

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

***Le rôle de la communication intercellulaire dans la  
formation de tumeurs hépatiques induites par  
l'hexachlorobenzène chez le rat.***

Par  
Isabelle Plante

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dre Barbara Hales Department of Pharmacology and Therapeutics McGill University.
Examineur interne	Dr Édouard Kouassi INRS-Institut Armand-Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine
Directeur de recherche	Dr Michel Charbonneau INRS-Institut Armand-Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine
Co-directeur de recherche	Dr Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand-Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine.



## RÉSUMÉ

L'hexachlorobenzène (HCB) est un carcinogène épigénétique très répandu dans l'environnement de par son utilisation massive au cours des années passées, sa formation lors de synthèses industrielles et sa grande bio-accumulation. La présence de l'HCB a été démontrée dans les tissus humains et animaux. Lorsque des rats sont exposés à l'HCB, les femelles développent des cancers de façon beaucoup plus importante que les mâles. L'HCB cause une promotion de la formation de tumeurs suite à l'administration d'un initiateur de tumeurs.

Plusieurs polluants épigénétiques induisent la formation de cancers en modulant la communication intercellulaire, plus particulièrement au niveau des jonctions lacunaires, libérant ainsi les cellules initiées du contrôle des autres cellules.

L'objectif des travaux de ce mémoire était de caractériser la prédisposition des femelles au développement de tumeurs hépatiques induites par l'HCB. Selon notre hypothèse de recherche, l'HCB exercerait son action en modulant l'expression des connexines (protéines formant les jonctions lacunaires) dans le foie des rats femelles, ce qui amènerait une baisse de la communication entre les cellules et favoriserait le développement de tumeurs cancéreuses.

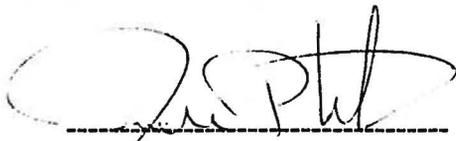
Des rats, mâles et femelles, ont été exposés à l'HCB durant cinq jours consécutifs et leur foie fut prélevé au jour 50 afin d'évaluer l'effet de l'HCB sur les jonctions lacunaires. Des analyses de type Northern ont permis de démontrer une baisse des ARNm codant pour Cx26 et Cx32 uniquement chez les femelles. Par la suite, des analyses Western ont confirmé ces diminutions au niveau protéique. Ces modulations amènent une inhibition de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires, telle qu'observée au jour 100 par la technique «d'incision-loading/dye-transfer».

Les résultats expérimentaux ont aussi démontré qu'il existe un dimorphisme sexuel au niveau des Cxs dans le foie de rat. Les mâles ont plus de Cx32 que les femelles, mais ils ont cependant moins de Cx26. Pour étudier la régulation de l'expression menant à ce dimorphisme, des rats femelles ont été ovariectomisées (OV) et la moitié d'entre elles ont reçu un implant afin de maintenir un niveau physiologique

d'estradiol. Des analyses Northern sur les foies prélevés 10 jours après l'opération ont démontré une modulation ovarienne chez la femelle, qui augmente le niveau d'ARNm de Cx26, mais abaisse le niveau de Cx32 par rapport aux femelles OV. De plus, l'estradiol joue un rôle partiel de rétro-inhibition dans la régulation de l'expression de la Cx32, mais il n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm de Cx26.

Afin de vérifier si ces modulations étaient responsables de la prédisposition des femelles à la formation de tumeurs hépatiques, des femelles intactes et des femelles OV ont été traitées à l'HCB et comparées à des rats non-traités du même état, soit normal ou OV. Ces résultats ont permis de démontrer que les femelles OV traitées à l'HCB démontrent, au jour 45, une baisse des ARNm codant pour Cx26 et Cx32 encore plus importante que la baisse causée par le traitement chez les femelles intactes. De plus, même si la modulation ovarienne de la Cx26 semble persistante entre les jours 10 et 45, celle de la Cx32 n'est plus significative.

Nos résultats suggèrent que l'HCB exercerait une action pro-cancérogénique de type épigénétique en modulant la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires. Pour ce faire, il diminue l'expression et la quantité de Cxs présentes au niveau du foie. L'inhibition de la communication entre les hépatocytes résultant de la baisse de Cxs semble être responsable de la prédisposition des femelles au développement de tumeurs hépatiques. Cependant, en dépit d'un dimorphisme dans le niveau de base des Cxs, la baisse causée par l'HCB semble dépendre d'un mécanisme hépatique non influencé par les ovaires, tel que démontré par l'effet de l'HCB chez la femelle OV. Les présents travaux ouvrent la voie à l'hypothèse d'un mécanisme de knock-out chimique de la Cx32 à la base de l'action épigénétique de l'HCB.



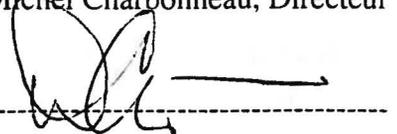
---

Isabelle Plante, Étudiante



---

Michel Charbonneau, Directeur



---

Daniel G. Cyr, co-Directeur



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche :

- Michel Charbonneau, pour sa confiance, son appui et ses encouragements. Merci d'avoir vu du positif dans des analyses qui parfois, pour moi, me semblaient peu encourageantes.

- Daniel G. Cyr, pour sa présence, son temps, sa passion pour la recherche et pour avoir partagé une partie de son savoir.

Merci à vous deux pour m'avoir si bien accompagné dans mon cheminement que je ne peux maintenant que continuer, en votre compagnie, des études dans un domaine passionnant.

Merci à Guylaine Lassonde, technicienne du Dr Charbonneau, pour sa bonne humeur, ses conseils précieux, son assistance et plus particulièrement pour avoir égayé mes journées de son rire communicatif et de ses magnifiques chansons.. !

Merci à Julie Dufresne, assistant de recherche du Dr Cyr, pour son enseignement, ses conseils et son amitié. Merci à Mary Gregory, assistante de recherche du Dr Cyr, pour ses conseils et sa bonne humeur.

Merci à tous mes collègues de laboratoire et amis, plus particulièrement à Stéphanie, David, Robert, Stéphane, Jean-Marc, Sophie, Nancy, Johanna, Ken, et à mes copains d'en face et d'ailleurs, Myrian, Claudine, Julie, Michele, Marie-Soleil, Martin, pour leurs conseils techniques et pour avoir partagé quelques moments de folies.

Merci à ma famille, mon père Roger, ma mère Nicole et mon frère Jean-François, pour leur encouragement et leur amour. Merci aussi à Michelle pour ses conseils précieux et son enthousiasme.

Finalement, merci à Frédéric, pour ton amour, ta présence, tes encouragements et ton sourire... et dis-toi que ça ne fait que commencer, il reste au moins trois autres années de doctorat.. !

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>XIII</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
<b>Section 1 : L'hexachlorobenzène.....</b>	<b>5</b>
1.1 Caractéristiques chimiques et différentes appellations.....	5
1.2 Utilisation et distribution de l'hexachlorobenzène.....	6
1.2.1 Période d'utilisation.....	6
1.2.2 Sources d'émission de l'hexachlorobenzène.....	6
1.2.3 Distribution environnementale de l'hexachlorobenzène.....	7
1.2.4 Dose journalière d'exposition de la population.....	7
1.3 Métabolisme de l'hexachlorobenzène.....	8
1.4 Effets de l'hexachlorobenzène sur la santé.....	10
1.4.1 Porphyrie.....	11
1.4.1.1 Études en laboratoire.....	12
1.4.1.2 Cas Humains.....	14
1.4.2 Hépatocarcinogénèse.....	15
1.4.2.1 Études en laboratoire.....	15
1.4.2.2 Cas humain.....	16
1.5 Politiques du Gouvernement canadien concernant l'hexachlorobenzène...16	
1.5.1 Diverses classifications de l'HCB.....	16
1.5.2 Classification de l'hexachlorobenzène dans la liste des substances prioritaires canadienne.....	16
1.5.3 Recommandations du gouvernement concernant	

l'étude de l'hexachlorobenzène.....	17
<b>Section 2: La cancérogenèse.....</b>	<b>19</b>
2.1. La théorie des cellules souches et la théorie de la dé-différentiation.....	19
2.2 La théorie de l'oncologie et l'ontologie bloquée ou partiellement bloquée.....	20
2.3 La théorie «nature versus nurture».....	21
2.4. La cancérogenèse génotoxique versus épigénétique.....	22
2.4.1 Les carcinogènes mutagéniques.....	22
2.4.2 Les carcinogènes épigénétiques.....	22
2.5 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs.....	23
2.6 Le caractère mutli-stade de la carcinogenèse.....	24
2.6.1 L'initiation.....	26
2.6.2 La promotion.....	27
2.6.3 La progression.....	28
<b>Section 3: La communication intercellulaire via les jonctions lacunaires.....</b>	<b>31</b>
3.1 Les jonctions lacunaires.....	31
3.1.1 L'homéostasie et la communication cellulaire.....	31
3.1.2 Le rôle de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires.....	33
3.1.3 Revue des jonctions lacunaires.....	34
3.2 Les connexons.....	34
3.2.1 Structure physique d'un connexon.....	34
3.2.2 Les types de connexons.....	37
3.2.3 Formation des jonctions lacunaires.....	38
3.3.1.1 Retrait des jonctions de la membrane.....	42
3.3.1.2 Dégradation des jonctions.....	42
3.3 Les connexines.....	43
3.3.1 La découverte des connexines et leur distribution dans les tissus.....	43
3.3.2 Structure des connexines.....	46



Acknowledgements.....	91
References.....	92
Figures legend.....	99
Figures.....	102
<b>TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>141</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ADN** Acide déoxyribonucléotique
- **ADNc** Acide déoxyribonucléotique complémentaire
- **AHF** Foyer hépatique altéré (Altered Hepatic Foci)
- **ARNm** Acide ribonucléotique messenger
- **ATPase** Adénosine triphosphatase
- **BPC** Byphényles polychlorés
- **BrdU** 5'-Bromo-2'-déoxyuridine
- **C** Cystéine des connexines
- **Ca<sup>++</sup> ou Ca<sup>2+</sup>** Ions Calcium
- **cAMP** Adénosine monophosphate cyclique
- **CCREM** Conseil canadien du Ministère des ressources et de l'environnement
- **Cdk2,4,5,6** Kinase dépendante des cyclines de types 2,4,5 et 6
- **CFP** Protéine fluorescente Cyan (Cyan Fluorescente Protein)
- **CL** Domaine cytoplasmique en boucle des connexines
- **CMT** Charcot-Marie-Tooth
- **CT** C-terminal
- **Cx** Connexine
- **Cxs** Connexines
- **DDT** Dichlorodiphényltrichloroéthane
- **DEN** Diéthylnitrosamine
- **E1 et E2** Domaine extracellulaire en boucle 1 et 2 des connexines
- **EAF** Foyer enzymatique altéré (Enzyme Altered Foci)
- **EHEN** N-éthyl-N-hydroxy-éthylnitrosamine
- **GFP** Protéine fluorescente Verte (Green Fluorescente Protein)
- **GGT** Gamma-glutamyltransférase
- **GJIC** Communication intercellulaire via les jonctions lacunaires (Gap Junctional Intercellular Communication)

- **GSH** Glutathion
- **GST-P** Glutathione-S-transférase placentaire
- **HCB** Hexachlorobenzène
- **HCC** Carcinome hépatocellulaire
- **IARC** Agence Internationale de recherche sur le cancer
- **M1 à M4** Domaine transmembranaire en hélice- $\alpha$  1 à 4 des connexines
  
- **MTCP** Mercaptotétrachlorophénol
- **NO** Oxyde Nitrique
- **NT** N-terminal
- **OV** Ovariectomisée
- **PCNA** Antigène nucléaire de prolifération cellulaire (Proliferating Cell nuclear antigen)
  
- **PCP** Pentachlorophénol
- **PCP-NAC** *N*-acétyl-*S*-(pentachlorophénol)-cystéine
- **PCT** *Porphyria cutanea tarda*
- **PCTP** Pentachlorothiophénol
- **PKA** Protéine kinase A
- **PKC** Protéine kinase C
- **PP1R3** Sous-unité 3 de la protéine phosphatase
- **RLGS** Balayage génomique par site de restriction (Restriction landmark genomic scanning)
  
