2 Effet du mélange de BPC dans le foie au niveau de la Cx32

Les principaux effets des BPC chez les animaux se situent au niveau hépatique. Nous avons donc voulu déterminer les répercussions d'une exposition au mélange de BPC sur la communication intercellulaire notamment par l'étude des effets sur les Connexines dans le foie. Par la technique d'électrophorèse de type Northern, la quantité d'ARNm de la Cx32 a été évaluée. Comme illustrée à la **Figure 3.2A**, la quantité d'ARNm de Cx32 des échantillons provenant de tissus de rats exposés quotidiennement durant 90 jours au mélange ayant une charge de BPC de 3000 ug/kg (groupe 90 A3) est différente de celle des échantillons témoins (E). En effet, nous observons une diminution de l'ARNm de la Cx32 dans les différents échantillons A3. Cette diminution de l'ARNm est d'autant plus évidente lorsque la quantité d'ARNm de Cx32 des foies du groupe A3 est mesurée en fonction de la quantité d'ARN ribosomal 18S, utilisée pour la standardisation de la quantité totale d'ARN. Ainsi, à la **Figure 3.2B**, nous constatons une diminution de la quantité de l'ARNm de la Cx32 des cellules hépatiques de rats du groupe A3 de 0,7 fois par rapport au niveau d'ARNm des cellules du foie de rats témoins.

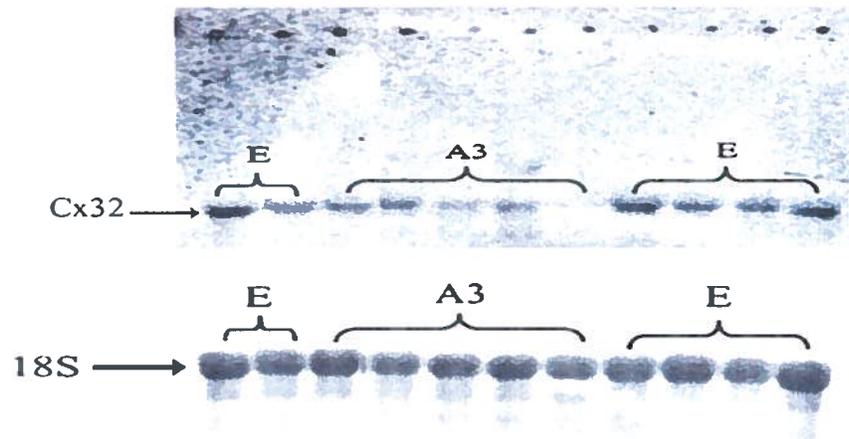
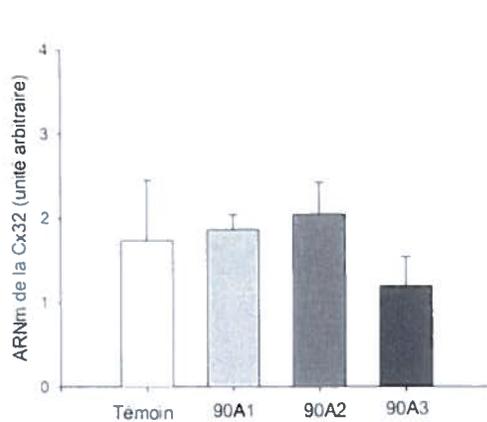
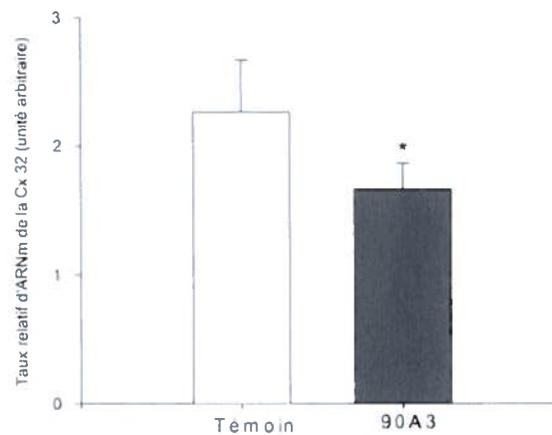
A**B****C**

Figure 3. 2 Effet d'un mélange de BPC sur la Cx32 dans le foie de rat

A. Northern blot de la Cx32. L'ARN total des tissus a été préparé tel que décrit dans la section matériel et méthode. Les échantillons témoins marqués **E** et les échantillons du groupe **A3** correspondent aux groupes traités selon le protocole d'administration A (durant 90 jours) pour une charge de BPC de 3000 µg/kg. **B.** Quantité d'ARNm de la Cx32 des échantillons 90A1, 90A2 et 90A3 mesurée par rapport à la quantité d'ARNr 18S. **C.** Mesure significative de la quantité d'ARNm de la Cx32 des échantillons 90 A3 par rapport à la quantité d'ARNm de la Cx32 des échantillons témoins. La valeur correspond à la moyenne (\pm SEM) du niveau hépatique de Cx32 pour 5 rats.

Les résultats de cette figure exposent aussi que la quantité d'ARNm de la Cx32 dans le foie des groupes 90 A1 et 90 A2 ne varie pas en comparaison de celui des foies des rats témoins. Enfin, à la **Figure 3.2C**, nous observons que la mesure du taux relatif d'ARNm de la Cx32 sur 5 foies de rats du groupe 90A3, soit pour des rats traités avec 3000 µg/kg du mélange de BPC selon le protocole A, démontre une diminution significative ($p=0,035$) de la quantité d'ARNm.

3.2 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MH1C1

Les effets des BPC sur la communication intercellulaire par la GJIC ont également été étudiés dans un système cellulaire exprimant la Cx32. Par la technique du «Scrape loading dye transfert» (SLDT), méthode qui permet d'observer la communication entre les cellules par la diffusion d'un colorant, le jaune de Lucifer, d'une cellule à une autre via les jonctions lacunaires, nous avons tenté de déterminer les effets du mélange de BPC sur des cellules MH1C1, cellules hépatocytaires qui expriment la Cx32. À une confluence de 90%, les cellules MH1C1 ont été exposées pendant 24h à un traitement de 100 µM de BPC, puis incubées avec une solution de jaune de Lucifer et de Rhodamine avant leur analyse par microscopie à fluorescence. D'après les images de la **Figure 3.3**, nous pouvons remarquer que le colorant «jaune de Lucifer» (vert en fluorescence) appliqué sur les cellules qui n'ont pas été traitées avec le mélange de BPC ne se propage pas entre les cellules communicantes. Il reste confiné à la première série de cellules endommagées. Ce modèle cellulaire ne semble pas se prêter adéquatement à cette méthode, c'est-à-dire qu'il ne permet pas d'observer de communication entre les cellules non-traitées par la diffusion du colorant. L'utilisation d'un autre modèle cellulaire a donc été nécessaire pour analyser les effets du mélange de BPC sur la GJIC.

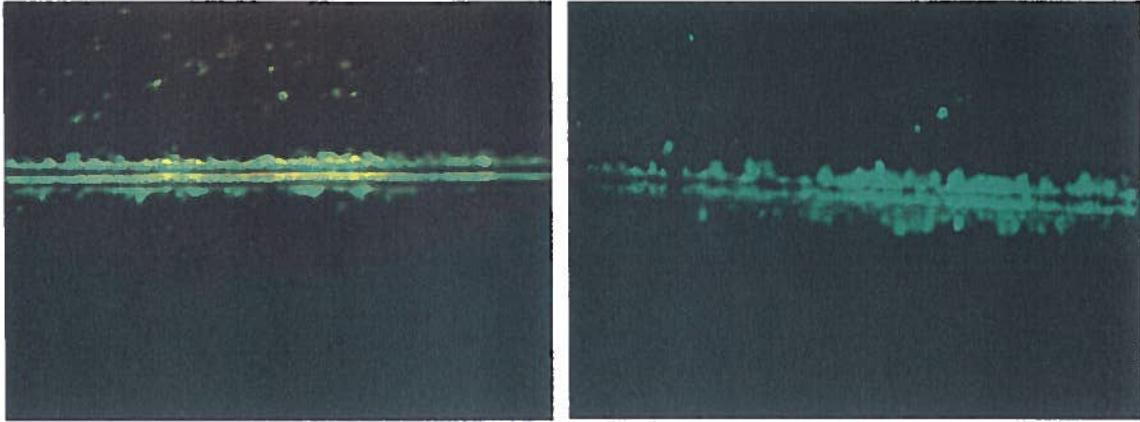


Figure 3.3 Communication intercellulaire des cellules MH1C1

SLDT des cellules témoins (véhicule : DMSO).

3.3 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MCF-7

Nous avons alors tenté de déterminer les effets des BPC sur la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires dans un système cellulaire humain exprimant la Cx43. Par la technique de SLDT, nous voulions étudier les effets du mélange de BPC sur des cellules mammaires cancéreuses MCF-7, qui expriment la Cx43. À une confluence de 90%, les cellules MCF-7 ont été exposées pendant 24h à un traitement de 100 μ M du mélange de BPC, puis incubées avec une solution de jaune de Lucifer et de Rhodamine avant leur analyse par microscopie à fluorescence. Cependant, nous avons constaté que dans une préparation témoin, il n'y a pas de transfert du colorant entre les cellules avoisinantes de la ligne de coupe (**Figure 3.4**). La communication par les jonctions lacunaires ne semble pas fonctionnelle dans ces cellules. Par conséquent, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire a donc été nécessaire pour analyser les effets du mélange de BPC sur la GJIC, soit l'utilisation d'une lignée de cellules mammaires saines, les MCF-10A.

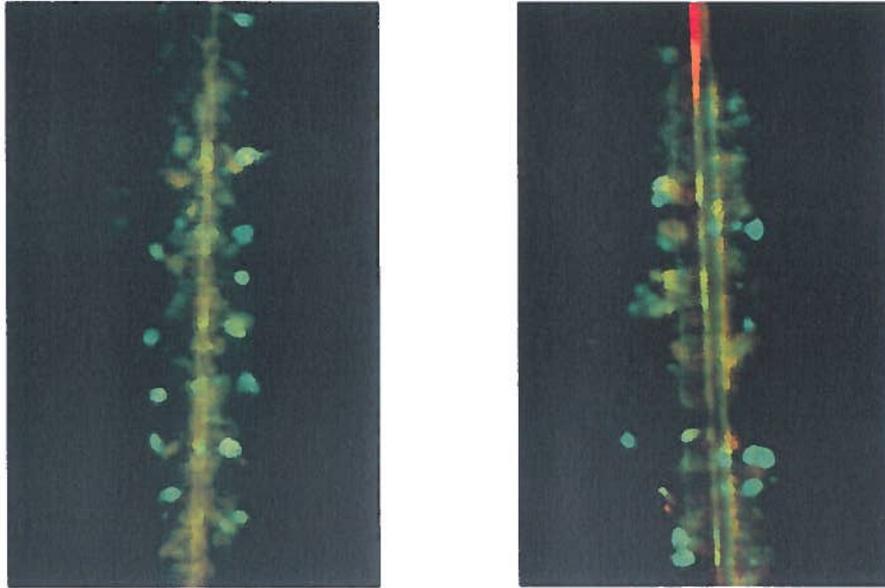


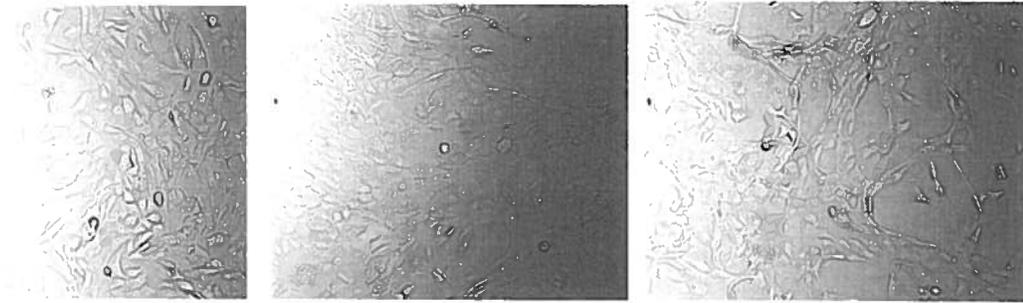
Figure 3.4 Communication intercellulaire des cellules MCF-7