- **TCDD** 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine
- **TCHQ** Tétrachlorohydroquinone
- **TDI** Dose journalière tolérée (Tolerable Daily Intake)
- **TCTP** Tétrachlorothiophénol
- **TGF- $\alpha$**  Facteur de croissance transformant (transforming growth factor  $\alpha$ )
  
- **TPA** 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acétate
- **URO-D** Uroporphyrinogène décarboxylase

- **VEGF** Facteur de croissance endothélial vasculaire
- **YFP** Protéine fluorescente Jaune (Yellow Fluorescent Protein)



## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure chimique de l'hexachlorobenzène.....	5
<b>Figure 2</b> : Voies métaboliques de l'hexachlorobenzène.....	9
<b>Figure 3</b> : Mécanisme de la porphyrie hépatique.....	13
<b>Figure 4</b> : Schéma de la carcinogénèse multi-stade.....	25
<b>Figure 5</b> : Schéma de la structure physique des connexons et de leur arrangement en jonction.....	36
<b>Figure 6</b> : Schéma représentant les types de connexons selon les connexines qui les composent.....	37
<b>Figure 7</b> : Cycle de vie des jonctions lacunaires .....	39
<b>Figure 8</b> : Schéma de la structure des connexines.....	48
 Annexe	
<b>Figure 9</b> : Isolation des sondes d'ADNc de E-cadhérine et d'Occludine.....	148
<b>Figure 10</b> : Analyses Northern de l'expression de la Claudine-1 dans le foie de rat femelles.....	149
<b>Figure 11</b> : Analyses Northern de l'expression de la E-cadhérine dans le foie de rat femelles.....	150

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Distribution des connexines dans les tissus de mammifères.....	45
<b>Tableau 2</b> : Phénotypes des souris knockout pour les connexines.....	59
<b>Tableau 3</b> : Oncogènes interagissant avec la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires.....	65



## INTRODUCTION

L'hexachlorobenzène (HCB) est un polluant bien répandu dans l'environnement. Il a été utilisé majoritairement dans les années 60-70 comme fongicide. Cependant, suite à la reconnaissance de son potentiel toxique, le Gouvernement du Canada, tout comme beaucoup d'autres pays industrialisés, a décidé de le bannir en 1973. Comme tous les organochlorés, c'est un produit hautement bio-accumulable. De plus, même s'il n'est plus utilisé directement comme fongicide, il est toujours synthétisé comme produit secondaire lors de la fabrication d'autres pesticides ou dans des rejets d'usines de solvants chlorés. Si bien qu'il est toujours présent dans les tissus humains et animaux.

Plusieurs études ont démontré que l'HCB est un carcinogène épigénétique, c'est-à-dire qu'il favorise la formation de tumeurs non pas en causant des mutations au niveau de l'ADN, mais plutôt en modifiant l'expression de certains gènes. Il est considéré comme étant un bon promoteur de tumeurs hépatiques dans le rat. Cependant, lorsque des rats sont exposés à l'HCB, les femelles développent de nombreuses tumeurs, tandis que les mâles en développent très peu, ou pas. Des études réalisées dans notre laboratoire (Charbonneau et al., 1999) ainsi que par d'autres équipes (Smith & Cabral, 1980; Lambrecht et al., 1983; Smith et al., 1985) ont toutes démontrés un taux significativement plus élevé de tumeurs hépatiques chez les rats femelles traitées à l'HCB par rapport aux mâles traités et aux groupes témoins, mâles et femelles.

En 1993, le Gouvernement du Canada a placé l'HCB dans le groupe 1 de la Liste des substances d'intérêt prioritaires de la loi canadienne sur la protection de l'environnement (Priority Substances List of the Canadian Protection Act (Gouvernement du Canada, 1993). Au terme de son évaluation toxicologique dans ce cadre, on le classait comme étant un carcinogène probable chez l'humain. Trois recommandations furent alors faites, dont l'une demandait l'étude des mécanismes de cancérogenèse chimique due à l'HCB afin de vérifier leur pertinence chez l'humain.

Depuis quelques années, l'implication de la communication intercellulaire dans la cancérogenèse est un sujet en effervescence. Plusieurs études ont démontré que la communication entre les cellules était réduite dans les tumeurs et/ou lors du développement de tumeurs (Krutovskikh et al., 1994 ; Oyamada et al., 1990 ; résumé

dans Ruch, 1994 ; résumé dans Yamasaki et al. 1999 ; résumé dans Kanno, 1985). De plus, des études en laboratoires ont permis de démontrer que plusieurs promoteurs de tumeurs favorisaient la cancérogenèse en inhibant la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires (Bager et al., 1994 ; Nielsen et al., 2000 ; Budunova et al., 1996). Les jonctions lacunaires sont des pores aqueux reliant deux cellules et permettant le passage de petites molécules (moins de 1000 daltons) directement du cytoplasme d'une cellule vers le cytoplasme de la cellule adjacente. Parmi les molécules qui sont échangées via les jonctions lacunaires on retrouve les facteurs de croissance, les ions, l'AMPc et plusieurs autres régulateurs cellulaires. Les jonctions lacunaires sont composées de centaines, et parfois de milliers, de connexons (ou de pores intercellulaires). Les connexons sont formés de protéines transmembranaires appelées connexines.

Compte tenu de l'importance de la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires et des nombreuses études démontrant l'effet des promoteurs de tumeurs sur celle-ci, l'hypothèse de ce projet était que l'HCB favorisait le développement de tumeurs hépatiques chez le rat femelle en modulant la communication entre les cellules via les jonctions lacunaires, ce qui favorise la prolifération clonale des cellules initiées. **Notre objectif principal était de caractériser la susceptibilité des rats femelles au développement de tumeurs suite à une exposition à l'HCB.** Pour réaliser cet objectif nous avons regardé l'expression des connexines dans le foie des rats mâles et femelles, traités ou non à l'HCB. La régulation spécifique des connexines par les hormones sexuelles femelles de cette expression a été étudiée afin de vérifier son rôle dans la prédisposition des femelles au développement de tumeurs.

La première partie de ce mémoire comporte une revue de la littérature complète portant sur les grands sujets du projet, soit l'HCB, le cancer et les jonctions lacunaires qui en forment les trois sections. Ainsi, la première section se consacre en détails à l'HCB tant au niveau de sa structure, de ses effets sur la santé, de son utilisation et de la réglementation concernant son emploi. La deuxième section se veut un résumé de l'évolution des connaissances sur la cancérogenèse à travers un échantillon de travaux pertinents. Elle permet de mieux comprendre les différentes caractéristiques importantes des cellules cancéreuses et l'implication de la communication intercellulaire dans ce processus. Finalement, le dernier chapitre fera un tour d'horizon des connaissances sur

les jonctions lacunaires. Il sera alors question de leur formation, à partir des connexines jusqu'à leur dégradation, de leur régulation et de leur importance dans la cancérogenèse.

Ces trois sections démontreront la pertinence de ce projet de recherche dans la recherche de la compréhension de la cancérogenèse et de mécanismes moléculaires pour l'établissement des normes avant l'exposition à l'HCB. Elles mèneront à la formulation des hypothèses et des objectifs de notre recherche, qui figure à la troisième partie de ce mémoire.

La deuxième partie comprend les différentes méthodes utilisées lors de la recherche et les résultats obtenus au niveau de la compréhension de la cancérogenèse. Ces données sont compilées dans un article soumis au journal «Cancer Research».

Finalement, la dernière partie présente une discussion générale ainsi que des conclusions portant sur les résultats obtenus. Cette partie souligne également l'apport de ces résultats pour le milieu scientifique. Un annexe portant sur des travaux réalisés par l'auteur, mais ne faisant pas partie de l'article, est incluse à la fin du document.



## PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

### SECTION 1 : L'HEXACHLOROBENZÈNE

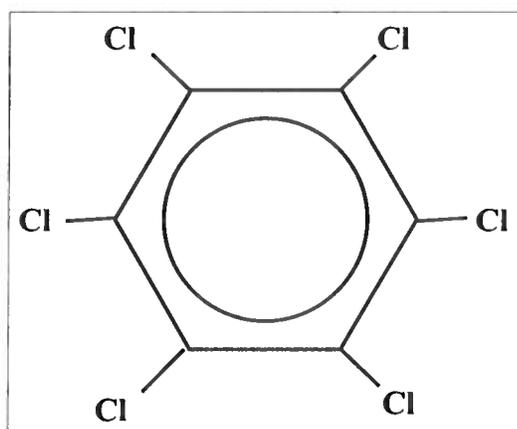
*« Tout ce que nous voyons n'est qu'une ombre projetée  
par les choses que nous ne voyons pas. »*

**Martin Luther King**

#### 1. L'hexachlorobenzène (HCB)

##### 1.1 Caractéristiques chimiques et différentes appellations

L'hexachlorobenzène est un hydrocarbure aromatique polyhalogéné de formule chimique  $C_6Cl_6$  (**Figure 1**). Il est aussi connu sous les appellations scientifiques perchlorobenzène, pentachlorophenyl chloride, phenyl perchloryl , et sous les noms commerciaux Amatin, Anticarie, Bunt Cure, Bunt-No-Moer, Co-op Hexa, Granox NM, Hexa C.B., Julin's Carbon Chloride, No Bunt, No Bunt 40, No Bunt 80, No Bunt Liquid, Sanocide, Smut-Go et Sneciotox. On le retrouve sous forme cristalline à température ambiante, mais il est aussi disponible sous forme de poudre hydrofuge, liquide ou de granule (Gouvernement du Canada, 1993).



**Figure 1 : Structure chimique de l'hexachlorobenzène.**

La molécule d'HCB est composée d'un anneau benzène (aromatique) portant un atome de chlore sur chacun de ses atomes de carbone ( $C_6Cl_6$ ).

L'HCB possède un poids moléculaire de 284,79g et une densité de 1,5691 g/cm<sup>3</sup> à 20°C. Il est peu soluble dans l'eau (The Merk Index). C'est un produit bio-accumulable, étant peu dégradé par les processus physiques ou chimiques environnementaux normaux.

## **1.2 Utilisation et distribution de l'hexachlorobenzène**

### **1.2.1 Période d'utilisation**

Au Canada, l'HCB a été introduit dans les années 40. Le premier enregistrement de produits contenant de l'HCB pour utilisation commerciale remonte à 1948. Entre 1948 et 1972, 17 fongicides différents contenaient jusqu'à 80% d'HCB (Tuttle 1979).

Suite à des préoccupations pour l'environnement et la santé humaine, notamment plusieurs cas de porphyries, le gouvernement du Canada a décidé de le bannir en 1973. Il en est de même pour plusieurs autres pays industrialisés. Depuis 1980, l'HCB n'a plus été produit de façon directe, ni utilisé comme produit commercial au Canada.

### **1.2.2 Sources d'émission de l'hexachlorobenzène**

L'HCB a majoritairement été utilisé comme fongicide sous forme de poudre. Les producteurs en aspergeaient les grains de blé, d'avoine, d'orge et de seigle pour les protéger de la moisissure lors de l'entreposage et du transport. Il était également utilisé pour la préservation du bois.

De nos jours, l'utilisation directe de l'HCB est interdite. Cependant, quelques utilisations indirectes ont été dénombrées. Par exemple, l'HCB est utilisé dans l'art pyrotechnique ainsi que dans la fabrication de fusées de détresse. Dans les manufactures, il sert d'agent de contrôle pour les anodes en graphite et dans la synthèse de caoutchouc pour pneus (Mumma et Lawless, 1975; Christensen et al., 1989).

De plus, il est encore produit lors de la synthèse d'autres pesticides, ou présent dans ceux-ci sous forme de contaminants, de la synthèse de solvants chlorés ou rejetés dans les déchets des industries. L'incinération de ces déchets peut être une autre source d'émission d'HCB par la combinaison post-combustion de différents produits. Si ces déchets sont enfouis, l'HCB devient un polluant du sol et éventuellement de la nappe phréatique (Jacoff et al., 1986).

### **1.2.3 Distribution environnementale de l'hexachlorobenzène**

L'HCB est largement présent dans l'environnement partout sur la planète. Il est détecté dans l'eau, le sol, les sédiments, les précipitations et dans les tissus humains et animaux. Sa grande répartition vient surtout de sa résistance à la dégradation par les processus normaux. Dans le milieu marin, l'HCB s'accumule principalement dans les sédiments où il est bio-disponible aux organismes benthiques. Il peut aussi se retrouver à la surface de l'eau où il se volatilise facilement vers l'air. Au niveau du sol, l'HCB est plutôt immobile. Par contre, de petites quantités peuvent être retirées par l'eau de ruissellement, d'où il sera évaporé, ou encore, il peut s'évaporer directement à partir de la surface du sol. Dans l'air ambiant, sa répartition est plutôt uniforme; l'HCB subit une longue réaction de photolyse, est transporté ou retiré de la phase aérienne par déposition atmosphérique. On ne dénote pas de «foyers» d'accumulation au niveau des villes ou des lieux d'émission (résumé dans Gouvernement du Canada, 1993)

### **1.2.4 Dose journalière d'exposition de la population**

L'HCB s'accumule principalement dans les graisses. Quelques études démontrent sa présence dans les tissus humains et/ou animaux. Herrero et al. (1999) ont identifié l'HCB dans le sérum de 604 habitants de Flix, un village d'Espagne, situé près d'une usine émettant de l'HCB dans l'air. Parmi ceux-ci, 185 étaient de travailleurs de l'usine. Des niveaux entre 1,1 à 1616,0 ng d'HCB/ml de sérum ont observés, les plus élevés provenant généralement des travailleurs. Brady et Siyali (1972) ont été les premiers à retrouver de l'HCB dans les tissus adipeux de la population australienne : des 75 échantillons de tissus adipeux provenant d'autopsie, 100% contenaient de l'HCB, allant de l'état de traces jusqu'à 25 ppm. Au Canada, Williams et al. (1989) ont détecté de l'HCB chez tous les individus testés provenant de la région des Grands Lacs Canadiens. Dans la chaîne alimentaire, l'HCB est présent à tous les niveaux, tant chez les organismes marins que terrestres (résumé dans Gouvernement du Canada, 1993).

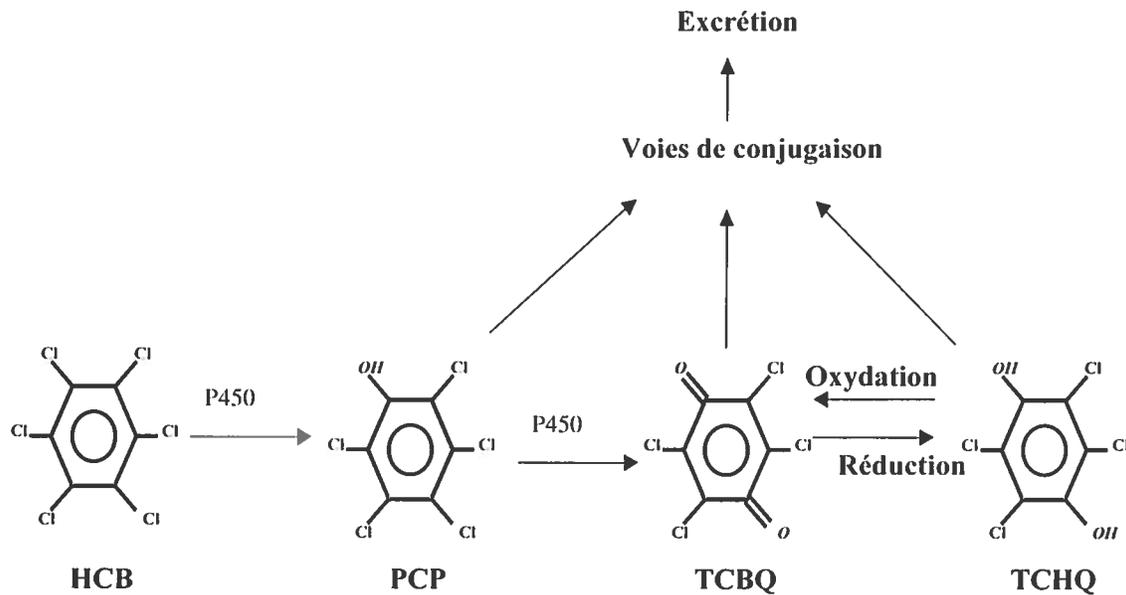
Pour un Canadien moyen (70 kg) la dose journalière d'exposition via l'air, l'eau, le sol et la nourriture est estimé à 6,2 ng/kg de poids. Cette dose tend à diminuer avec l'âge, étant estimée à 210 ng/kg pour un enfant de 0 à 6 mois. Newhook et Meek (1994), responsables de cette étude, en sont venus à la conclusion que la consommation était plus

grande chez certains Canadiens que la dose journalière tolérable estimée sur la base de l'induction enzymatique ou de la porphyrie, sans considération pour la cancérogénèse. Cette étude démontre bien la pertinence de trouver des marqueurs basés sur des mécanismes épigénétiques de l'action de l'HCB.

### 1.3 Métabolisme de l'hexachlorobenzène

Le métabolisme de tous les benzènes chlorés est généralement similaire. Pour les composés de cette famille, plus particulièrement ceux ayant un grand nombre de substitués tels les tétra-, les penta- et les hexabenzènes, la bio-transformation est lente due, en partie, à sa grande bio-accumulation dans les graisses et autres tissus. Une bonne partie de ces composés est excrétée tel quel dans les fèces et lors de l'expiration. Une autre partie sera excrétée sous forme de métabolites ou emmagasinée dans les graisses (den Besten, 1992).

Même si les grandes voies métaboliques sont relativement bien connues et sont semblables à celles des autres produits, le métabolisme de l'HCB n'est pas totalement élucidé (**Figure 2**). Il existe trois voies majeures (den Besten, 1992; Gouvernement du Canada, 1993; Koss et al. 1976 et 1978; Van Ommen et Van Bladeren, 1989). La voie oxydative (catalysée, en partie par le cytochrome P450) mène à la formation de métabolites phénoliques (pentachlorophénol (PCP), tétrachlorohydroquinone (TCHQ)...). L'HCB peut aussi être excrété via la voie de conjugaison au glutathion, pour former du mercaptotétrachlorophénol (MTCP), du pentachlorothiophénol (PCTP), des pentachlorothioanisoles ou d'autres composés sulfurés comme *N*-acétyl-*S*-(pentachlorophenyl)-cysteine (PCP-NAC). Finalement, la dernière voie, moins importante, est celle de la déchlorination réductive, menant à la formation de benzènes moins chlorés.



**Figure 2 : Voies métaboliques de l'hexachlorobenzène.**

Formation des différents métabolites par le cytochrome P450 et par les voies d'oxydation et de conjugaison. Le cytochrome P450 (P450) est impliquée dans l'oxydation de l'HCB et du PCP. HCB : hexachlorobenzène, PCP : pentachlorophénol, TCBQ : tetrachlorobenzoquinone, TCHQ : tetrachlorohydroquinone.

\* figure inspirée de den Besten, 1992.

Les processus de métabolisme de l'HCB prennent place, en majeure partie, dans le foie. Plusieurs intermédiaires sont ainsi présents et peuvent avoir des effets néfastes pour les tissus. La toxicité du HCB est vraisemblablement due à ses métabolites, comme il a été démontré pour plusieurs autres composés liposolubles (résumé dans van Ommen et van Bladeren, 1989).

L'HCB excrété est présent sous différentes formes. Koss et al. (1976) ont démontré qu'environ 34% de l'HCB injecté à des rats Wistar femelles se retrouvait dans l'urine et dans les fèces 28 jours après l'injection. Dans l'urine, sur les 7% retrouvés, moins de 10 % étaient retrouvés sous forme inchangée, la majorité de la dose étant excrétée sous forme de PCP, de TCHQ, de PCTP, et un faible pourcentage sous forme de tetrachlorothiophénol (TCTP). Dans les fèces, des 27% retrouvés, 70% étaient sous

forme inchangée et 30% sous forme de PCP ou de PCTP. Selon les différentes espèces, la majorité des études concluent qu'entre 20% et 40% de l'HCB se retrouvent dans les fèces et qu'un pourcentage beaucoup plus faible est excrété dans l'urine. Le PCP, le TCHQ et le PCTP demeurent généralement les trois principaux métabolites qui sont retrouvés dans l'urine des différentes espèces exposées à l'HCB (résumé dans Gouvernement du Canada, 1993). Le lait maternel représente aussi une voie d'excrétion importante pour la mère. Courtney et Andrews (1985), ont démontré que 95% de l'HCB emmagasiné dans les graisses de souris allaitantes était transmis à leurs petits en 20 jours seulement. En utilisant des furets européens femelles, Bleavins et al. (1982) ont également déterminé que les femelles allaitantes avaient des concentrations moins élevées d'HCB dans leurs tissus adipeux que les femelles non gestantes et/ou allaitantes. Cette différence était due au transfert d'HCB *in utero* et via le lait maternel de l'HCB de la mère aux petits. Chez l'humain, Ando et al. (1985) ont étudié les concentrations d'HCB dans le sang de trente-six femmes enceintes, au septième mois de la grossesse. En comparant avec les concentrations retrouvées dans le sang, le placenta, le lait et le sang du cordon ombilical une semaine après l'accouchement, ils ont été en mesure de déterminer que l'HCB se transmet de la mère au fœtus.

Finalement, des études pharmacodynamiques ont démontré que l'élimination de l'HCB est un phénomène biphasique, comportant une phase rapide de clairance et une phase lente par la suite. La cinétique suit un modèle à trois compartiments comprenant un réservoir central et deux compartiments périphériques dans lesquels la distribution est lente ou rapide.

#### **1.4 Effets de l'hexachlorobenzène sur la santé**

Plusieurs études ont été réalisées en laboratoire pour déterminer les effets associés à une exposition à l'HCB. Les doses utilisées, les voies d'exposition et les périodes d'exposition varient beaucoup d'une étude à l'autre (doses entre 5 mg/kg/jour et 1300 mg/kg/jour, pendant 6 à 12 semaines, chaque jour ou aux deux jours) (résumé dans Krishnan et al., 1991), ce qui mène à une panoplie de symptômes chez les animaux traités. La majorité de ces expériences ont toutefois été réalisées chez le rat (Grant et al.,

1977 ; Cabral et al., 1979 ; Leoni et al., 1977 ; Rozman et al., 1986 ; van Raaij et al., 1991 et 1993 ; de Pisarev et al., 1995 et 1989 ; Alvarez et al., 2000) .

Aux plus fortes doses (exposition aiguë), une seule dose élevée (entre 100 et 1000 mg/kg de poids corporel) d'HCB peut induire des convulsions, des tremblements, de l'ataxie, de la paralysie, des changements pathologiques au niveau des organes et peut même entraîner la mort. Strik (1986) a démontré une augmentation de l'activité enzymatique en dedans de 24 heures chez des rats traités avec une seule dose d'HCB

Plusieurs doses élevées répétées dans un court laps de temps auront des effets semblables : effets pathologiques sévères, changements neurologiques, effets sur le système immunitaire. À des doses moins élevées, les effets sont quelque peu différents. Une baisse du poids corporel, des lésions cutanées, des problèmes neurologiques moins sévères, de l'hépatomégalie, des changements de l'activité enzymatique, des problèmes hépatiques et reproducteurs, ainsi que des effets sur la thyroïde sont parmi les effets observés.

Les études sous-chroniques (à long-terme avec des doses répétées) ou chroniques (continue) ont généralement des effets semblables à une exposition à court terme avec doses répétées. Cependant, les quantités administrées à chaque dose peuvent être moins élevées pour obtenir les mêmes résultats, probablement en raison de l'accumulation de l'HCB dans les tissus.

Contrairement à toutes les études chez le rat, il existe peu d'études démontrant un effet direct de l'HCB sur la santé humaine. La plupart d'entre elles concerne la porphyrie et le métabolisme de l'HCB. Récemment, Sala et al. (2001) ont cependant démontré une association entre la concentration d'HCB dans le sérum et une baisse des quantités d'hormones thyroïdiennes ( $T_4$ ) et une augmentation de l'activité enzymatique du foie (GGT). Plusieurs études démontrent l'exposition générale de la population, mais peu d'entre-elles en étudient les conséquences.