Analyse du transfert du jaune de Lucifer par essai SLDT entre les cellules MCF-7

3.4 Étude de la communication intercellulaire chez les cellules MCF-10A

Les cellules MCF-10A, une lignée de cellules mammaires saines, expriment la Cx43 et adhèrent entre elles en culture. Toujours dans l'objectif d'étudier la perte de communication intercellulaire et d'adhérence dans le développement de cancers nous avons vérifié l'effet du mélange de congénères de BPC sur la communication des cellules mammaires MCF-10A. D'abord, nous avons analysé la morphologie des cellules en culture après avoir atteint 90% de confluence suite à des traitements de 24 heures avec des concentrations du mélange de BPC de 50 μM , 100 μM , 150 μM et 300 μM pour déterminer la cytotoxicité. La **Figure 3.5A** représente l'aspect des MCF-10A soumises aux différentes concentrations du mélange de BPC. Les concentrations de 150 μM et 300 μM de mélange de BPC affectent plus les cellules que l'utilisation des concentrations de 50 μM et 100 μM . En effet, les cellules perdent leur adhérence et ne croissent plus sous

A



Témoin

Mélange BPC 50 µM

Mélange BPC 100 µM

Mélange BPC 150 µM

Mélange BPC 300 µM

B

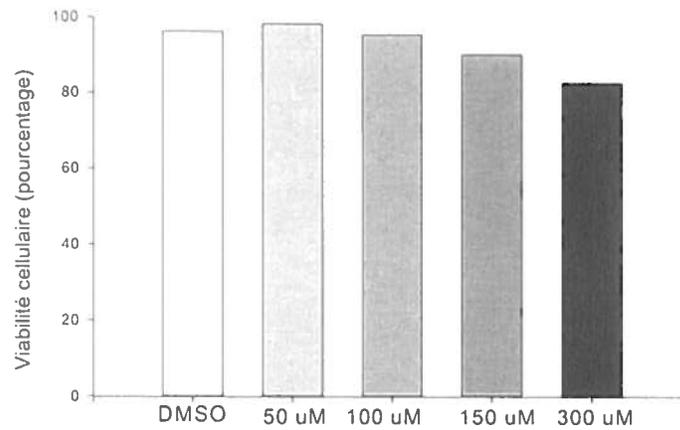


Figure 3. 5 Effets des BPC sur la cytotoxicité et la viabilité des cellules MCF-10A

Morphologie (A) et viabilité au bleu de trypan (B) des cellules MCF-10A après une exposition aux différentes concentrations du mélange de BPC et au véhicule (DMSO).

l'influence qualitative de ces plus fortes concentrations de BPC. Nous remarquons aussi que ces concentrations provoquent la formation de petites particules dans le milieu cellulaire. Ainsi, l'utilisation de différentes concentrations du mélange de BPC démontre que les effets toxiques sur les cellules MCF-10A apparaissent principalement à 150 μM . De plus, pour chacun des traitements effectués, nous avons fait un comptage cellulaire au bleu de trypan à l'aide d'un hémacymètre. Cette technique vise à étudier la viabilité des cellules en dénombrant les cellules adhérentes suite aux traitements avec les BPC. Les résultats de viabilité cellulaire des MCF-10A démontrent alors, selon la **Figure 3.5B**, que le mélange de BPC a peu d'effets sur leur viabilité. Les cellules conservent plus de 80% de leur viabilité quelque soit la dose de BPC utilisée. Cependant, nous observons que, dans ce type cellulaire, la viabilité des cellules tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration de BPC. Selon ces observations, les concentrations de 50 μM et 100 μM du mélange de congénères de BPC ont été ultérieurement utilisées pour le traitement des cellules.

Nous avons, par la suite, procédé à des expériences de SLDT chez les cellules MCF-10A pour nous permettre d'étudier les effets du mélange de BPC sur les échanges entre les cellules mammaires. Nous avons alors observé et mesuré la distance de migration du jaune de Lucifer dans des cellules MCF-10A témoins et des cellules traitées avec 100 μM du mélange de BPC. La **Figure 3.6A** montre la distance parcourue par le jaune de Lucifer à partir de la ligne de coupe des cellules témoins et des cellules traitées (n=3). Nous observons donc une communication entre les cellules MCF-10A parce que le jaune de Lucifer (en vert) se propage entre les cellules. D'ailleurs, les résultats indiquent, dans la **Figure 3.6B**, qu'il y a une diminution significative (p= 0,041) de la distance de migration du colorant dans les cellules traitées avec 100 μM du mélange de BPC par rapport à la distance mesurée dans les cellules témoins. Il y a donc une diminution de la communication intercellulaire des cellules MCF-10A provoquée par les BPC. En somme, la communication entre les cellules MCF-10A est influencée par le traitement avec le mélange des six congénères de BPC.

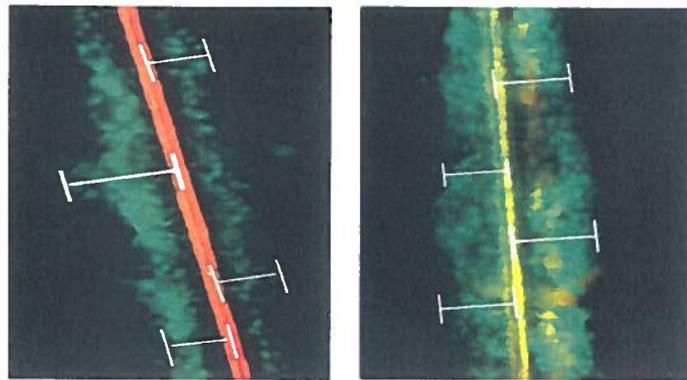
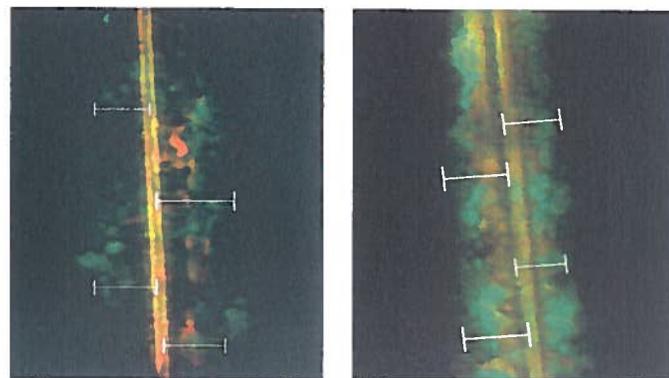
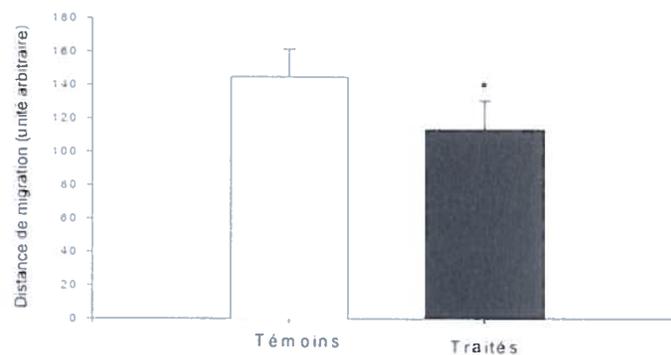
A**Cellules témoins****Cellules traitées avec 100 μ M du mélange de BPC****B**

Figure 3. 6 Effet du mélange de BPC sur la communication des cellules MCF-10A

A. SLDT des cellules MCF-10A témoins et des cellules traitées avec 100 μ M du mélange de BPC. **B.** Quantification de la distance parcourue par le jaune de Lucifer entre les cellules MCF-10A témoins et traitées avec 100 μ M de BPC. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SEM) de la distance de migration du jaune de Lucifer pour 4 pétris de cellules et représentent une moyenne de 10 mesures prises de chaque côté de la ligne de coupe.

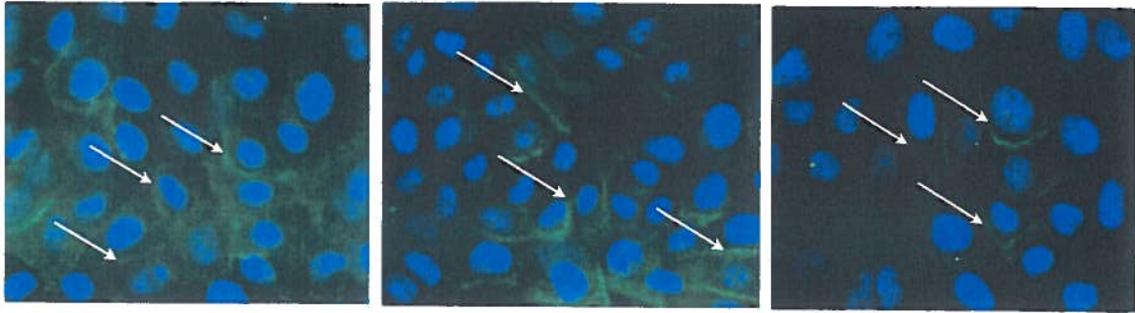
3.5 Étude des protéines de jonction chez les cellules MCF-10A

Ayant démontré que le mélange de BPC influence la communication intercellulaire des MCF-10A et dans le but de déterminer plus spécifiquement les processus par lesquels le mélange de BPC agit sur la communication intercellulaire, nous avons étudié l'effet des BPC, dans les cellules mammaires MCF-10A, sur trois protéines qui composent les jonctions cellulaires. La Cx43, qui permet les échanges cellulaires, la Claudine-1, impliquée dans la jonction et l'étanchéité cellulaire et la cadhérine-E (E-Cad), qui assure l'ancrage entre les cellules ont donc fait l'objet d'une étude d'immunohistochimie. Suite à des traitements de 50 μ M et 100 μ M du mélange de BPC sur les cellules, la localisation et l'expression des protéines sont comparées avec la localisation et l'expression des protéines de cellules témoins. Pour se faire, les protéines sont détectées par des anticorps spécifiques eux-mêmes couplés à la FITC (molécule fluorescente de couleur verte), puis observées par microscopie de fluorescence. Les noyaux des cellules ont été marqués par le DAPI (une molécule fluorescente de couleur bleue). Nous avons donc observé l'effet du mélange des six congénères de BPC sur les trois protéines de jonctions dans les cellules MCF-10A.