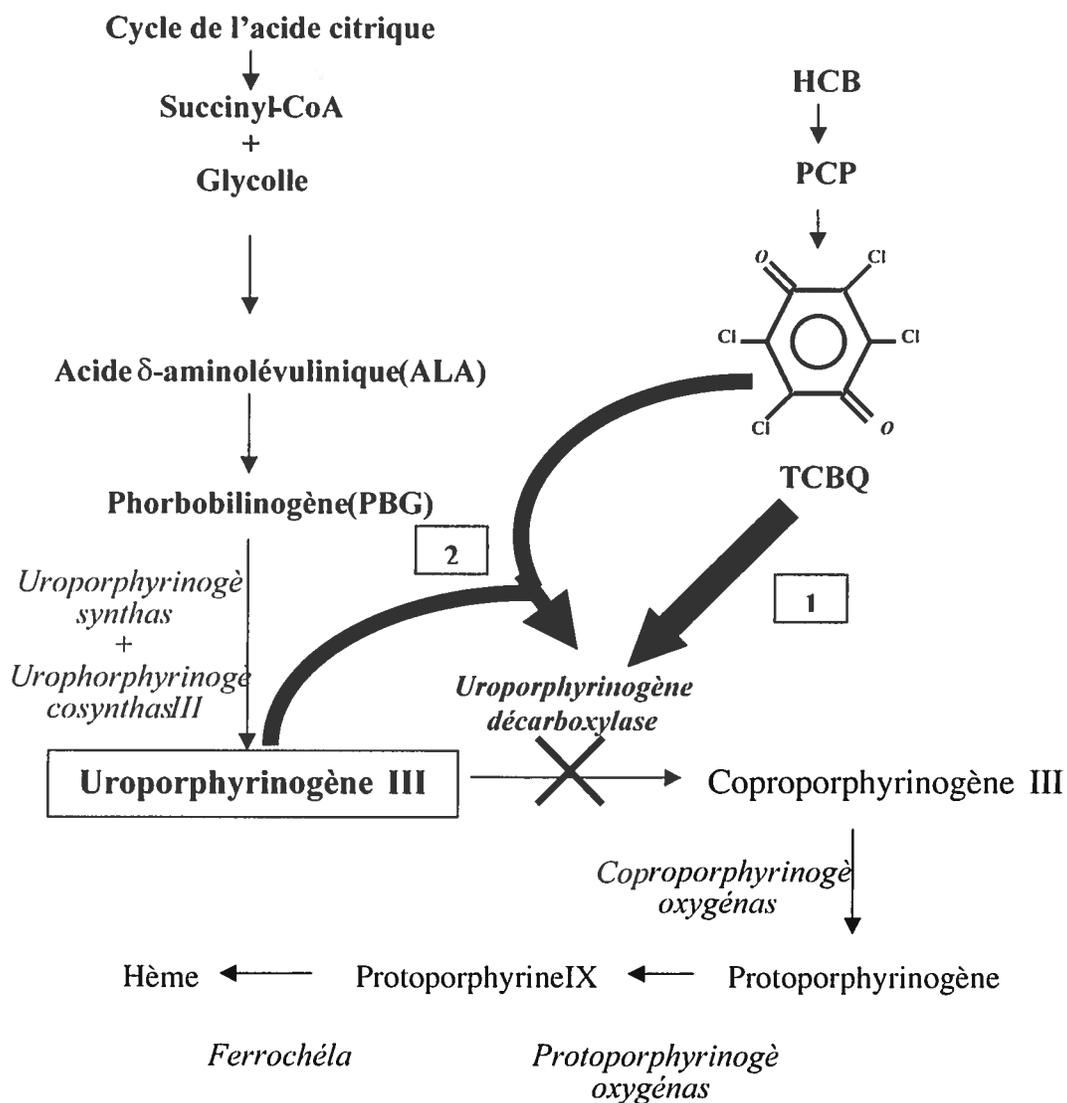
Les deux effets les plus importants de l'exposition à l'HCB, soit la porphyrie et la cancérogenèse, sont au niveau du foie. Ces deux problèmes ont généré une littérature importante au cours des dernières années. Les prochains paragraphes résument l'essentiel de ces nombreuses études.

## 1.4.1 Porphyrie

### 1.4.1.1 Études en laboratoire

La porphyrie est caractérisée par une anomalie au niveau de la formation de l'hème, résultant en une accumulation dans le foie et en une excrétion massive de porphyrines fortement carboxylées dans l'urine. Le rôle de l'HCB dans la porphyrie est encore mal connu, malgré les nombreuses études des dernières années. Cependant, Elder et al. (1976), ont proposé un mécanisme par lequel l'uroporphyrinogène décarboxylase (URO-D) serait irréversiblement inactivée par un des métabolites de l'HCB provenant vraisemblablement de la voie oxydative (Debets et al., 1980; Carpenter et al., 1985; Van Ommen et al., 1989), ce qui mènerait à l'accumulation des porphyrines (**Figure 3**). Récemment, De Catabbi et al. (2000) ont confirmé le caractère irréversible de la porphyrie en étudiant des changements au niveau du métabolisme de l'hème.

Une hypothèse alternative veut que l'inhibition de l'URO-D repose sur la présence d'un inhibiteur soluble. Ce dernier provient d'une modification oxydative de l'Uroporphyrinogène III. La TCBQ pourrait participer à la formation de ce substrat oxydé qui, par mimétisme, se lierait irréversiblement au site actif et inhiberait l'enzyme (Mylchreest et Charbonneau, 1997).



**Figure 3 : Mécanisme de la porphyrie hépatique.**

La porphyrie est caractérisée par une accumulation abondante dans le foie et dans l'urine de porphyrines (uroporphyrinogène) due à un blocage dans la formation de l'hème. Selon le mécanisme proposé par Elder et al. (1976) (1), la tétrachlorohydroquinone (TCBQ), produite à partir de l'HCB (voir figure 2), se fixerait à l'uroporphyrinogène décarboxylase et l'inhibe. Cette enzyme synthétise le coproporphyrinogène III à partir de l'uroporphyrinogène III. Suite à son inactivation, le coproporphyrinogène n'est plus produit et l'uroporphyrinogène s'accumule. La théorie de la liaison irréversible d'un facteur soluble à l'Uroporphyrinogène III proposée par Mylchreest et al. (1997) est aussi représentée (2).

Un aspect intéressant de la porphyrie chez le rat est sa spécificité vis-à-vis le sexe de l'animal. En effet, lorsque des rats sont exposés à l'HCB, seulement les femelles développent une porphyrie (Lambrecht et al., 1986; Krishnan et al., 1991). Ces résultats démontraient un rôle potentiel des hormones sexuelles dans les mécanismes de porphyrie. Grant et al. (1975) ont démontré que l'ovariectomie diminue la quantité de porphyrines retrouvées dans l'urine de femelles traitées à l'HCB comparativement aux femelles intactes. De plus, Smith et Francis (1981), de même que Legault et al. (1997), ont démontré une augmentation de la porphyrie chez des rats mâles injectés avec du DES (composé estrogénique) et des femelles ovariectomisées traitées à l'estradiol, par rapport à respectivement les mâles et les femelles ovariectomisées. Un rôle «protecteur» de la testostérone chez les mâles n'est pas exclu non plus. En effet, Grant et al. (1975) ont démontré que l'orchidectomie augmente la quantité de porphyrines retrouvées dans le foie. Rizzardini et Smith (1982) ont, quant à eux, observé que les niveaux d'excrétion biliaire de PCTP sont plus importants chez les mâles que chez les femelles, mais plus importants dans l'urine et en quantité totale chez les femelles. Comme le PCTP provient de l'hydrolyse chimique du *N*-acétyl-*S*-(pentachlorophenyl)-cystéine, provenant lui-même de la conjugaison de l'HCB au glutathion (GSH), un rôle potentiel du GSH dans la spécificité sexuelle de la réponse est envisageable. D'Amour et Charbonneau (1992) ont proposé une conjugaison plus importante de l'HCB au GSH chez les mâles comparativement aux femelles. Comme la conjugaison au GSH est considérée comme une voie de détoxification et que la voie oxydative serait responsable des effets porphyriques de l'HCB, la plus faible conjugaison d'HCB au GSH chez les femelles rend vraisemblablement l'HCB plus bio-disponible pour la voie oxydative. Il s'en suivra une plus grande formation de TCHQ chez les femelles, ce qui pourrait expliquer leur susceptibilité au développement de la porphyrie.

#### 1.4.1.2 Cas Humains

L'exposition à l'HCB chez le rat mène à des symptômes semblables à ceux de la *porphyria cutanea tarda* (PCT) chez l'humain (Cam, 1959; Dogramaci, 1959). Alors qu'une déficiente génétique en UROD est responsable de cette maladie, la porphyrie induite par l'HCB résulte aussi d'une baisse en UROD et se traduit également en une

accumulation d'uroporphyrines et d'hépatocoxylporphyrines. La PCT est la porphyrie la plus commune chez l'humain. La maladie peut être diagnostiquée par ses manifestations cliniques (coloration cutanée), mais elle existe aussi sous forme asymptomatique où elle peut être décelée par une excrétion caractéristique de porphyrines dans l'urine.

La première et la principale évidence de porphyrie induite chez l'humain provient de la contamination à l'HCB en Turquie (Peters et al., 1987). Dans les années 1955 à 1959, une partie de la population s'est nourrie à partir de pains faits avec des grains traités à l'HCB. Entre 3000 et 4000 personnes, majoritairement des enfants, ont développé une porphyrie semblable à la PCT. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur la quantité d'HCB présente dans les tissus et le sang de ces personnes. Un suivi à long terme a eu lieu pour la porphyrie, mais malheureusement des raisons politiques ont empêché des études à long terme pour évaluer les risques de développement de tumeurs hépatiques suite à une telle exposition.

## **1.4.2 Hépatocarcérogénèse**

### **1.4.2.1 Études en laboratoire**

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer la capacité de l'HCB à induire l'hépatocarcérogénèse. Ces expériences ont démontré qu'il est cancérigène chez plusieurs espèces dont le rat (Arnold et al., 1985), la souris (Cabral et al., 1979) et le hamster (Cabral et al., 1977). De plus, plusieurs études ont permis de démontrer que tout comme pour la porphyrie, il existe un dimorphisme sexuel dans la réponse à l'HCB. En effet, Smith et Cabral (1980), Lambrecht et al. (1983), Smith et al (1985), Pereira et al. (1982) et Charbonneau et al (1999) ont tous observé une plus grande susceptibilité au développement de tumeurs hépatiques chez les femelles exposées à l'HCB que chez les mâles. Dans toutes ces expériences, les rats non traités n'étaient pas affectés.

En effet, il a été démontré que l'HCB est un carcinogène épigénétique. C'est-à-dire qu'il n'interagit pas directement avec l'ADN pour causer l'hépatocarcérogénèse comme le ferait un composé mutagénique. Siekel et al (1991), Gorski et al. (1986) ont tous deux démontré que l'HCB n'induit pas de mutations au niveau de l'ADN. Il prédispose les rats femelles au développement de tumeurs hépatiques en modulant

l'expression de certains gènes, créant un micro-environnement favorable au développement de tumeurs hépatiques. Le mécanisme par lequel l'HCB prédispose les femelles au développement de tumeurs fait l'objet de ce mémoire.

#### **1.4.2.2 Cas humain**

L'évidence d'hépatocarcinogénèse chez l'humain repose uniquement sur les travaux de Selden et al (1989) qui rapportent le cas d'un travailleur exposé à l'HCB. Chez ce patient, une tumeur a été diagnostiquée sur le lobe droit du foie. Dans le cadre de son emploi, le patient était exposé à des vapeurs contenant majoritairement de l'HCB ainsi que d'autres composés chlorés. Les auteurs suggèrent que le carcinome hépatocellulaire était probablement causé par les émanations en HCB provenant des cuves servant à fondre des métaux.