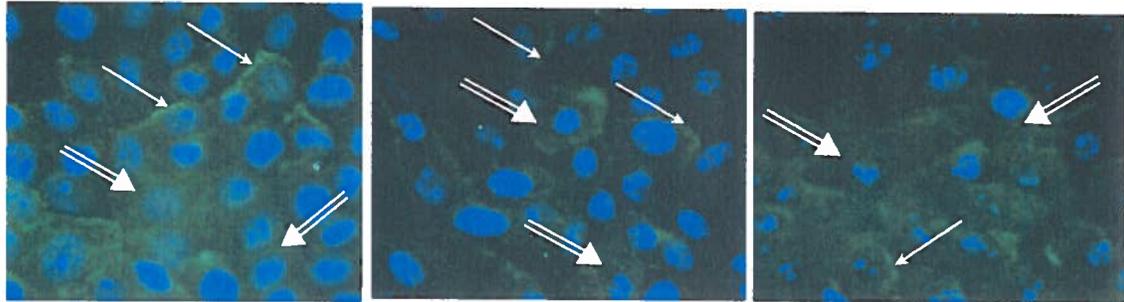
3.5.1 La connexine 43

Les études d'immunohistochimie de la Cx43 ont été réalisées dans des MCF-10A en utilisant des concentrations de 50 et 100 μ M du mélange 3 de BPC. Selon les images présentées à la **Figure 3.7**, l'immunofluorescence des cellules traitées avec 50 μ M et 100 μ M du mélange de BPC révèle un marquage membranaire des Cx43, illustré par les flèches simples, mais aussi la présence d'un marquage cytoplasmique, indiqué par les

Témoin



Mélange de BPC 50 μ M



Mélange 100 μ M BPC

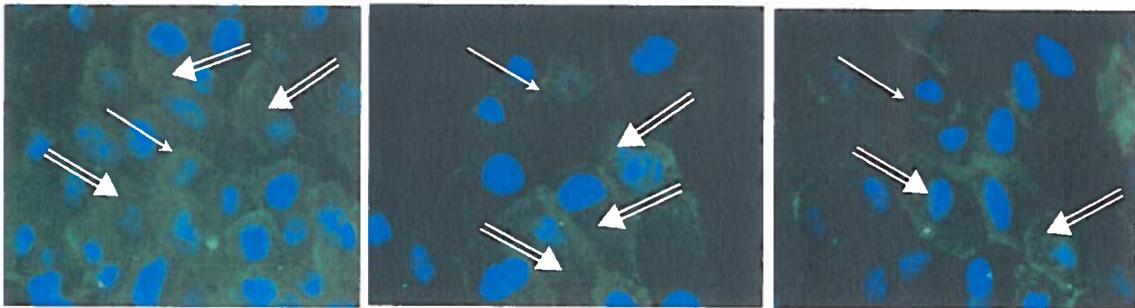


Figure 3. 7 Modification de la localisation de la Cx43 par les BPC chez les MCF-10A
 Immunohistochimie de la connexine 43 après l'exposition des cellules à 50 et 100 μ M du mélange de BPC. L'anticorps de la Cx43 est reconnu par l'anti-Cx43 couplé à la FITC (fluorescence verte) et les noyaux cellulaires sont colorés par le DAPI (fluorescence bleu).

flèches doubles. Chez les cellules témoins, nous observons que les Cx43 s'agglomèrent pour former les connexons, constituant des jonctions lacunaires (flèches simples). Dans les cellules traitées avec 50 μ M de BPC, nous constatons que les lignes de marquage

membranaire sont moins présentes que dans les cellules témoins. Pour une concentration de 100 μM , les images démontrent la présence de Cx43 à la membrane, mais aussi la diffusion de la protéine vers le cytoplasme. Ces résultats suggèrent donc que la localisation de la Cx43 est perturbée par les traitements aux BPC.

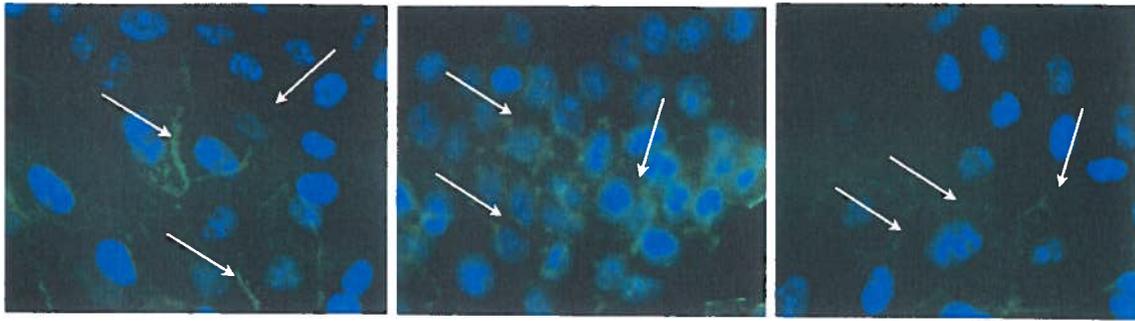
3.5.2 La claudine-1

Une analyse d'immunohistochimie a aussi été effectuée sur la protéine claudine-1 (**Figure 3.8**). Nous observons, dans les cellules MCF-10A traitées avec 50 μM de BPC, que les marquages membranaire (flèches simples) et cytoplasmique (flèches doubles) sont moins importants que dans les cellules témoins suggérant une diminution de l'expression de la claudine-1. Pour une concentration de 100 μM du mélange de BPC dans les cellules, la Claudine-1 ne semble presque plus localisée à la membrane, elle est principalement cytoplasmique. Ainsi, en comparant le marquage de la claudine-1 des cellules témoins qui est spécifiquement membranaire avec le marquage des cellules traitées aux BPC, nous constatons que celui-ci est diffus, se répartit différemment ou disparaît. Ces observations montrent que le mélange de BPC utilisé modifie la localisation de la protéine dans la cellule et suggère une diminution de son expression.

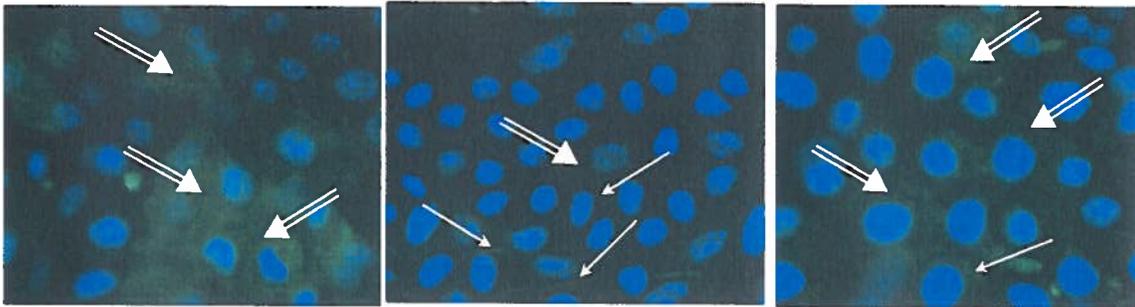
3.5.3 La E-cadhérine

La E-cadhérine (E-Cad) a aussi fait l'objet d'une étude d'immunohistochimie. Cependant, contrairement à la Cx43 et à la claudine-1, les résultats illustrés à la **Figure 3.9** montrent que les différentes concentrations du mélange utilisées dans le traitement des MCF-10A ne semblent pas avoir d'effets sur la localisation et l'expression de E-Cad. En effet, les échantillons témoins et traités présentent un marquage similaire bien défini, illustré par des lignes simples, au niveau de la membrane des cellules.

Témoin



Mélange 50 μ M BPC



Mélange 100 μ M BPC

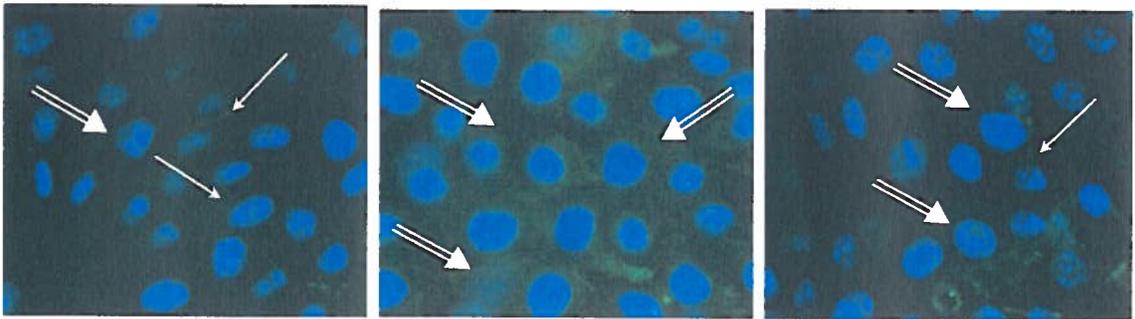
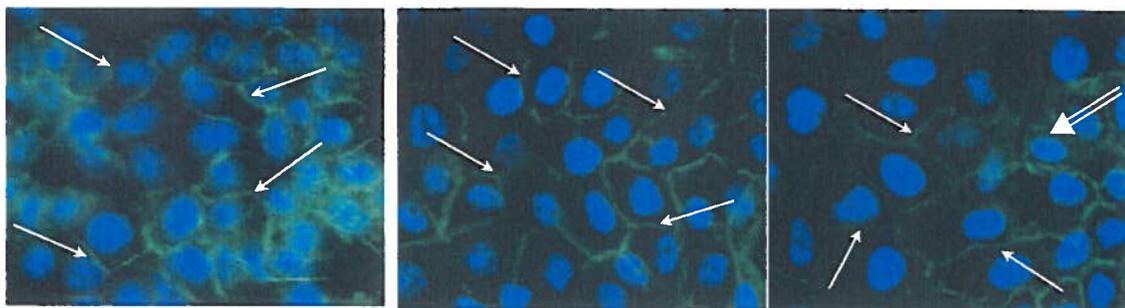


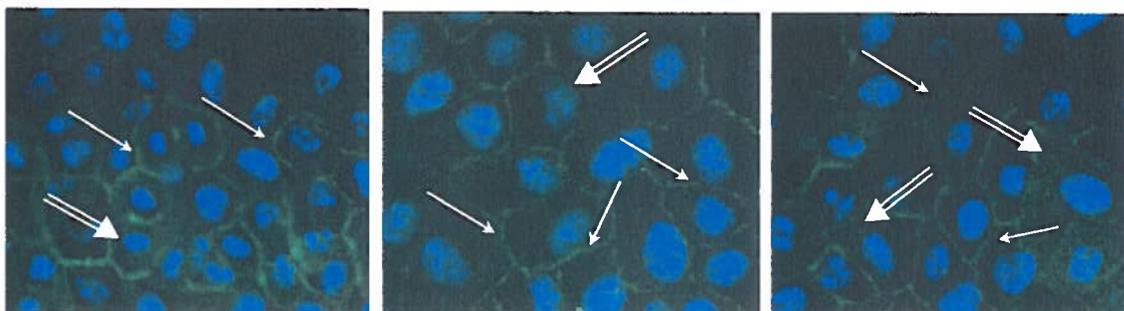
Figure 3. 8 Modification de la localisation et diminution de l'expression de la Claudine-1 par les BPC chez les MCF-10A

Immunofluorescence de la claudine-1 après l'exposition des cellules à 50 et 100 μ M du mélange de BPC. L'anticorps de la Claudine-1 est reconnu par l'anti-claudine-1 couplé à la FITC (fluorescence verte) et les noyaux cellulaires sont colorés par le DAPI (fluorescence bleu).

Témoin



Mélange 50 μ M BPC



Mélange 100 μ M BPC

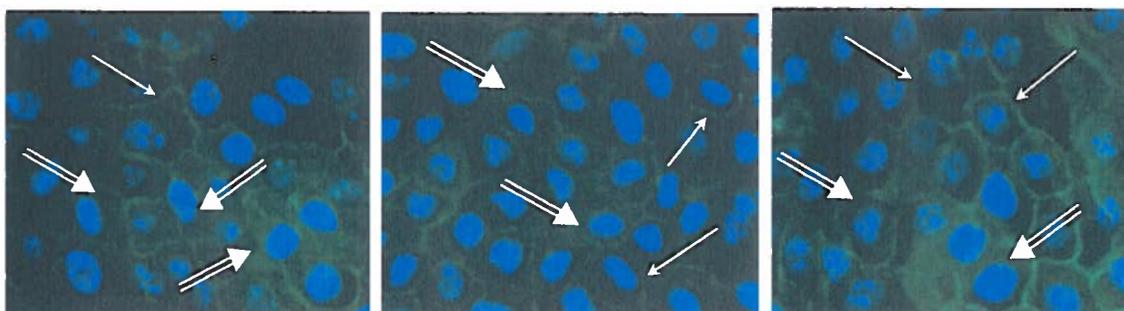


Figure 3. 9 Effet des BPC sur la E-cadhérine chez les MCF-10A

Immunofluorescence de E-Cad suite après l'exposition des cellules à 50 et 100 μ M du mélange de BPC ainsi que par le véhicule. L'anticorps de E-Cad est reconnu par l'anti-E-Cad couplé à la FITC (fluorescence verte) et les noyaux cellulaires sont colorés par le DAPI (fluorescence bleu)

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'évaluation des effets toxiques d'un mélange de BPC sur la communication cellulaire est le principal objectif de recherche de ce travail. D'après la perception que les consommateurs de poissons de pêche sportive du fleuve Saint-Laurent sont un groupe à risque de contamination par les BPC, il était donc important d'en évaluer le risque de toxicité et les effets sur la santé. Différentes doses et scénarios d'exposition à un mélange de BPC ont donc été élaborés et testés chez les rats femelles, plus sensibles aux BPC (Gouvernement du Canada., 1998.). Une première étude sous-chronique a démontré plusieurs effets physiologiques et biochimiques chez des rats femelles Spragues-Dawley traités par un mélange de six congénères de BPC retrouvés majoritairement chez les humains contaminés.

Chez les pêcheurs, l'exposition au MeHg est plus importante que dans la population générale et qu'ils sont également exposés aux PCDD/PCDF. Ces observations ouvrent d'ailleurs des perspectives de recherche intéressantes : par exemple, l'étude des effets MeHg ou des mélanges BPC/MeHG sur les communications intercellulaires. Les travaux présentés visaient donc la caractérisation et la définition du rôle de ces BPC dans la promotion de tumeur, en étudiant particulièrement leurs impacts sur les Cx du foie impliquées dans la communication intercellulaire. Ultimement, le présent travail apporte une contribution nouvelle ouvrant la voie à une évaluation du risque basé sur une approche avec seuil incorporant la communication intercellulaire comme mécanisme épigénétique.

4.1 Données préliminaires sur l'action biologique du mélange de BPC

Lors d'une contamination par un produit chimique, les premiers effets sur la santé affectent généralement l'aspect physique selon la sensibilité l'organisme contaminé. Il a donc été possible de remarquer d'importants changements chez les rats femelles traités

par notre mélange de BPC. La littérature sur les effets des BPC au niveau du foie et leur métabolisation par les cytochromes P-450 a orienté nos premières études de l'impact des BPC sur l'organisme vers le tissu hépatique (**Figure 3.1**). Ainsi, les premiers résultats observés par notre laboratoire ont révélé une hypertrophie du foie suite à l'exposition des animaux avec le mélange de BPC. De plus, des analyses biochimiques démontrent aussi des changements hépatiques suite à l'administration du mélange. En effet, une augmentation de la concentration de BPC plasmatique et hépatique et une élévation d'uroporphyrine hépatique ont été observées.

Certains effets biochimiques, effets observés à la plus forte dose administrée, c'est-à-dire que plus la grande charge totale en BPC augmente, sont plus importants et non observés à faible dose. Ainsi, plus l'exposition au mélange de BPC est forte, plus il y a accumulation de BPC dans l'organisme pouvant entraîner des effets biologiques importants. Nous avons donc décidé d'étudier le foie des animaux traités pour évaluer l'impact du mélange de BPC sur la communication intercellulaire, puisqu'une diminution de la communication entre les cellules est une cause fréquemment observée dans le développement de tumeurs (Trosko et Ruch., 1998.; Trosko et Chang., 2000.).

4.2 L'expression de la Cx32 dans le foie suite au traitement avec le mélange de BPC

La promotion et la formation de tumeurs sont des phénomènes reliés à la perte de communication entre les cellules via les jonctions lacunaires (Mesnil., 2002.) (Krutovskikh et Yamasaki., 1997.). De plus, il a été observé que l'expression de la Cx32 diminue dans les cellules néoplasiques de tumeur hépatique. De cette façon, nous nous sommes interrogés quant à l'effet de notre mélange de congénères de BPC sur des cellules hépatiques. Le premier objectif du projet de recherche visait alors à déterminer si le mélange de six congénères de BPC à l'étude induit une modification de l'expression de l'ARNm de la Cx32 dans le foie de rats femelles. En effet, les résultats obtenus ont démontré un changement de l'expression de la Cx32 (**Figure 3.2**). Ainsi, tout comme l'a démontré Mally et son équipe, suite à un traitement sur les rats avec le TCDD, nous

avons constaté une baisse significative de l'expression de la Cx32 dans le foie des rats traités avec le mélange de BPC (Mally et Chipman., 2002.). Cette diminution de l'expression survient lors du traitement avec une dose totale de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du mélange de BPC, soit 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de chacun des six congénères. Ce résultat suggère que le mélange de BPC utilisé peut agir comme promoteur de tumeurs puisqu'il a déjà été démontré que l'HCB, composé ayant une structure semblable au BPC, est lui-même un promoteur de tumeurs et provoque la réduction de l'expression de la Cx32 hépatique (Plante et al., 2002.). Les résultats n'ont cependant pas permis d'observer une diminution de la Cx32 pour les traitements avec 30 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du mélange de BPC. Comme la plupart des études réalisées avec la connexine 32 n'ont démontré que peu de changements quant au niveau d'ARNm, mais plutôt des changements post-traductionnels tel une localisation aberrante de la Cx32, il pourrait aussi s'agir, dans ce cas, du même phénomène (Krutovskikh et al., 1995.; Bager et al., 1994.; Warngard et al., 1996.; Mesnil., 2002.).

4.3 La communication intercellulaire par la GJIC

Nous avons également voulu caractériser la communication intercellulaire globale par l'étude de la GJIC. Nous avons étudié *in vitro* les effets du mélange de BPC sur la communication intercellulaire de cellules de foie de rat en culture. Par la technique du «Scrape loading dye transfer» (SLDT), nous voulions évaluer les effets du mélange de BPC sur la communication entre les cellules MH1C1 pour une concentration de 100 μM (Figure 3.3). Une étude préliminaire avait démontré que pour des cellules épithéliales de foie, les métabolites de certains BPC pouvaient inhiber la communication intercellulaire en peu de temps (1heure) (Naiki et al., 2002.). Cette souche d'hépatocytes (MH1C1), qui exprime la Cx32, n'avait fait l'objet d'aucune étude de communication cellulaire par SLDT. Pour des cellules n'ayant subi aucun traitement, les résultats n'ont cependant pas montré de communication intercellulaire. Le marqueur est resté confiné à la première série de cellules endommagées et n'a pas diffusé entre les cellules. Pourtant, il avait antérieurement été démontré qu'une perte de communication survenait chez une lignée

d'hépatocytes cancéreux (Ma et al., 2003.). Nous n'avons donc pas été en mesure de savoir si la GJIC des cellules hépatiques est affectée par notre mélange de BPC. Par conséquent, nous avons décidé d'étudier un autre type de cellules où les BPC peuvent s'accumuler suite à une contamination pour analyser les effets de notre mélange de BPC sur la GJIC.

Nous avons alors choisi de faire l'étude de l'impact du mélange de BPC sur la GJIC à l'aide de deux lignées de cellules épithéliales mammaires, soit les MCF-7 et les MCF-10A. L'utilisation de ces cellules comme système de remplacement est pertinente, car les cellules épithéliales des divers organes du corps (foie vs sein) possèdent des propriétés semblables au niveau des interactions intercellulaires et de plus, une des voies d'excrétion des BPC se fait par le lait maternel au niveau des cellules mammaires, ce qui montre un lien d'exposition cellulaire (Kostyniak et al., 1999.).

Nous avons d'abord tenté d'étudier la communication entre les cellules MCF-7, cellules qui proviennent d'une lignée de cellules cancéreuses humaines et qui expriment la Cx43. Nos résultats ont démontré une communication déficiente dans ces cellules (**Figure 3.4**). La communication par les jonctions lacunaire semble donc non fonctionnelle dans les cellules témoins. Cette incapacité à communiquer peut être reliée à leur caractéristique cancéreuse et pourrait expliquer le faible nombre d'études ayant mis en relation la perte de communication intercellulaire et les BPC. La plupart des études ont surtout démontré les effets des BPC sur le métabolisme de l'estrogène dans ces cellules (Gozgit et al., 2004.; Arcaro et al., 1999.). Les activités immunosuppresser et estrogéniques des BPC peuvent être une des cause de la perte de communication menant à la promotion de tumeurs au niveau des glandes mammaires (Connor et al., 1997.).

Une lignée de cellules mammaires humaines saines, les MCF-10A, a donc finalement été utilisée. Tout comme les MCF-7, ces cellules expriment la Connexine 43. Les premières expériences ont permis de déterminer que pour une concentration de 100 μM et moins du mélange de BPC, la morphologie des cellules et la viabilité cellulaire ne sont pas affectées et qu'il n'y a pas d'effets cytotoxiques (**Figure 3.5**). Comme nous

avons besoin d'un tapis de cellules ayant une bonne confluence pour la technique du SLDT, nous avons réalisé l'étude de la communication avec une concentration de 100 μM du mélange de BPC (**Figure 3.6**). Le SLDT sur les cellules MCF-10A a démontré premièrement qu'il y avait la présence de communication entre les cellules témoins. Lors du traitement par le mélange de BPC, les résultats ont par la suite démontré des changements importants dans la communication intercellulaire. En effet, une baisse significative ($p= 0,041$) de la communication entre les MCF-10A a été constatée. Certaines études ont démontré une baisse semblable de la communication pour un BPC spécifique dans des souches cellulaires différentes tel que l'équipe de Machala (2003) qui on d'ailleurs observé une perte de communication chez les cellules WB-F344 traitées par le BPC 153, lequel se retrouve dans notre mélange (Machala et al., 2003.). Ces résultats obtenus suite aux expériences de SLDT dans les cellules mammaires MCF-10A suggèrent que le mélange de BPC (100 μM) entraîne une diminution de la communication intercellulaire et que les niveaux de Cx43 ou d'autres protéines de jonction pourraient en être impliqués. Par conséquent, dans le but d'expliquer plus précisément l'impact des BPC dans la modulation de la communication entre les cellules mammaires MCF-10A, nous avons réalisé une étude d'immunofluorescence sur trois protéines de jonctions cellulaires qui possèdent des fonctions différentes dans la communication intercellulaire.