### **1.5 Politiques du Gouvernement Canadien concernant l'hexachlorobenzène**

#### **1.5.1 Diverses classifications de l'hexachlorobenzène**

Il est internationalement reconnu que l'HCB représente un risque pour la santé humaine. L'Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC), par exemple, a classé l'HCB dans le groupe 2B des carcinogènes (possiblement carcinogénique pour l'humain). Cette classification est basée sur les évidences des effets carcinogènes de l'HCB chez les animaux, et sur le manque de données concernant les humains (IARC, 1987). La classification «probablement carcinogénique pour l'humain» a été donnée à l'HCB par l'Agence américaine de protection environnementale (U.S. Environmental Protection Agency). Quant au Gouvernement Canadien, le Conseil canadien du Ministère des ressources et de l'environnement a recommandé que la concentration d'HCB ne dépasse pas 6,5 ng/L afin de préserver la vie aquatique dans les eaux douces (CCREM, 1987).

#### **1.5.2 Classification de l'hexachlorobenzène dans la liste des substances prioritaires canadienne**

Suite à la croissance rapide du nombre d'études démontrant les effets néfastes des polluants sur l'environnement et sur la santé humaine, le Gouvernement du Canada a

mandaté différentes études portant sur les substances potentiellement à risque. Cette mission a donné naissance en 1993 à la Liste des substances prioritaires pour les évaluations de risques (Gouvernement du Canada, 1993). L'HCB a été classé dans le groupe I de cette liste comme étant toxique et une estimation préliminaire du risque a été faite.

### **1.5.3 Recommandations du gouvernement concernant l'étude de l'hexachlorobenzène**

La dose journalière tolérée (TDI, Tolerable Daily Intake) est la quantité maximale d'une substance à laquelle un être humain moyen peut être exposé par jour, sans qu'il n'y ait de conséquences pour sa santé. Cette dose est calculée à partir de données expérimentales. Pour l'HCB, la majorité des études concernent, comme nous l'avons vu précédemment, la porphyrie; ces études ont permis de calculer un TDI.

Le risque de cancérogenèse causé par l'HCB a, en raison d'une absence de données mécanistiques, été calculé à partir d'une régression de l'incidence des tumeurs par rapport à la dose d'exposition chez les rats, donc d'une approche pour un cancérogène génotoxique. Pour une substance épigénétique, tel que l'HCB, une valeur de TDI est acceptable lorsque basée sur un critère mécanistique relatif à la promotion. Les concepts actuels suggèrent que la TDI pour le risque de cancérogenèse sera supérieure si elle repose sur une approche épigénétique.

Dans le rapport sur les substances prioritaires du Gouvernement canadien (Gouvernement du Canada, 1993), trois recommandations ont été faites, dont l'une stipulait que :

«Dans le but de vérifier si la formation de néoplasmes observée lors d'exposition animale à l'HCB se présente aussi chez l'humain, des données supplémentaires sur les mécanismes d'induction par l'HCB de ces tumeurs chez les espèces animales seraient souhaitables» (traduit de l'anglais; Priority Substances List of the Canadian Protection Act (Gouvernement du Canada, 1993), page 31 ).

Le présent mémoire a pour but d'étudier ces mécanismes. En démontrant comment les tumeurs hépatiques sont formées lors d'une exposition à l'HCB, il sera

possible de déterminer une meilleure valeur de TDI, basée sur une courbe dose-réponse de ce mécanisme en fonction de la dose d'HCB administré. Afin de déterminer les bases possibles de ces mécanismes, une bonne compréhension de la cancérogenèse hépatique est nécessaire.

## SECTION 2 : LA CANCÉROGENÈSE

*«... a comprehensive and penetrating understanding of molecular and biological nature of cancer is very near at hand, so near that when we look back 4 or 5 years from now it may be difficult to say exactly which discoveries were most important in gaining this understanding. Later perhaps a clearer perspective will be gained. But I must caution you that understanding is not synonymous with conquering the disease.»*

**Professor Van Rensselaer Potter**

### 2. La cancérogenèse

Au fil des années, plusieurs études ont tenté de comprendre ce phénomène complexe qu'est le cancer. Il s'en est suivi une multitude de théories concernant les mécanismes et les caractéristiques de la cancérogenèse. Elles se regroupent facilement dans une seule grande théorie, dont il sera question dans la dernière section de cette deuxième partie du mémoire. Pour bien comprendre comment les scientifiques sont arrivés à ces conclusions, un survol rapide des toutes premières théories sur la cancérogenèse s'impose pour comprendre l'évolution des connaissances.

#### 2.1 La théorie des cellules souches et la théorie de la dé-différentiation

Deux des toutes premières théories sur le cancer proviennent de l'origine des organismes multicellulaires elle-même. Lors de l'évolution, les organismes pluricellulaires ont dû spécialiser certaines cellules afin de pouvoir accomplir toutes les tâches vitales à leur survie. Il fut donc nécessaire d'élaborer un mécanisme permettant la différenciation de cellules à partir des gamètes, provenant des parents. Les cellules souches sont ces cellules qui peuvent donner naissance à toutes ces cellules spécialisées (toti-potentes) ou à certains types de cellules (pluri-potentes). Les cellules pluri-potentes proviennent des cellules toti-potentes, et engendreront elles-mêmes les cellules progénitrices. Ces dernières ne peuvent donner naissance qu'à un seul type cellulaire, des cellules totalement différenciées. Il existe également un concept qui évolue de façon inverse. En effet, plus la cellule se différencie, plus elle perd la capacité de se reproduire. Les cellules totalement différenciées ne pourront plus proliférer, elles seront donc «mortelles» et elles iront éventuellement vers l'apoptose (l'apoptose est définie comme

un processus génétique et actif d'auto-destruction d'une cellule (Schulte-Hermann et al., 1995) ou mort cellulaire programmée).

Une des caractéristiques bien connues des cellules cancéreuses est leur immortalité. Contrairement aux cellules différenciées, les cellules cancéreuses ont également la capacité de se diviser. Il a été démontré que plus la tumeur est dans un stade avancé, plus l'indice de prolifération (taux mitotique ou marquage à la thymidine ou incorporation du BrdU) est élevé (Steel, 1977). Ainsi, l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est une capacité de prolifération et/ou une perte de différenciation.

De ces constatations sont nées deux théories sur l'origine des tumeurs. La première affirme que la tumeur peut se développer par l'avènement d'une mutation au niveau d'une cellule différenciée qui lui permettra de se diviser et de proliférer (Buick et Pollack, 1984). Cette théorie est celle de la «dé-différenciation». La deuxième est celle des cellules souches. Selon cette théorie, la ou les mutations auraient lieu au niveau des cellules souches de certains tissus. Ces mutations amèneraient une perte de contrôle des fonctions des cellules souches, du renouvellement des cellules du tissu et de leur différenciation cellulaire (Buick et Pollack, 1984). Les cellules cancéreuses présenteraient donc des caractéristiques des cellules souches (capacité à se différencier) et feraient l'acquisition de caractéristiques de cellules différenciées.

De ces deux premières théories, une troisième a émergé. Elle se base principalement sur le phénomène de dé-différenciation, mais elle inclue aussi les principes de la théorie des cellules souches.

## **2.2 La théorie de l'oncologie venant d'une ontologie bloquée**

Cette théorie a été suggérée par Potter par une phrase simple : «oncogeny is blocked ontogeny (l'oncologie est un blocage de l'ontologie, Potter 1968). Potter voyait lui aussi le cancer comme n'étant pas seulement un problème de prolifération, mais surtout un problème de différenciation (Potter, 1978).

Cette théorie soutient que le cancer débute lors de la différenciation des cellules souches vers les cellules spécialisées. Il se passe alors un blocage dans le programme normal de l'ontogénie, à cause d'un ou des changements au niveau des chromosomes ou de l'ADN extra-chromosomal chez une cellule, qui dérive en un clone néoplastique. Ce

blochage peut se produire à tout moment entre la première division de la cellule et le stade terminal de la différenciation. Il y a de nombreuses étapes lors de la différenciation avant le stade final qui, si elles sont bloquées, permettront à la cellule de re-entrer dans le cycle de prolifération et de se diviser de façon clonale, ce qui mènera au développement d'une tumeur. Les cellules présenteront alors les caractéristiques du stade où le blocage a eu lieu, à mi-chemin entre la cellule souche et la cellule différenciée.

Bien que ces trois théories puissent expliquer plusieurs phénomènes reliés aux cellules cancéreuses, les mécanismes du cancer demeurent inexpliqués. Les théories n'étant pas complètes en elles-mêmes, les recherches ont continué afin de mieux comprendre le cancer. De ces études, d'autres théories et caractéristiques ont émergé.

### **2.3 La théorie «nature versus nurture»**

L'association entre les mutations et le cancer est étudiée depuis des années. Il est généralement admis que des mutations sont à l'origine de la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant, pendant plusieurs années, il y a eu un grand débat sur l'origine de ces mutations. Pour certains, l'environnement était responsable de tous les cancers. Les produits présents dans l'environnement causaient des mutations dans des gènes importants menant au cancer (gènes pour la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire, pour l'apoptose). C'était la vision «nurture» du cancer (vision selon laquelle les mutations présentes dans la cellule étaient causées par les agresseurs de l'environnement). Pour d'autres, les cancers étaient hérités de mutations au niveau des chromosomes et pouvaient prédisposer certains individus au développement de tumeurs. Cette vision était nommée «nature» (vision selon laquelle les mutations étaient propres à l'individu et étaient héréditaires).

Cependant, certains individus et/ou types de cancers ne respectaient pas ces règles. Il existait des cas d'individus ayant hérité de mutations au niveau de gènes importants, mais qui ne développaient jamais de tumeurs (Lynch et al., 1977). De plus, certaines personnes exposées à des conditions ou à des substances mutagènes ne développaient pas de cancers. Peu à peu, l'idée que ces deux théories pouvaient être dépendantes l'une de l'autre a germé. Le cancer est maintenant perçu comme un phénomène provenant à la fois de l'hérédité et de l'environnement. Comme tous les

phénotypes humains sont le résultat du génotype et des facteurs environnementaux menant à leur développement, le cancer est la conséquence de l'interaction entre un certain héritage génétique et des agents environnementaux propices à certaines périodes critiques (Trosko et Chang, 1978). Ainsi, un individu peut hériter de mutations (nature) ou être exposé à certains agent mutagénique (nurture) qui causeront des mutations, et qui ne se développeront en tumeurs qu'en présence de certaines conditions. Il restait maintenant à comprendre quelles étaient ces «conditions favorables» et comment elles influençaient le développement de tumeurs.

#### **2.4 La cancérogène génotoxique versus épigénétique**

Suite aux études sur les différents cancers, il est apparu que les agents favorisant le cancer pouvaient agir à deux niveaux soit, ils influençaient le développement de la tumeur en agissant directement sur l'ADN en causant des mutations, soit ils contribuait au développement de conditions favorables au développement du cancer. Par la suite, les agents cancérogènes furent regroupés en deux classes distinctes.

##### **2.4.1 Les carcinogènes mutagéniques**

Les carcinogènes mutagéniques sont des substances qui causent des mutations directement au niveau de l'ADN. Ils altèrent l'information génétique de la ou des cellules cibles. Le bromure d'éthidium, le diéthylnitrosamine, les radiations ultra-violet, l'uréthane et plusieurs substances méthylées sont parmi ces produits (Amdur et al., 1991 ; Sasaki et al., 2000 ; Pitot, 1993).

##### **2.4.2 Les carcinogènes épigénétiques**

Les carcinogènes épigénétiques ne causent pas de mutations au niveau de l'ADN. Ces substances iront plutôt altérer l'expression de certains gènes qui eux pourront moduler la prolifération cellulaire, l'organisation cellulaire, les interrelations cellulaires et la mort cellulaire. Ces produits sont souvent considérés comme des promoteurs de la cancérogène (point 2.6.2). Le phénobarbital, les BPC, les hydroxytoluènes butylés, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et plusieurs autres polluants sont parmi ces

produits (Bager et al., 1994 ; Kolaja et al., 2000 ; Kitchin et Brown, 1988 ; Amdur et al., 1991).

Qu'ils soient génétiques ou épigénétiques, les cancers peuvent cependant être aussi bien héréditaires (provenir d'une mutation transmise par les allèles des parents) que spontanés (provenir d'une mutation due à une exposition à un agresseur).