4.4 L'immunohistochimie des MCF-10A traitées au mélange BPC

Nous avons donc caractérisé par immunohistochimie la Cx43, la Claudine-1 et la E-Cad suite à un traitement des cellules avec 50 μM et 100 μM du mélange de six congénères de BPC afin d'en préciser les effets directs sur la communication intercellulaire. Cette étude a d'abord permis d'observer un marquage à la membrane de la Cx43 dans les cellules traitées, mais moins prononcé que le marquage de la Cx43 des cellules témoins (**Figure 3.7**). Deuxièmement, la présence d'un marquage cytoplasmique de la Cx43 dans les cellules traitées absent des cellules témoins a aussi été constatée. Ainsi, il semble donc que l'utilisation du mélange de BPC dans les MCF-10A provoque

un changement dans la localisation intracellulaire de la Cx43. Certaines études ont démontré que les promoteurs des gènes des Cx sont modulés par les BPC (Locke., 1998.). Il a été démontré que la Cx43 pouvait être significativement inhibée par les BPC selon la dose et le temps du traitement diminuant ainsi la GJIC (van Duursen et al., 2003.; Kang et al., 1996.). Ces résultats suggèrent donc, par des mécanismes encore inconnus, que les BPC administrés aux cellules entraînent des changements post-traductionnels sur la protéine qui compromettent sa localisation à la membrane. Par conséquent, nous pourrions envisager que la diminution de la communication intercellulaire globale observée précédemment (**Figure 3.6**) soit causée par une perte de GJIC que forment les Cx43 à la membrane. Nomata et son équipe ont démontré la perte de Cx43 à la membrane cellulaire lors d'un traitement d'une heure à l'heptachlore (10µg/ml) chez des cellules épithéliales mammaires (Nomata et al., 1996.).

Dans le même ordre d'idées, nous avons observé que la Claudine-1 subit des modifications dans sa localisation, mais également dans son niveau protéique suite à l'exposition des cellules MCF-10A avec le mélange de BPC (**Figure 3.8**). En effet, nous avons d'abord remarqué, pour une concentration de 50 µM du mélange, une diminution du marquage membranaire par rapport au marquage des cellules témoins et l'apparition d'un faible marquage cytoplasmique. La diminution du marquage de la Claudine-1 à la membrane ne semble cependant pas se faire uniquement au profit de l'apparition du marquage cytoplasmique. Il est aussi plus diffus et tend à disparaître. Une étude de la claudine-1 chez des tissus mammaires cancéreux a démontré une diminution de l'expression du taux d'ARNm de 12 fois pour claudine-1, donc d'une diminution de la présence de la protéine à la membrane (Tokes et al., 2005.). Par conséquent, nous pourrions penser que les niveaux protéiques de la Claudine-1 sont également directement affectés par la présence des BPC dans la cellule. D'ailleurs, cette observation se confirme par l'étude immunohistochimique de la protéine pour le mélange de BPC (100 µM). D'après les images obtenues, nous constatons d'abord que le marquage cytoplasmique de la Claudine-1 chez les cellules traitées avec 100 µM du mélange de BPC est beaucoup plus important que chez les cellules témoins et que chez les cellules traitées avec 50 µM de BPC, mais également que les niveaux protéiques sont grandement

diminués. Les BPC utilisés ont donc un effet sur la localisation et l'expression de la claudine-1. Les BPC causent donc une diminution de la formation des jonctions serrées qui joue un rôle sur l'invasion des cellules cancéreuses et la formation des métastases (Tokes et al., 2005.). Nous ne pouvons cependant pas déterminer si la perte de jonctions serrées est prépondérante à la perte globale de communication intercellulaire étant donné que la formation des GJIC semble aussi affectée. Nous pouvons penser que la diminution de la formation des GJIC et des jonctions serrées agissent de concert dans la diminution de la communication entre les cellules suite à une exposition aux BPC. Par contre, selon l'analyse immunohistochimique de la E-cadhérine, il semble que nous soyons en mesure de discréditer l'implication des jonctions d'adhérence dans la perte de communication intercellulaire causée par le mélange des six congénères de BPC (**Figure 3.9**). Certaines études ont démontré que le niveau d'expression protéique d'E-cad diminuait chez les tissus cancéreux (Mylchreest et Charbonneau., 1997.; Parham et al., 1997.). Le marquage de la E-Cad dans les cellules MCF-10A est membranaire et bien défini et constant que celles-ci soient traitées ou non avec le mélange de BPC, ce qui nous indique que le mélange affecte peu l'expression de cette protéine membranaire.

Bien que nous ne sachions pas encore les mécanismes de régulation des BPC sur la localisation et l'expression des protéines, nos résultats suggèrent qu'une exposition au mélange de BPC utilisé dans nos expériences a un impact important sur la communication intercellulaire. Même si nos résultats démontrent une diminution de la Cx32 suite à une exposition de tissus hépatiques par le mélange de BPC, il semble que celui-ci joue un rôle majeur dans la modulation de la communication entre les cellules par des mécanismes post-transcriptionnels et post-translationnels sur certaines protéines. Des expériences additionnelles pourraient aider à mieux comprendre ces mécanismes. Des études de l'état de phosphorylation ou des mécanismes de recyclage de ces protéines de jonction pourraient, d'ailleurs, permettre de mieux cerner les changements moléculaires induits par les BPC sur la machinerie des jonctions intercellulaires. Finalement, une analyse plus détaillée du rôle individuel de chacun des congénères de BPC du mélange consisterait en un atout majeur dans l'élucidation du processus de perturbation de la communication intercellulaire par les BPC.

CONCLUSION

Les résultats obtenus suite à l'étude de la caractérisation de la Cx32 dans le foie de rat démontrent que le mélange de congénères de BPC provoque une baisse de l'expression de son ARNm. La communication intercellulaire est aussi affectée par le mélange de BPC tel qu'en témoigne le changement dans la localisation de la Cx43 et de la Claudine-1 et la diminution de l'expression de la Claudine-1 dans les cellules MCF-10A. La formation des GJIC et des jonctions serrées est en effet perturbée par ces modifications. Cependant, l'adhésion intercellulaire ne s'est pas révélée être modulée par le mélange de BPC suite à l'étude de la localisation et des niveaux protéiques de la E-cadhérine. L'ensemble des résultats suggère que le mélange de BPC est capable d'induire des changements qui perturbent la communication intercellulaire, un événement important témoignant d'un mécanisme épigénétique de cancérogenèse.

CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMOWICZ, D. A. 1995. "Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment". Environmental Health Perspectives, vol. 103 Suppl 5, p. 97-9.
- ADLERCREUTZ, H. 2002. "Phyto-oestrogens and cancer". Lancet Oncol, vol. 3, p. 364-73.
- ALEO, M. F., F. Morandini, F. Bettoni, S. Tanganelli, A. Vezzola, R. Giuliani, N. Steimberg, P. Apostoli et G. Mazzoleni. 2002. "Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line". Toxicol In Vitro, vol. 16, p. 457-65.
- ARCARO, K. F., P. W. O'Keefe, Y. Yang, W. Clayton et J. F. Gierthy. 1999. "Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells". Toxicology, vol. 133, p. 115-27.
- BAGER, Y., Y. Kato, K. Kenne et L. Warngard. 1997. "The ability to alter the gap junction protein expression outside GST-P positive foci in liver of rats was associated to the tumour promotion potency of different polychlorinated biphenyls". Chemico-Biological Interactions, vol. 103, p. 199-212.
- BAGER, Y., K. Kenne, V. Krutovskikh, M. Mesnil, O. Traub et L. Warngard. 1994. "Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl". Carcinogenesis, vol. 15, p. 2439-43.
- BARTOSIEWICZ, M., M. Trounstein, D. Barker, R. Johnston et A. Buckpitt. 2000. "Development of a toxicological gene array and quantitative assessment of this technology". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 376, p. 66-73.
- BEDNAR, M. 2000. "DNA microarray technology and application". Med Sci Monit, vol. 6, p. 796-800.
- BESSELINK, H. T., M. S. Denison, M. E. Hahn, S. I. Karchner, A. D. Vethaak, J. H. Koeman et A. Brouwer. 1998. "Low inducibility of CYP1A activity by polychlorinated biphenyls (PCBs) in flounder (*Platichthys flesus*): characterization of the Ah receptor and the role of CYP1A inhibition". Toxicological Sciences, vol. 43, p. 161-71.
- BLAHA, L., P. Kapplova, J. Vondracek, B. Upham et M. Machala. 2002. "Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons". Toxicological Sciences, vol. 65, p. 43-51.

BLAHA, L., M. Machala, J.Vondracek et K. Breinekova. 2001. "Multiple oxidative stress parameters are modulated in vitro by oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons identified in river sediments". Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 500, p.225-8.

BOUTHILLIER, L., M. Charbonneau et J. Brodeur. 1996. "Assessment of the role of glutathione conjugation in the protection afforded by anethol dithiolthione against hexachloro-1,3-butadiene- induced nephrotoxicity". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 139, p. 177-85.

BRUZZONE, R. 2001. "Learning the language of cell-cell communication through connexin channels". Genome Biol, vol. 2, p. REPORTS4027.

BRUZZONE, R., T. W. White et D. L. Paul. 1996. "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling". European Journal of Biochemistry, vol. 238, p. 1-27.

CASARETT AND DOULL'S. 2001. "Toxicology:The basic science of poisons". Sixth Edition, p.1236

CAVALIERI, E. L., D. E. Stack, P. D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. L. Johansson, K. D. Patil, M. L. Gross, J. K. Gooden, R. Ramanathan, R. L. Cerny et E. G. Rogan. 1997. "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 10937-42.

CHARBONNEAU, M., G. L. Plaa et K. Krishnan. 1997. "Patterns of liver injury induced by mixtures of halogenated hydrocarbons: a predictable event?". Drug Metabolism Reviews, vol. 29, p. 137-51.

CHEN, C. Y., J. T. Hamm, J. R. Hass, P. W. Albro et L. S. Birnbaum. 2002. "A mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and non-ortho polychlorinated biphenyls (PCBs) changed the lipid content of pregnant Long Evans rats". Chemosphere, vol. 46, p. 1501-4.

CHU, I., D. C. Villeneuve, A. Yagminas, P. Lecavalier, H. Hakansson, U. G. Ahlborg, V. E. Valli, S. W. Kennedy, A. Bergman, R. F. Seegal et a. l. et. 1995. "Toxicity of PCB 77 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) and PCB 118 (2,3',4,4'5-pentachlorobiphenyl) in the rat following subchronic dietary exposure". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 26, p. 282-92.

COLEMAN, W. B. 2003. "Mechanisms of human hepatocarcinogenesis". Curr Mol Med, vol. 3, p. 573-88.

CONNOR, K., K. Ramamoorthy, M. Moore, M. Mustain, I. Chen, S. Safe, T. Zacharewski, B. Gillesby, A. Joyeux et P. Balaguer. 1997. "Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 145, p. 111-23.

COYLE, Y. M. 2004. "The effect of environment on breast cancer risk". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 84, p. 273-88.

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

CYR DG, D. 2001. "Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis". Journal of Andrology, vol. 124-35.

DAVID J. LOCKHART, E. A. W. 2000. "Genomic, gene expression and DNA arrays". Nature, vol. 405, p. 827-836.

DE FELIP, E., M. G. Porpora, A. di Domenico, A. M. Ingelido, M. Cardelli, E. V. Cosmi et J. Donnez. 2004. "Dioxin-like compounds and endometriosis: a study on Italian and Belgian women of reproductive age". Toxicology Letters, vol. 150, p. 203-9.

DEAN, C. E. Jr, S. A. Benjamin, L. S. Chubb, J. D. Tessari et T. J. Keefe. 2002. "Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers". Toxicological Sciences, vol. 66, p. 54-61.

DEML, E. et D. Oesterle. 1987. "Dose-response of promotion by polychlorinated biphenyls and chloroform in rat liver foci bioassay". Archives of Toxicology, vol. 60, p. 209-11.

DENISON, M. S. et J. P. Whitlock Jr. 1995. "Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 18175-8.

DRAGAN, Y., J. Klaunig, R. Maronpot et T. Goldsworthy. 1998. "Mechanisms of susceptibility to mouse liver carcinogenesis". Toxicological Sciences, vol. 41, p. 3-7.

DRAGAN, Y. P. et H. C. Pitot. 1992. "The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat". Carcinogenesis, vol. 13, p. 739-50.

DRAGNEV, K. H., R. W. Nims, S. D. Fox, R. Lindahl et R. A. Lubet. 1995. "Relative potencies of induction of hepatic drug-metabolizing enzyme genes by individual PCB congeners". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 132, p. 334-42.

DUGGAN, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer et J. M. Trent. 1999. "Expression profiling using cDNA microarrays". Nature Genetics, vol. 21, p. 10-4.

EL-FOULY, M. H., J. E. Trosko et C. C. Chang. 1987. "Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication". Experimental Cell Research, vol. 168, p. 422-30.

- ESPANDIARI, P., H. P. Glauert, H. J. Lehmler, E. Y. Lee, C. Srinivasan et L. W. Robertson. 2003. "Polychlorinated biphenyls as initiators in liver carcinogenesis: resistant hepatocyte model". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 186, p. 55-62.
- EVANS, W. H. et P. E. Martin. 2002. "Gap junctions: structure and function (Review)". Molecular Membrane Biology, vol. 19, p. 121-36.
- FADHEL, Z., Z. Lu, L. W. Robertson et H. P. Glauert. 2002. "Effect of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the induction of hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 associated enzyme activities in rats". Toxicology, vol. 175, p. 15-25.
- FALK, M. M. 2000. "Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels". European Journal of Cell Biology, vol. 79, p. 564-74.
- FANG, M. Z., W. C. Mar et M. H. Cho. 2001. "Cadmium-induced alterations of connexin expression in the promotion stage of in vitro two-stage transformation". Toxicology, vol. 161, p. 117-27.
- FANNING, A. S., L. L. Mitic et J. M. Anderson. 1999. "Transmembrane proteins in the tight junction barrier". Journal of the American Society of Nephrology, vol. 10, p. 1337-45.
- FISCHER, L. J., R. F. Seegal, P. E. Ganey, I. N. Pessah et P. R. Kodavanti. 1998. "Symposium overview: toxicity of non-coplanar PCBs". Toxicological Sciences, vol. 41, p. 49-61.
- FISCHER, L. J., M. A. Wagner et B. V. Madhukar. 1999. "Potential involvement of calcium, CaM kinase II, and MAP kinases in PCB-stimulated insulin release from RINm5F cells". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 159, p. 194-203.
- FRANKLIN, M. R., J. D. Phillips et J. P. Kushner. 1997. "Cytochrome P450 induction, uroporphyrinogen decarboxylase depression, porphyrin accumulation and excretion, and gender influence in a 3-week rat model of porphyria cutanea tarda". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 147, p. 289-99.
- FRANKLIN, M. R., J. D. Phillips et J. P. Kushner. 2002. "Uroporphyrin in the uroporphyrinogen decarboxylase-deficient mouse: Interplay with siderosis and polychlorinated biphenyl exposure". Hepatology, vol. 36, p. 805-11.
- FUJIMOTO, K., A. Nagafuchi, S. Tsukita, A. Kuraoka, A. Ohokuma et Y. Shibata. 1997. "Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation". Journal of Cell Science, vol. 110 (Pt 3), p. 311-22.
- FUKUMOTO, M., T. Kujiraoka, M. Hara, T. Shibasaki, T. Hosoya et M. Yoshida. 2001. "Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells". Life Sciences, vol. 69, p. 247-54.

- GALLANT, T. L., A. Singh et I. Chu. 2000. "PCB 118 induces ultrastructural alterations in the rat liver". Toxicology, vol. 145, p. 127-34.
- GERHOLD, D., M. Lu, J. Xu, C. Austin, C. T. Caskey et T. Rushmore. 2001. "Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays". Physiol Genomics, vol. 5, p. 161-70.
- GIBSON, G. 2002. "Microarrays in ecology and evolution: a preview". Molecular Ecology, vol. 11, p. 17-24.
- GOODENOUGH, D. A., J. A. Goliger et D. L. Paul. 1996. "Connexins, connexons, and intercellular communication". Annual Review of Biochemistry, vol. 65, p. 475-502.
- GOULD, J. C., K. R. Cooper et C. G. Scanes. 1999. "Effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormones and liver type I monodeiodinase in the chick embryo". Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 43, p. 195-203.
- GOUVERNEMENT DU CANADA, G. d. Q. 1998. "Le Saint-Laurent et la santé : l'état de la question". Rapport Saint-Laurent Vision 2000, vol. 48p.
- GOZGIT, J. M., K. M. Nestor, M. J. Fasco, B. T. Pentecost et K. F. Arcaro. 2004. "Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 196, p. 58-67.
- GREGORY, M., J. Dufresne, L. Hermo et D. Cyr. 2001. "Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis". Endocrinology, vol. 142, p. 854-63.
- GUAN, X., W. J. Bonney et R. J. Ruch. 1995. "Changes in gap junction permeability, gap junction number, and connexin43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 130, p. 79-86.
- GUAN, X. et R. J. Ruch. 1996. "Gap junction endocytosis and lysosomal degradation of connexin43-P2 in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with DDT and lindane". Carcinogenesis, vol. 17, p. 1791-8.
- GUMBINER, B. 1988. "Cadherins: a family of Ca²⁺-dependent adhesion molecules". Trends in Biochemical Sciences, vol. 13, p. 75-6.
- GUMBINER, B. M. 2000. "Regulation of cadherin adhesive activity". Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 399-404.
- GUMBINER, B. M. et P. D. McCrea. 1993. "Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins". Journal of Cell Science. Supplement, vol. 17, p. 155-8.

HAAG-GRONLUND, M., N. Johansson, R. Fransson-Steen, H. Hakansson, G. Scheu et L. Warngard. 1998. "Interactive effects of three structurally different polychlorinated biphenyls in a rat liver tumor promotion bioassay". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 152, p. 153-65.

HAAG-GRONLUND, M., Y. Kato, R. Fransson-Steen, G. Scheu et L. Warngard. 1997. "Promotion of enzyme altered foci in female rat 2,3,3',4,4',5- hexachlorobiphenyl". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 147, p. 46-55.

HAHN, M. E. et K. Chandran. 1996. "Uroporphyrin accumulation associated with cytochrome P4501A induction in fish hepatoma cells exposed to aryl hydrocarbon receptor agonists, including 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and planar chlorobiphenyls". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 329, p. 163-74.

HARKNESS, M. R., J. B. McDermott, D. A. Abramowicz, J. J. Salvo, W. P. Flanagan, M. L. Stephens, F. J. Mondello, R. J. May, J. H. Lobos, K. M. Carroll et a. l. et. 1993. "In situ stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments". Science, vol. 259, p. 503-7.

HEMMING, H., L. Warngard et U. G. Ahlborg. 1991. "Inhibition of dye transfer in rat liver WB cell culture by polychlorinated biphenyls". Pharmacology and Toxicology, vol. 69, p. 416-20.

HERTZBERG, E. L. et N. B. Gilula. 1979. "Isolation and characterization of gap junctions from rat liver". Journal of Biological Chemistry, vol. 254, p. 2138-47.

HESTERMANN, E. V., J. J. Stegeman et M. E. Hahn. 2000. "Relative contributions of affinity and intrinsic efficacy to aryl hydrocarbon receptor ligand potency". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 168, p. 160-72.

HOLDER, J. W., E. Elmore et J. C. Barrett. 1993. "Gap junction function and cancer". Cancer Research, vol. 53, p. 3475-85.

HUFF, J., G. Lucier et A. Tritscher. 1994. "Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence". Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 34, p. 343-72.

ITO, S., M. Tsuda, A. Yoshitake, T. Yanai et T. Masegi. 1998. "Effect of phenobarbital on hepatic gap junctional intercellular communication in rats". Toxicologic Pathology, vol. 26, p. 253-9.

JEON, S. H., M. H. Cho et J. H. Cho. 2001. "Effects of cadmium on gap junctional intercellular communication in WB-F344 rat liver epithelial cells". Human and Experimental Toxicology, vol. 20, p. 577-83.

JEONG, S. H., S. S. Habeebu et C. D. Klaassen. 2000. "Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver". Toxicological Sciences, vol. 57, p. 156-66.

- KANG, K. S., J. E. Park, D. Y. Ryu et Y. S. Lee. 2001. "Effects and neuro-toxic mechanisms of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl and endosulfan in neuronal stem cells". Journal of Veterinary Medical Science, vol. 63, p. 1183-90.
- KANG, K. S., M. R. Wilson, T. Hayashi, C. C. Chang et J. E. Trosko. 1996. "Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures". Environmental Health Perspectives, vol. 104, p. 192-200.
- KATO, Y., K. Haraguchi, T. Shibahara, S. Yumoto, Y. Masuda et R. Kimura. 1999. "Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of tetra- and pentachlorinated biphenyls in male Sprague-Dawley rats". Toxicological Sciences, vol. 48, p. 51-4.
- KAYA, H., J. Hany, A. Fastabend, A. Roth-Harer, G. Winneke et H. Lilienthal. 2002. "Effects of maternal exposure to a reconstituted mixture of polychlorinated biphenyls on sex-dependent behaviors and steroid hormone concentrations in rats: dose-response relationship". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 178, p. 71-81.
- KHAN, S. A., K. A. Yee, C. Kaplan et J. F. Siddiqui. 2002. "Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time". International Journal of Cancer, vol. 102, p. 334-7.
- KIMBROUGH, R. D., R. A. Squire, R. E. Linder, J. D. Strandberg, R. J. Montalli et V. W. Burse. 1975. "Induction of liver tumor in Sherman strain female rats by polychlorinated biphenyl aroclor 1260". Journal of the National Cancer Institute, vol. 55, p. 1453-9.
- KMIEC, Z. 2001. "Cooperation of liver cells in health and disease". Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, vol. 161, p. III-XIII, 1-151.
- KOLAJA, K. L., D. T. Engelken et C. D. Klaassen. 2000. "Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens". Toxicology, vol. 146, p. 15-22.
- KOSATSKY, T., R. Przybysz, B. Shatenstein, J. P. Weber et B. Armstrong. 1999. "Fish consumption and contaminant exposure among Montreal-area sportfishers: pilot study". Environmental Research, vol. 80, p. S150-S158.
- KOSTYNIAK, P. J., C. Stinson, H. B. Greizerstein, J. Vena, G. Buck et P. Mendola. 1999. "Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentrations". Environmental Research, vol. 80, p. S166-S174.
- KRAMER, V. J. et J. P. Giesy. 1999. "Specific binding of hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites and other substances to bovine calf uterine estrogen receptor: structure-binding relationships". Science of the Total Environment, vol. 233, p. 141-61.