## 2.5 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

La découverte des oncogènes est liée à l'étude de la cancérogenèse *in vitro*. Plusieurs études ont démontré que lorsque injectées dans des cellules non cancéreuses, certaines séquences spécifiques d'ADN rendaient ces cellules néoplasiques. Ces séquences d'ADN ont été appelées oncogènes. Par la suite, il est apparu que ces oncogènes étaient en fait des «versions» mutées, ou activées, des proto-oncogènes, gènes codant pour des protéines importantes du contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose. Les proto-oncogènes sont classés en quatre groupes différents : (1) les facteurs de croissance; (2) les récepteurs de facteurs de croissance; (3) les protéines de signaux de transduction cellulaire; ou (4) les facteurs de transcription nucléaire.

Les gènes suppresseurs de tumeurs, tel que leur nom l'indique, sont des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire et empêchent une prolifération anarchique. Ils font le contraire biologique des oncogènes : ils suppriment la croissance cellulaire et aident à la différenciation et à l'apoptose. Utilisant des études *in vitro*, il a été démontré que l'injection de gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules cancéreuses peut renverser le processus de cancérogenèse. Les suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes font le lien entre la régulation et l'inhibition du contrôle de la croissance cellulaire.

Lorsqu'un oncogène est activé ou qu'un gène suppresseur de tumeurs est inactivé, il y aura une perte de contrôle au niveau de la prolifération, de la différenciation cellulaire ou de l'apoptose. La cellule contenant une telle mutation ressemblera donc à une cellule souche, n'étant pas totalement différenciée, mais pouvant proliférer (Trosko et Ruch, 1998). Elle pourra ainsi se diviser de façon clonale et mener à la formation d'une tumeur.

Au cours des années, plusieurs oncogènes ont été associés à la cancérogenèse. Parmi ceux-ci, *c-myc*, un facteur de transcription, participe au contrôle de la prolifération

cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Une surexpression de cet oncogène a souvent été observée dans les tumeurs (Cole, 1986 ; Kelly et Siebenlist, 1986). *Ha-ras*, la version mutée de p21<sup>ras</sup> a démontré une activité anti-apoptotique, ce qui favorise la croissance d'une tumeur par son immortalité (Frey et al., 2000). Une sur-expression des proto-oncogène *c-fos*, *c-jun* et *c-myc* a été associé à une augmentation de la prolifération dans le foie (Saeter et Selgen, 1990; Fausto et Webber, 1993). Ces oncogènes ont un effet direct sur le contrôle de la cellule et mènent à la formation de tumeur. Par contre, d'autres peuvent avoir une influence lorsque la tumeur est formée. Par exemple, lorsqu'une tumeur grossit, il est nécessaire pour celle-ci d'être alimentée par le sang afin de survivre. Des études en laboratoires ont démontré la nécessité du facteur angiogénique VEGF pour l'irrigation de ces tumeurs (Borgstrom et al., 1996; Yoshiji et al., 1997). Okajima et Thorgeirsson (2000) ont démontré que *v-raf*, *v-myc* ou *v-h-ras*, des oncogènes bien connus, pouvaient induire l'expression et stabiliser l'ARNm de VEGF via différentes voies.

En contre partie, certains gènes ont été caractérisés comme étant des gènes suppresseurs de tumeurs. Récemment, *PP1R3* (sous-unité 3 de la protéine phosphatase) a été identifié comme un gène suppresseur de tumeurs (Kohn et al., 1999). Les molécules formant les différents types de jonctions (lacunaires, serrées ou adhérentes) sont elles aussi considérées comme des suppresseurs de tumeurs.

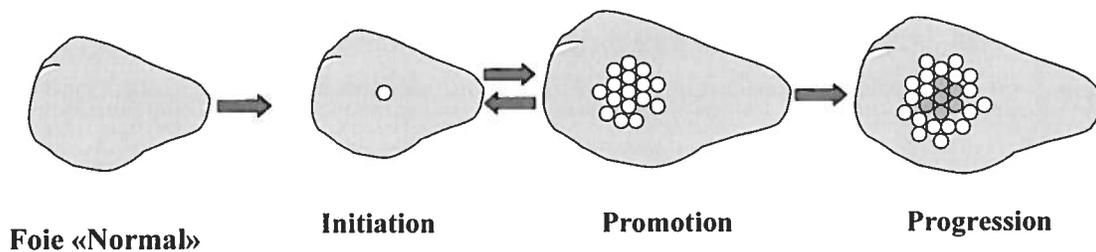
Tous ces gènes, lorsque activés viendront bouleverser l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose au sein de la cellule. Ils lui permettront de croître et de se diviser sans subir le contrôle des cellules avoisinantes.

## **2.6 Le caractère multi-stade de la cancérogenèse**

Depuis quelques années, une nouvelle théorie est née. Celle-ci permet de regrouper plusieurs des caractéristiques (capacité de prolifération, caractère mutagénique ou épigénétique des substances, influence de l'environnement, hérédité...) dont il a été discuté dans les premières pages de cette section. Cette théorie est connue sous le terme cancérogenèse à multi-stade. Elle est, à ce jour, une des théories la plus complète et la mieux définie pour la cancérogenèse. De nombreuses études sont venues non seulement confirmer ses principes, mais aussi intégrer les notions provenant des autres théories. Il

sera vu, dans la dernière section, que la communication intercellulaire s'intègre bien dans cette théorie.

Depuis plusieurs années, il est généralement admis que le cancer est un processus comprenant trois stades distincts : l'initiation, la promotion et la progression (**Figure 4**). Cependant, lors d'études en laboratoire, il a été démontré qu'une utilisation de carcinogènes en quantité élevée peut faire passer les cellules directement du stade de l'initiation vers le stade de la progression, sans qu'il n'y ait de promotion (Scherer et Emmelot, 1975 ; Steinek et al., 1993). Malgré tout, la plupart des cancers passent par les mêmes étapes. Ces trois stades ont été particulièrement bien caractérisés grâce à l'étude, principalement, de deux types bien précis de cancers, soit celui du foie chez le rat et celui de la peau chez la souris. Cependant, il est fort probable que ce principe s'applique à tous les cancers, plus particulièrement aux cancers de cellules épithéliales tel que démontré dans la vessie (Cohen et al., 1979), dans les poumons (Witschi et al., 1977), dans le colon (Reddy et al., 1977), dans le foie (Peraino et al., 1971) et dans le sein (Meites, 1972). Lors de ces stades, une cellule, puis ces cellules-filles, progressent avec une autonomie grandissante (échappant peu à peu au contrôle des autres cellules) vers une population sélecte et distincte de cellules de néoplasmes, acquérant peu à peu les caractéristiques des cellules cancéreuses, et perdant ainsi sa différenciation.



**Figure 4 : Schéma de la cancérogenèse multi-stade.**

° représente une cellule initiée (stade de l'initiation) et qui prolifère lors de la promotion.  
 ● représente la cellule qui a acquis d'autres changements et/ou mutations lors de la progression. Comme le démontre le schéma, le stade de la promotion est réversible, alors que l'initiation et la progression ne le sont pas.

\* figure inspirée de Mills, Jirtle et Boyer, 1995.

### 2.6.1 L'initiation

L'initiation, la première étape de ce processus, implique l'acquisition par une cellule d'une mutation en un ou un petit nombre de loci (Pitot et al., 1996). Cette mutation peut être acquise (héréditaire), spontanée ou en réponse à un agent physique ou chimique (nature vs nurture). Ce changement la rend capable d'un développement clonal sous l'influence d'un promoteur (conditions favorables, théorie des cellules souches).

Ce processus est rapide. Il a été établi que cette étape ne requière qu'un seul cycle cellulaire afin que la mutation soit «fixée» dans l'ADN de la cellule lors de la réplication (Kakunaga, 1975 ; Mironescu et Love, 1974). Cette caractéristique rend l'étude du cancer hépatique un peu plus complexe au niveau expérimental. En effet, souvent, l'exposition à un agent carcinogène seulement n'est pas suffisante pour initier le cancer. Les mutations doivent être répliquées. Or, les hépatocytes prolifèrent peu chez le rat adulte. Il y a donc nécessité, en laboratoire, de procéder à une hépatectomie partielle (ablation du  $2/3$  du foie) afin de stimuler la prolifération cellulaire, ou d'utiliser un foie en croissance (animal plus jeune).

L'initiation est considérée comme un stade irréversible dans la cancérogenèse. Une cellule ayant acquis une altération génétique au niveau de son ADN ne pourra rétablir son état originel. La seule façon de renverser ce processus, serait de «retirer» ces cellules par apoptose (Grals-Kraup et al., 1994).

En laboratoire, il est possible d'identifier le stade d'initiation grâce à certains éléments, ou marqueurs. Hendrich et al (1987) ont démontré que le glutathione-S-transférase  $\pi$  ou placentale (GST-P), identifié par Satoh et al. (1985), est un bon marqueur de cellules initiées. Cependant, comme les mutations sont fixées par réplication, le GST-P peut aussi être présent au niveau du stade de la promotion. Cette enzyme, normalement non exprimée dans les hépatocytes de rat, est activée par certains carcinogènes. Il existe quelques autres marqueurs, tel que *c-jun* chez la souris, mais le GST-P est probablement le plus commun. Pitot et al. (1996) ont démontré que le diethylnitrosamine (DEN), un initiateur de tumeur largement utilisé en laboratoire, peut induire l'expression du GST-P de façon dose-dépendante.

Ces événements de changements au niveau de l'ADN, ou mutations, sont assez fréquents. Pitot et al. (1996) ont estimé que compte tenu du nombre de mutations

observées lors de leurs analyses (environ  $10^6$  mutations par foie) et du nombre d'hépatocytes contenus dans le foie d'un rat adulte (environ  $10^9$  hépatocytes), près de 1 cellule sur 1000 était altérée. Mirsalis et al (1994) ont obtenu des résultats semblables chez les hépatocytes de souris. Cependant, peu de ces altérations seront «sélectionnées» et poursuivront leur développement vers la promotion.

### 2.6.2 La promotion

Le stade de promotion a d'abord été démontré par Peraino et al. en 1971 comme étant une expansion clonale sélective de cellules initiées vers le stade de foyers (ou foci) de cellules altérées. Les cellules initiées, sous l'influence d'un agent promoteur, peuvent se diviser. Les promoteurs sont généralement des carcinogènes épigénétiques qui modulent l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie des tissus. Par exemple, il est généralement accepté que plusieurs promoteurs de cancer peuvent bloquer l'apoptose (Trosko et Ruch, 1998). Ainsi, suite à l'administration d'un promoteur comme le phénobarbital, utilisé dans de nombreuses études, une cellule peut se multiplier, n'étant plus sous l'influence des cellules environnantes. Selon les tissus, ces foyers portent différents noms : dans le foie, ils sont appelés AHF (altered hepatic foci); nodules dans les glandes mammaires; polypes dans le colon; papillomes dans la peau (résumé par Trosko et Ruch, 1998).

Tout comme pour le stade de l'initiation, il existe des marqueurs histochimiques qui permettent d'identifier les foyers. En général, les marqueurs de la promotion sont des changements enzymatiques (Pitot et al., 1996), telle qu'une diminution de l'activité de l'ATPase ou une augmentation de l'activité du GST-P, d'où l'appellation «enzymes altered foci» (EAF) souvent retrouvée dans la littérature.

L'étude de Peraino et al. (1971) a suscité plusieurs expériences pour mieux comprendre cette étape importante de la cancérogenèse. De ces études, trois caractéristiques majeures de la promotion ont émergé (Mills et al., 1995). La première est que la promotion est réversible. Si on arrête l'exposition au promoteur, il y a une baisse du nombre et de la grosseur des foci (Hendrich et al., 1986). Par la suite, si le promoteur est de nouveau appliqué, le nombre et la taille des foci augmenteront de nouveau. La

deuxième est que l'exposition au promoteur doit se faire de façon continue et/ou dans un laps de temps assez important pour que l'effet ait lieu. Une seule exposition suffit rarement en elle-même pour induire une réponse. La dernière caractéristique découle un peu de la deuxième ; dans la courbe dose-réponse d'un promoteur, il existe un seuil sous lequel aucun effet n'est détectable (Pitot et al., 1981).