KRISHNAN, V. et S. Safe. 1993. "Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 120, p. 55-61.

KRUTOVSKIKH, V., G. Mazzoleni, N. Mironov, Y. Omori, A. M. Aguelon, M. Mesnil, F. Berger, C. Partensky et H. Yamasaki. 1994. "Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32". International Journal of Cancer, vol. 56, p. 87-94.

KRUTOVSKIKH, V. et H. Yamasaki. 1997. "The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis". Histology and Histopathology, vol. 12, p. 761-8.

KRUTOVSKIKH, V. A., M. Mesnil, G. Mazzoleni et H. Yamasaki. 1995. "Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins". Laboratory Investigation, vol. 72, p. 571-7.

LAING, J. G., P. N. Tadros, E. M. Westphale et E. C. Beyer. 1997. "Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome". Experimental Cell Research, vol. 236, p. 482-92.

LAIRD, D. W. 1996. "The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation". Journal of Bioenergetics and Biomembranes, vol. 28, p. 311-8.

LAIRD, D. W., M. Castillo et L. Kasprzak. 1995. "Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells". Journal of Cell Biology, vol. 131, p. 1193-203.

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

LANCASTER, J. M., R. Wooster, J. Mangion, C. M. Phelan, C. Cochran, C. Gumbs, S. Seal, R. Barfoot, N. Collins, G. Bignell, S. Patel, R. Hamoudi, C. Larsson, R. W. Wiseman, A. Berchuck, J. D. Iglehart, J. R. Marks, A. Ashworth, M. R. Stratton et P. A. Futreal. 1996. "BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers". Nature Genetics, vol. 13, p. 238-40.

LAVALLEE, T. M., X. H. Zhan, C. J. Herbstritt, E. C. Kough, S. J. Green et V. S. Pribluda. 2002. "2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta". Cancer Research, vol. 62, p. 3691-7.

LAYTON, A. C., J. Sanseverino, B. W. Gregory, J. P. Easter, G. S. Sayler et T. W. Schultz. 2002. "In vitro estrogen receptor binding of PCBs: measured activity and detection of hydroxylated metabolites in a recombinant yeast assay". Toxicology and

Applied Pharmacology, vol. 180, p. 157-63.

LEBEL, G., S. Dodin, P. Ayotte, S. Marcoux, L. A. Ferron et E. Dewailly. 1998. "Organochlorine exposure and the risk of endometriosis". Fertility and Sterility, vol. 69, p. 221-8.

LEIBOLD, E. et L. R. Schwarz. 1993. "Inhibition of intercellular communication in rat hepatocytes by phenobarbital, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) and gamma-hexachlorocyclohexane (lindane): modification by antioxidants and inhibitors of cyclo-oxygenase". Carcinogenesis, vol. 14, p. 2377-82.

LOCKE, D. 1998. "Gap junctions in normal and neoplastic mammary gland". Journal of Pathology, vol. 186, p. 343-9.

LODISH, B. B. Z. M. D. 1997. "Biologie Moléculaire de la Cellule". DeBoeck Université, vol. Troisième édition, p. 1344.

LYCHE, J. L., J. U. Skaare, H. J. Larsen et E. Ropstad. 2004. "Levels of PCB 126 and PCB 153 in plasma and tissues in goats exposed during gestation and lactation". Chemosphere, vol. 55, p. 621-9.

MA, X. D., X. Ma, Y. F. Sui, W. L. Wang et C. M. Wang. 2003. "Signal transduction of gap junctional genes, connexin32, connexin43 in human hepatocarcinogenesis". World J Gastroenterol, vol. 9, p. 946-50.

MACHALA, M., L. Blaha, H. J. Lehmler, M. Pliskova, Z. Majkova, P. Kapplova, I. Sovadinova, J. Vondracek, T. Malmberg et L. W. Robertson. 2004. "Toxicity of hydroxylated and quinoid PCB metabolites: inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of aryl hydrocarbon and estrogen receptors in hepatic and mammary cells". Chemical Research in Toxicology, vol. 17, p. 340-7.

MACHALA, M., L. Blaha, J. Vondracek, J. E. Trosko, J. Scott et B. L. Upham. 2003. "Inhibition of gap junctional intercellular communication by noncoplanar polychlorinated biphenyls: inhibitory potencies and screening for potential mode(s) of action". Toxicological Sciences, vol. 76, p. 102-11.

MACKAY, D. 1992. "Illustrated Handbook of Physical-chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals". Volume I. Monoaromatic Hydrocarbons

MALLY, A. et J. K. Chipman. 2002. "Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat". Toxicology, vol. 180, p. 233-48.

MATESIC, D. F., H. L. Rupp, W. J. Bonney, R. J. Ruch et J. E. Trosko. 1994. "Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells". Molecular Carcinogenesis, vol. 10, p. 226-36.

MAYES, B. A., E. E. McConnell, B. H. Neal, M. J. Brunner, S. B. Hamilton, T. M. Sullivan, A. C. Peters, M. J. Ryan, J. D. Toft, A. W. Singer, J. F. Brown Jr, R. G. Menton et J. A. Moore. 1998. "Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260". Toxicological Sciences, vol. 41, p. 62-76.

MCLEAN, M. R., T. P. Twaroski et L. W. Robertson. 2000. "Redox cycling of 2-(x'-mono, -di, -trichlorophenyl)- 1, 4- benzoquinones, oxidation products of polychlorinated biphenyls". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 376, p. 449-55.

MESNIL, M. 2002. "Connexins and cancer". Biologie Cellulaire, vol. 94, p. 493-500.

MESNIL, M. 2004. "[Gap junctions and cancer: implications and perspectives]". Med Sci (Paris), vol. 20, p. 197-206.

MICHAEL D. KANE, T. A. J. C. R. S. J. D. T. a. S. J. M. 2000. "Assessment of the sensivity and specificity of oligonucléotide (50mer) microarrays.". Nucleic Acids Research, vol. 28, p. 4552-4557.

MIKI, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett, W. Ding et a. l. et. 1994. "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1". Science, vol. 266, p. 66-71.

MILLIS, C. D., R. A. Mills, S. D. Sleight et S. D. Aust. 1985. "Toxicity of 3,4,5,3',4',5'-hexabrominated biphenyl and 3,4,3',4'-tetrabrominated biphenyl". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 78, p. 88-95.

MILLSJ.J., J. R. I. 1995. "Mechanism of liver tumor promotion.". Regeneration and Carcinogenesis, vol. 199-226.

MITIC, L. L., C. M. Van Itallie et J. M. Anderson. 2000. "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins". Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, vol. 279, p. G250-4.

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

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

MORI, H., S. Sugie, N. Yoshimi, A. Hara et T. Tanaka. 1999. "Control of cell proliferation in cancer prevention". Mutation Research, vol. 428, p. 291-8.

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

MUSIL, L. S. et D. A. Goodenough. 1993. "Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER". Cell, vol. 74, p. 1065-77.

MYLCHREEST, E. et M. Charbonneau. 1997. "Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 145, p. 23-33.

NAIKI, T., M. Nagaki, Y. Shidoji, H. Kojima, M. Imose, T. Kato, N. Ohishi, K. Yagi et H. Moriwaki. 2002. "Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4alpha in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 14011-9.

NEVEU, M. J., J. R. Hully, K. L. Babcock, E. L. Hertzberg, B. J. Nicholson, D. L. Paul et H. C. Pitot. 1994. "Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver". Journal of Cell Science, vol. 107 (Pt 1), p. 83-95.

NEWSOME, W. H., D. J. Davies et W. F. Sun. 1998. "Residues of polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty foods of the Canadian diet". Food Additives and Contaminants, vol. 15, p. 19-29.

No authors listed, 1994. "Interpretive review of the potential adverse effects of chlorinated organic chemicals on human health and the environment. Report of an expert panel". Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 20, p. S1-1056.

NOMATA, K., K. S. Kang, T. Hayashi, D. Matesic, L. Lockwood, C. C. Chang et J. E. Trosko. 1996. "Inhibition of gap junctional intercellular communication in heptachlor- and heptachlor epoxide-treated normal human breast epithelial cells". Cell Biology and Toxicology, vol. 12, p. 69-78.

OLIVER, J. D. et R. A. Roberts. 2002. "Receptor-mediated hepatocarcinogenesis: role of hepatocyte proliferation and apoptosis". Pharmacology and Toxicology, vol. 91, p. 1-7.

PANG, S., J. Q. Cao, B. H. Katz, C. L. Hayes, T. R. Sutter et D. C. Spink. 1999. "Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1". Biochemical Pharmacology, vol. 58, p. 29-38.

PARHAM, F. M., M. C. Kohn, H. B. Matthews, C. DeRosa et C. J. Portier. 1997. "Using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all polychlorinated biphenyls". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 144, p. 340-7.

PITOT, H. C. et Y. P. Dragan. 1994. "The multistage nature of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat". Drug Metabolism Reviews, vol. 26, p. 209-20.

PITOT, H. C., D. Goodspeed, T. Dunn, S. Hendrich, R. R. Maronpot et S. Moran. 1989. "Regulation of the expression of some genes for enzymes of glutathione metabolism in hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 97, p. 23-34.

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

PORTIGAL, C. L., S. P. Cowell, M. N. Fedoruk, C. M. Butler, P. S. Rennie et C. C. Nelson. 2002. "Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 179, p. 185-94.

PRITCHARD, C. C., L. Hsu, J. Delrow et P. S. Nelson. 2001. "Project normal: defining normal variance in mouse gene expression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 13266-71.

REN, P., P. Mehta et R.J. Ruch. 1998. "Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C". Carcinogenesis, vol. 19, p. 169-75.

RIVEDAL, E., S. O. Mikalsen et T. Sanner. 2000. "Morphological transformation and effect on gap junction intercellular communication in Syrian hamster embryo cells as screening tests for carcinogens devoid of mutagenic activity". Toxicol In Vitro, vol. 14, p. 185-92.

RUCH, R. J. 1994. "The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia". Annals of Clinical Laboratory Science, vol. 24, p. 216-31.

RUCH, R. J., W. J. Bonney, K. Sigler, X. Guan, D. Matesic, L. D. Schafer, E. Dupont et J. E. Trosko. 1994. "Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells". Carcinogenesis, vol. 15, p. 301-6.

RUCH, R. J., R. Fransson, S. Flodstrom, L. Warngard et J. E. Klaunig. 1990. "Inhibition of hepatocyte gap junctional intercellular communication by endosulfan, chlordane and heptachlor". Carcinogenesis, vol. 11, p. 1097-101.

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

RUMMEL, A. M., J. E. Trosko, M. R. Wilson et B. L. Upham. 1999. "Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity". Toxicological Sciences, vol. 49, p. 232-40.

- RUSSO, J., Q. Tahin, M. H. Lareef, Y. F. Hu et I. H. Russo. 2002. "Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens". Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 39, p. 254-63.
- SAEZ, C. G., L. Velasquez, M. Montoya, E. Eugenin et M. G. Alvarez. 2003. "Increased gap junctional intercellular communication is directly related to the anti-tumor effect of all-trans-retinoic acid plus tamoxifen in a human mammary cancer cell line". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 89, p. 450-61.
- SAFE, S. H. 1998. "Interactions between hormones and chemicals in breast cancer". Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 38, p. 121-58.
- SAI, K., J. Kanno, R. Hasegawa, J. E. Trosko et T. Inoue. 2000. "Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol". Carcinogenesis, vol. 21, p. 1671-6.
- SANTÉ CANADA. 2003. "Apports alimentaires (ng/kg de poids corporel/jour) de biphényles polychlorés (BPC) totale chez les Canadiens de différents groupes d'âge-sexe". Étude de la diète totale à Toronto, 1996
- SASS, J. B., L. C. Ang et B. H. Juurlink. 1993. "Aluminum pretreatment impairs the ability of astrocytes to protect neurons from glutamate mediated toxicity". Brain Research, vol. 621, p. 207-14.
- SCHAEFFER, E., H. Greim et W. Goessner. 1984. "Pathology of chronic polychlorinated biphenyl (PCB) feeding in rats". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 75, p. 278-88.
- SCHERF, U., D. T. Ross, M. Waltham, L. H. Smith, J. K. Lee, L. Tanabe, K. W. Kohn, W. C. Reinhold, T. G. Myers, D. T. Andrews, D. A. Scudiero, M. B. Eisen, E. A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P. O. Brown et J. N. Weinstein. 2000. "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer". Nature Genetics, vol. 24, p. 236-44.
- SCHIELEN, P., C. Den Besten, J. G. Vos, P. J. Van Bladeren, W. Seinen et N. Bloksma. 1995. "Immune effects of hexachlorobenzene in the rat: role of metabolism in a 13-week feeding study". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 131, p. 37-43.
- SCHIRRMACHER, K., M. Wiemann, D. Bingmann et D. Busselberg. 1998. "Effects of lead, mercury, and methyl mercury on gap junctions and". Calcified Tissue International, vol. 63, p. 134-9.
- SCHULTE-HERMANN, R., W. Bursch, B. Marian et B. Grasl-Kraupp. 1999. "Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens". IARC Scientific Publications, vol. 273-85.

SEGRETAIN, D. et M. M. Falk. 2004. "Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1662, p. 3-21.

SENF, A. P., T. P. Dalton, D. W. Nebert, M. B. Genter, R. J. Hutchinson et H. G. Shertzer. 2002. "Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 178, p. 15-21.

SHIMKETS, R. A., D. G. Lowe, J. T. Tai, P. Sehl, H. Jin, R. Yang, P. F. Predki, B. E. Rothberg, M. T. Murtha, M. E. Roth, S. G. Shenoy, A. Windemuth, J. W. Simpson, J. F. Simons, M. P. Daley, S. A. Gold, M. P. McKenna, K. Hillan, G. T. Went et J. M. Rothberg. 1999. "Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query". Nature Biotechnology, vol. 17, p. 798-803.

SILBERHORN, E. M., H. P. Glauert et L. W. Robertson. 1990. "Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs". Critical Reviews in Toxicology, vol. 20, p. 440-96.

SINCLAIR, P. R., N. Gorman, H. S. Walton, J. F. Sinclair, C. A. Lee et A. B. Rifkind. 1997. "Identification of CYP1A5 as the CYP1A enzyme mainly responsible for uroporphyrinogen oxidation induced by AH receptor ligands in chicken liver and kidney". Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals, vol. 25, p. 779-83.

SPINK, D. C., B. C. Spink, J. Q. Cao, J. A. DePasquale, B. T. Pentecost, M. J. Fasco, Y. Li et T. R. Sutter. 1998. "Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells". Carcinogenesis, vol. 19, p. 291-8.

STATISTIQUE CANADA. 2003. " *Causes de décès*". Division de la statistique de la santé, vol. Catalogue 84-208-XIE.

STOEHR, S. A. et H. C. Isom. 2003. "Gap junction-mediated intercellular communication in a long-term primary mouse hepatocyte culture system". Hepatology, vol. 38, p. 1125-35.

TAKEICHI, M. 1991. "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator". Science, vol. 251, p. 1451-5.

TAKEICHI, M. 2002. "Mechanisms of morphogenetic cell assembly". Keio Journal of Medicine, vol. 51, p. 72-6.

TANNO, K. et Y. Aoki. 1996. "Phosphorylation of c-Jun stimulated in primary cultured rat liver parenchymal cells by a coplanar polychlorinated biphenyl". Biochemical Journal, vol. 313 (Pt 3), p. 863-6.

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

- THARAPPEL, J. C., E. Y. Lee, L. W. Robertson, B. T. Spear et H. P. Glauert. 2002. "Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 179, p. 172-84.
- THEISS, C. et K. Meller. 2001. "Inhibitory effect of aluminium on the axonal transport of HRP microinjected into dorsal root ganglion neurons in vitro". Journal of Neurocytology, vol. 30, p. 59-71.
- THORGEIRSSON, S. S. et J. W. Grisham. 2002. "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma". Nature Genetics, vol. 31, p. 339-46.
- TILL, M., D. Riebniger, H. J. Schmitz et D. Schrenk. 1999. "Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures". Chemico-Biological Interactions, vol. 117, p. 135-50.
- TOKES, A. M., J. Kulka, S. Paku, A. Szik, C. Paska, P. K. Novak, L. Szilak, A. Kiss, K. Bogi et Z. Schaff. 2005. "Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study". Breast Cancer Res, vol. 7, p. R296-305.
- TROSKO, J. E. et C. C. Chang. 2000. "Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer". Biofactors, vol. 12, p. 259-63.
- TROSKO, J. E. et R. J. Ruch. 1998. "Cell-cell communication in carcinogenesis". Frontiers in Bioscience, vol. 3, p. D208-36.
- TSAI, M. L., K. Cesen-Cummings, R. C. Webb et R. Loch-Carusio. 1998. "Acute inhibition of spontaneous uterine contractions by an estrogenic polychlorinated biphenyl is associated with disruption of gap junctional communication". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 152, p. 18-29.
- TWAROSKI, T. P., M. L. O'Brien, N. Larmonier, H. P. Glauert et L. W. Robertson. 2001. "Polychlorinated biphenyl-induced effects on metabolic enzymes, AP-1 binding, vitamin E, and oxidative stress in the rat liver". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 171, p. 85-93.
- ULBRICH, B. et R. Stahlmann. 2004. "Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data". Archives of Toxicology, vol.
- UPHAM, B. L., S. J. Masten, B. R. Lockwood et J. E. Trosko. 1994. "Nongenotoxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenation by-products on the intercellular communication of rat liver epithelial cells". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 23, p. 470-5.
- UPHAM, B. L., L. M. Weis, A. M. Rummel, S. J. Masten et J. E. Trosko. 1996. "The effects of anthracene and methylated anthracenes on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells". Fundamental and Applied Toxicology, vol.

34, p. 260-4.

UPHAM, B. L., L. M. Weis et J. E. Trosko. 1998. "Modulated gap junctional intercellular communication as a biomarker of PAH epigenetic toxicity: structure-function relationship". Environmental Health Perspectives, vol. 106 Suppl 4, p. 975-81.

VAN DER PLAS, S. A., M. Haag-Gronlund, G. Scheu, L. Warngard, M. van den Berg, P. Wester, J. H. Koeman et A. Brouwer. 1999. "Induction of altered hepatic foci by a mixture of dioxin-like compounds with and without 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in female Sprague-Dawley rats". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 156, p. 30-9.

VAN DER PLAS, S. A., H. Sundberg, H. van den Berg, G. Scheu, P. Wester, S. Jensen, A. Bergman, J. de Boer, J. H. Koeman et A. Brouwer. 2000. "Contribution of planar (0-1 ortho) and nonplanar (2-4 ortho) fractions of Aroclor 1260 to the induction of altered hepatic foci in female Sprague-Dawley rats". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 169, p. 255-68.

VAN DUURSEN, M. B., J. T. Sanderson, M. van der Bruggen, J. van der Linden et M. van den Berg. 2003. "Effects of several dioxin-like compounds on estrogen metabolism in the malignant MCF-7 and nontumorigenic MCF-10A human mammary epithelial cell lines". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 190, p. 241-50.

WARING, J. F., R. A. Jolly, R. Ciurlionis, P. Y. Lum, J. T. Praestgaard, D. C. Morfitt, B. Buratto, C. Roberts, E. Schadt et R. G. Ulrich. 2001. "Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 175, p. 28-42.

WARN-CRAMER, B. J., G. T. Cottrell, J. M. Burt et A. F. Lau. 1998. "Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 9188-96.

WARNER, K. A., M. J. Fernstrom et R. J. Ruch. 2003. "Inhibition of mouse hepatocyte gap junctional intercellular communication by phenobarbital correlates with strain-specific hepatocarcinogenesis". Toxicological Sciences, vol. 71, p. 190-7.

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

WEIS, L. M., A. M. Rummel, S. J. Masten, J. E. Trosko et B. L. Upham. 1998. "Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication". Environmental Health Perspectives, vol. 106, p. 17-22.

WINDOFFER, R., B. Beile, A. Leibold, S. Thomas, U. Wilhelm et R. E. Leube. 2000. "Visualization of gap junction mobility in living cells". Cell and Tissue Research, vol. 299, p. 347-62.

- XU, X. R., J. Huang, Z. G. Xu, B. Z. Qian, Z. D. Zhu, Q. Yan, T. Cai, X. Zhang, H. S. Xiao, J. Qu, F. Liu, Q. H. Huang, Z. H. Cheng, N. G. Li, J. J. Du, W. Hu, K. T. Shen, G. Lu, G. Fu, M. Zhong, S. H. Xu, W. Y. Gu, W. Huang, X. T. Zhao, G. X. Hu, J. R. Gu, Z. Chen et Z. G. Han. 2001. "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 15089-94.
- XU, Y. H., R. Maronpot et H. C. Pitot. 1990. "Quantitative stereologic study of the effects of varying the time between initiation and promotion on four histochemical markers in rat liver during hepatocarcinogenesis". Carcinogenesis, vol. 11, p. 267-72.
- YAMADA-OKABE, T., T. Aono, H. Sakai, Y. Kashima et H. Yamada-Okabe. 2004. "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin augments the modulation of gene expression mediated by the thyroid hormone receptor". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 194, p. 201-10.
- YAMASAKI, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, A. Columbano, H. Tsuda et N. Ito. 1993. "Gap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis". Environmental Health Perspectives, vol. 101 Suppl 5, p. 191-7.
- YAMASAKI, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, T. Tanaka, M. L. Zaidan-Dagli et Y. Omori. 1999. "Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis". Comptes Rendus de l Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie, vol. 322, p. 151-9.
- YAMAZAKI, K., J. Kuromitsu et I. Tanaka. 2002. "Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator- activated receptor alpha agonists". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 290, p. 1114-22.
- YEAGER, M., V. M. Unger et M. M. Falk. 1998. "Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels". Current Opinion in Structural Biology, vol. 8, p. 517-24.
- YOUNG, R. A. 2000. "Biomedical discovery with DNA arrays". Cell, vol. 102, p. 9-15.
- YU, C. W., J. H. Chen et L. Y. Lin. 1997. "Metal-induced metallothionein gene expression can be inactivated by protein kinase C inhibitor". FEBS Letters, vol. 420, p. 69-73.
- YUE, H., P. S. Eastman, B. B. Wang, J. Minor, M. H. Doctolero, R. L. Nuttall, R. Stack, J. W. Becker, J. R. Montgomery, M. Vainer et R. Johnston. 2001. "An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression". Nucleic Acids Res, vol. 29, p. E41-1.