Tel que mentionné précédemment, plusieurs cellules peuvent être initiées, mais peu d'entre elles continuent le processus et passent au stade de promotion pour devenir des EAF. Il semble que selon les promoteurs, certaines cellules altérées sont «favorisées» (Columbano et al., 1982). Certaines mutations rendent les cellules «plus aptes» à proliférer sous les conditions générées par le promoteur, tandis que d'autres cellules ne semblent pas affectées. Par exemple, il a été démontré que lors de la cancérogenèse chimique par le phénobarbital, les cellules positives en GST-P et en gamma-glutamyltransférase (GGT), deux marqueurs de l'initiation, prolifèrent, alors que le tamoxifène entraînera plutôt l'expansion des cellules positives pour le marqueur glucose-6-phosphate (Pitot et al, 1991). Cependant, ces enzymes demeurent des marqueurs et ne semblent pas être impliquées dans le mécanisme de promotion.

Ce mécanisme de sélection entre les deux premiers stades de la cancérogenèse semble s'appliquer aussi entre la promotion et la progression. Des  $10^6$  cellules initiées par foie de rat lors de la première étape, seulement quelques unes se rendront au stade de progression et deviendront des carcinomes.

### **2.6.3 La progression**

Le stade de progression est considéré comme étant un processus de transformation, menant au stade de néoplasme, pendant lequel les cellules acquièrent une croissance totalement autonome. Cette dernière étape est irréversible. Elle implique l'avènement d'autres changements génétiques au sein des cellules qui mènent à l'activation d'oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Hsu et al., 1991; Goyette et al., 1992). Selon Pitot et al (2000), la progression implique des changements au niveau chromosomal, pouvant aller de légers à très complexes. La progression est caractérisée par une instabilité caryotypique. Par exemple, il a été démontré que des protéines régulatrices du cycle cellulaire et les suppresseurs de tumeurs

peuvent être mutés et nuire au bon fonctionnement du cycle cellulaire (résumé dans Ramljak et al., 2000). Au niveau du foie, une trisomie du chromosome 20 est souvent associée aux hépatoblastomes. Sur neuf cas d'hépatoblastomes étudiés chez des enfants ou des fœtus, huit présentaient une trisomie 20 (Sainati et al., 1998). De plus, il a été démontré que selon la cause du cancer (virale ou non-virale) le type d'anomalie chromosomale peut varier (Marchio et al. (2000).

La cellule peut aussi acquérir la capacité de former des métastases. Cette capacité a été associée à une perte de l'adhésion cellulaire, dont une baisse de la E-cadhérine, protéine majeure des jonctions adhérentes (Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991). Les AHF ayant subi ces mutations irréversibles menant au stade de carcinomes hépatocellulaires (HCC), seront ainsi caractérisés par une capacité à métastaser, une instabilité caryotypique et souvent par une aneuploïdie.

Pour le stade de la progression, il existe également certains marqueurs. Le plus connu, pour les hépatomes carcinocellulaire, demeure le transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) qui n'est pas exprimé normalement dans le foie, mais qui est associé aux néoplasmes épithéliaux. Le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un marqueur de prolifération cellulaire, est aussi largement utilisé. Récemment, Itano et al. (2000) ont proposé une nouvelle méthode, le restriction landmark genomic scanning (RLGS), comme étant un bon marqueur pour la détection de HCC tant au niveau du pronostic, qu'au niveau de la prévention d'une récurrence suite à une opération. Cette méthode permet de déterminer des changements dans l'ADN qui s'accumulent dans une tumeur en progression en utilisant des enzymes de restrictions.

La théorie de la cancérogenèse multi-stade est sans doute la plus complète et la plus connue des théories concernant la cancérogenèse. Depuis quelques années, la communication entre les cellules est de mieux en mieux comprise et semble jouer un rôle plus important qu'on le croyait au départ dans les différentes étapes du cancer. Plusieurs phénomènes étant demeurés obscurs dans les différentes autres théories peuvent être expliqués par la modulation de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires. Sans contredire la théorie de la cancérogenèse à multi-stade, l'implication de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires dans le processus de

cancérogénèse ne vient qu'éclaircir cette dernière et amène une meilleure compréhension du phénomène. La dernière section de ce chapitre est consacrée à la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires et à son implication dans la cancérogénèse. Il offre un résumé substantiel des connaissances sur les jonctions lacunaires, tant au niveau de leur formation que de leur régulation, et il intègre les différentes connaissances sur la cancérogénèse.

## SECTION 3 : LA COMMUNICATION CELLULAIRE VIA LES JONCTIONS LACUNAIRES

*« Il existe un langage qui est au-delà des mots. »*

**L'alchimiste, Paul Coelho**

### **3. La communication cellulaire via les jonctions lacunaires**

#### **3.1 Les jonctions lacunaires**

##### **3.1.1 L'homéostasie et la communication cellulaire**

Le passage d'un organisme unicellulaire vers des organismes pluricellulaires complets a nécessité une évolution longue et fastidieuse. Diverses fonctions étaient auparavant réalisées par les différents organites de la cellule, devaient maintenant être réalisées de façon coordonnée par un ensemble de cellules. De plus, des cellules doivent se spécialiser dans certaines fonctions, et se « fier » aux autres cellules pour maintenir l'organisme fonctionnel. À partir de quelques cellules qui se divisent, les diverses cellules spécialisées doivent apprendre à communiquer entre elles pour coordonner leur efforts afin que l'organisme entier puisse se nourrir, excréter ses déchets, respirer, se reproduire, bref, survivre de façon adéquate à son environnement, voir même s'adapter à ses perpétuels changements.

Il y a donc eu une obligation pour l'organisme de faire communiquer entre elles des cellules parfois très rapprochées l'une de l'autre, mais parfois aussi, très éloignées. Pour ce faire, différents niveaux de communication ont été développés (résumé dans Trosko et Ruch, 1998). Tout d'abord, les cellules éloignées peuvent communiquer entre elles grâce à la communication extra-cellulaire. Ce type de communication se fait grâce à des messagers, tels les hormones et les neurotransmetteurs. Ces éléments, lorsqu'ils arrivent à leurs cellules cibles, y engendrent une réponse. Cette réponse est le deuxième niveau de communication, c'est-à-dire, la transduction intracellulaire. Pour que la cellule puisse bien comprendre le message transmis par l'organisme via la communication extra-cellulaire, celle-ci possède des récepteurs auxquels les messagers se lieront. Cette liaison provoquera la venue d'une autre vague de messagers à l'intérieur de la cellule. Ces seconds messagers ( $\text{Ca}^{++}$ , diacylglycérol, pH, céramides, NO, cAMP, les réactifs

oxygénés) permettront à la cellule de comprendre le message et d'y adapter sa réponse. Cependant, ces deux mécanismes de communication sont relativement lents. Ils nécessitent le relâchement de signaux, leur capture par les cellules cibles et l'élaboration d'une réponse adéquate. Pour une communication plus rapide, il existe un troisième type de communication. C'est la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires. Il existe une abréviation consacrée dans la littérature pour identifier la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires, qui est la GJIC (Ce terme vient de l'appellation anglaise «Gap Junction Intercellular Communication ». Nous utiliserons ce terme pour la suite du mémoire).

Toutes ces formes de communication ont la même grande fonction. Elles permettent à l'organisme de former un tout intégré, de maintenir l'homéostasie. L'homéostasie est définie comme étant «l'état d'équilibre dynamique de l'organisme, le maintien de la stabilité du milieu interne» (Marieb, 1993). C'est l'état naturel de l'organisme où il répond de façon adaptée aux modifications de son milieu externe et interne et comble les besoins de ses tissus et organes. Chaque tissu possède ses propres besoins et ses propres caractéristiques. Les différents types de communication permettent donc aux différents tissus de communiquer entre eux pour assouvir leurs besoins, mais ils permettent aussi aux cellules d'un même tissu de coordonner leur réponse aux différents stimuli. Ainsi, la communication entre les cellules permet l'homéostasie de l'organisme et des cellules à l'intérieur des tissus de l'organisme.

Au niveau cellulaire, la communication permet le contrôle de différentes fonctions. Elle détermine la réponse de chaque cellule à un signal global. Le contrôle homéostatique permet à la cellule de savoir si 1) elle demeure au repos (G0) et continue de faire ses fonctions habituelles; 2) elle entre en phase de prolifération cellulaire; 3) elle se différencie en cellule plus spécialisée; 4) elle passe en apoptose; ou 5) si elle est déjà différenciée, elle répond de façon adaptative au signal.

### 3.1.2 Le rôle de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires

Outre le contrôle de l'homéostasie, différentes fonctions ont été attribuées aux jonctions lacunaires (Krutovskikh et Yamasaki, 1997; Holder, Elmore et Barrett, 1993):

- 1) conduction des vagues électriques dans les cellules excitables, ce qui garde la contraction coordonnée;
- 2) dans certains tissus dépourvus de vaisseaux sanguins (ex. cornée), les jonctions lacunaires nourrissent les cellules;
- 3) augmentation de la réponse des tissus aux hormones en permettant le relâchement d'une vague de seconds messagers des cellules activées par les hormones vers les cellules environnantes qui ne sont pas activées;
- 4) régulation du développement embryonnaire en dispersant les signaux morphologiques et en défendant les barrières des compartiments en développement.
- 5) modulation des effets néfastes des xénobiotiques chimiques en les dispersant du point d'entrée de l'exposition dans le tissu vers de nombreuses autres cellules interconnectées. Cette dispersion limite la concentration locale du xénobiotique qui peut maintenant être métabolisé par plusieurs cellules de façon simultanée.
- 6) élimination de dérivés métaboliques non désirés, facilitée par un gradient de l'intérieur du tissu vers le système vasculaire pour l'excrétion.

Vu leur importance au niveau du maintien de l'homéostasie chez les organismes pluricellulaires, il n'est pas surprenant que les jonctions lacunaires soient préservées dans l'évolution des espèces. En effet, il a été démontré que les jonctions lacunaires sont présentes tout au long de l'évolution et même chez les invertébrés primitifs tel que les méduses et les hydres. De plus, elles sont similaires aux structures connues sous le nom de plasmodesmes chez les plantes, tant au niveau physiologique que fonctionnel. Chez les mammifères, elles sont présentes dans la plupart des tissus, sauf dans certaines fibres des muscles squelettiques, certains neurones et dans les cellules circulantes du sang.

### **3.1.3 Revue des jonctions lacunaires**

Des trois formes de communication dont il a été question soit la communication extra-cellulaire, la transduction intracellulaire et la GJIC, cette dernière est sans doute celle découverte le plus récemment. Les jonctions lacunaires, en elle-mêmes, ont été décrites pour la première fois dans les années 60, comme étant des membranes très rapprochées l'une de l'autre contenant de petites lacunes de 2 à 4 nm (Revel and Karnovsky, 1967).

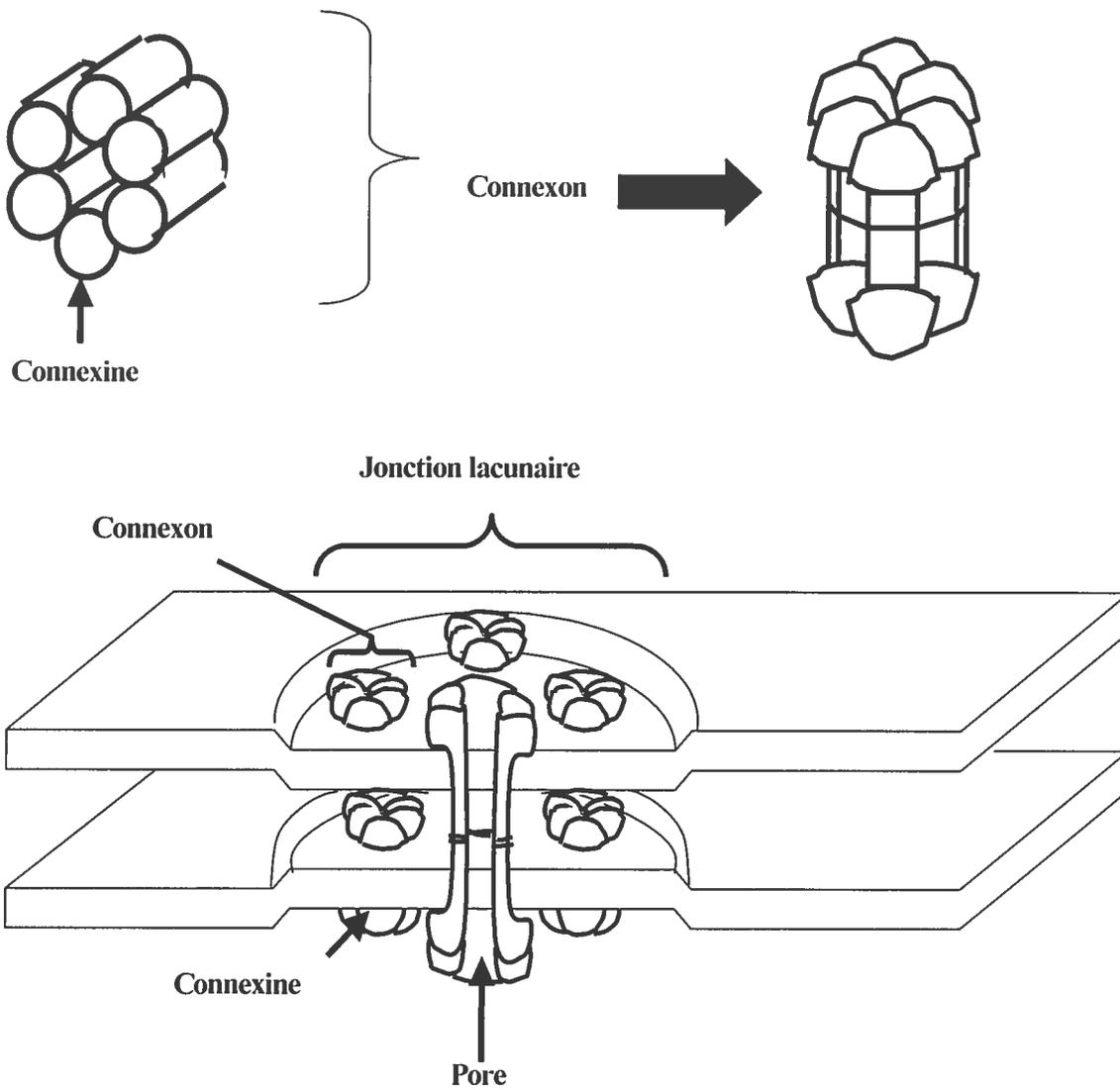
Dans les années 70, les cryofractures en microscopie électronique ont permis de démontrer un arrangement en plaques et/ou un regroupement de particules denses (Goodenough and Revel, 1970). Ce n'est que vers la fin des années 70 que Makowski et al. (1977) ont proposé le modèle des jonctions lacunaires tel que nous le connaissons aujourd'hui. Bien que les méthodes utilisées par Makowski et al. (1977) étaient beaucoup plus rudimentaires, les méthodes «modernes» utilisées par la suite pour étudier la structure des jonctions n'ont pu que confirmer ce modèle.

## **3.2 Les connexons**

### **3.2.1 Structure physique d'un connexon**

Les jonctions lacunaires sont en fait un regroupement de pores aqueux. Ces pores sont formées de deux hémi-canaux, appelés connexons. Les connexons sont relativement cylindriques, mesurant environ 7,5 nm de long et 7 nm de diamètre (Lal et Lin, 2001). Chacune des cellules adjacentes forme ses propres connexons qui s'uniront pour former le pore. Les connexons sont formés de l'oligomérisation de six connexines. Les différentes

interactions entre les connexines aideront à la formation d'une structure hexamérique, dont chaque pointe est séparée par 8-10 nm de l'autre, formant un pore aqueux de 1,5 à 2 nm (**Figure 5**).

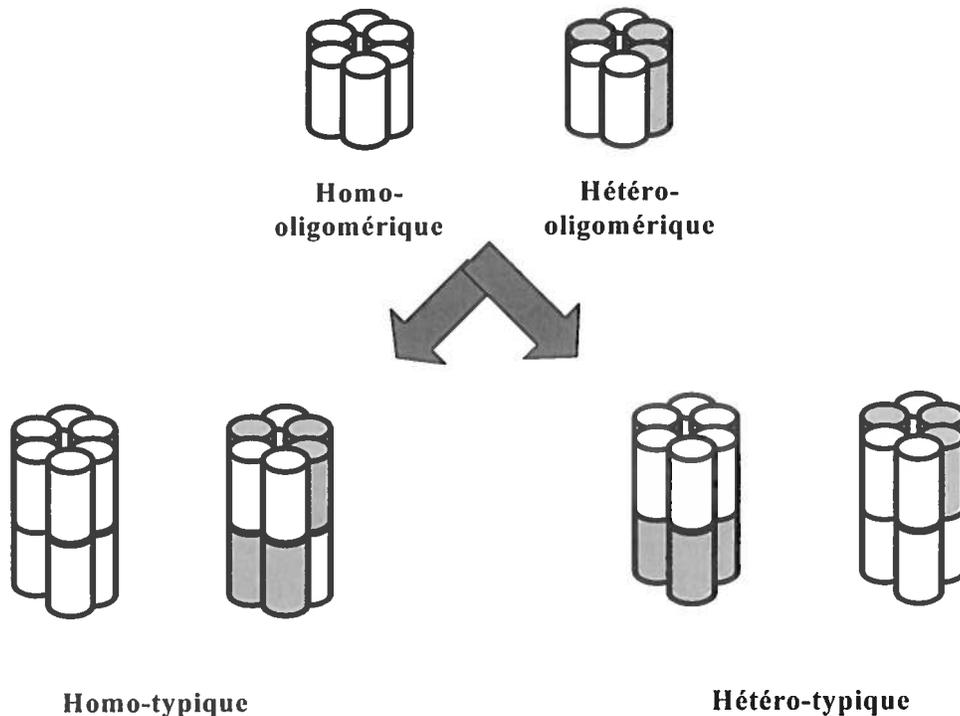


**Figure 5 : Schéma de la structure physique des connexons et de leur arrangement en jonction.**

Six connexines se regroupent en un connexon. Deux connexons s'aligneront pour former la jonction lacunaire. Les jonctions se regroupent au niveau des plaques, unissant les cytoplasmes des deux cellules adjacentes.

### 3.2.2 Les types de connexons

Les connexons peuvent être de différents types selon les connexines qui les composent (**Figure 6**). Dans les tissus contenant plusieurs connexines différentes, les connexons peuvent être composés d'un seul type (homo-oligomérique) (Sosinsky, 1995) ou de plusieurs types (hétéro-oligomérique) (Stauffer, 1995; Jiang et Goodenough, 1996) de connexines. Ces deux variantes de connexons peuvent avoir des propriétés de perméabilité et de régulation différentes et amènent ainsi de nombreuses options pour la régulation de signaux passant à travers les canaux.



**Figure 6 : Schéma représentant les types de connexons selon les connexines qui les composent.**

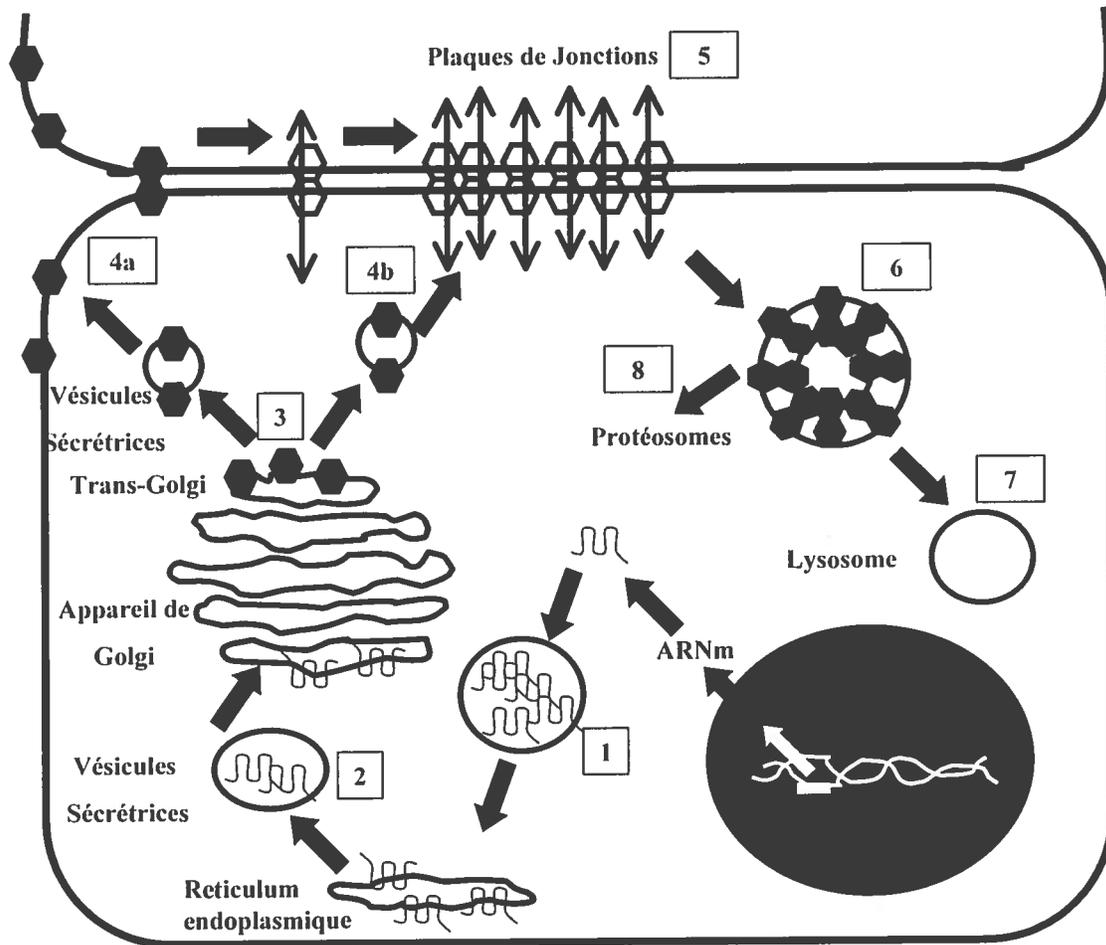
Les connexons peuvent être formés d'un seul type de connexines (homo-oligomérique) ou de différents types de connexines (hétéro-oligomérique). Les pores intercellulaires peuvent être formés de connexons de mêmes types (homo-typique) ou de types différents (hétéro-typique).

De plus, il peut y avoir des canaux formés des connexons de même type (homotypiques) ou de types différents (hétérotypique). Cependant, toutes les combinaisons ne sont pas possibles et elles ne mènent pas toutes à la formation de canaux fonctionnels. Falk et Lauf (2001) ont démontré que les connexines partageant des caractéristiques semblables, provenant de la même sous-famille tels (voir page 42) que Cx32 et Cx26, peuvent s'assembler en canaux hétéro-oligomériques et en canaux hétérotypiques, tandis que des connexines avec des caractéristiques différentes, provenant de sous-familles différentes, tels que Cx32 et Cx43 ou Cx26 et Cx43, ne font que des canaux homo-oligomériques et homotypiques.

La découverte de plusieurs types de connexons est intéressante car elle amène la possibilité que différents agencement de connexines pourraient permettre le passage plus spécifique de certaines molécules et restreindre celui d'autres molécules. D'ailleurs, le diamètre des canaux varie entre 1,5 à 2 nm en fonction des connexines qui le composent. Il est donc possible que ces arrangements différents confèrent des propriétés de sélectivité plus grande et plus diversifiée.

### **3.2.3 Formation des jonctions lacunaires**

Les jonctions lacunaires possèdent une très courte demi-vie. En 1981, Fallon et Goodenough rapportent une demi-vie de 5 heures seulement pour les jonctions lacunaires au niveau du foie de souris. Ces résultats ont par la suite été confirmés par différents groupes pour plusieurs connexines et dans plusieurs tissus (Traub et al., 1987 ; Laird et al., 1991 ; Musil et al., 1990 ; Laird et al., 1995). Ces courtes demi-vie démontrent un processus continu de formation et de dégradation de ces jonctions. Les études ont démontré que les cellules peuvent réguler leur besoins en communication en modulant le nombre de pores présentes à un moment précis au niveau de la membrane plasmique (Laird, 1996).



**Figure 7 : Cycle de vie des jonctions lacunaires.**

1) Migration en groupes des connexines nouvellement synthétisées vers le réticulum endoplasmique. 2) Transport vésiculaires des connexines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et assemblage des connexons en connexon fermé dans le Golgi. 3) Transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la membrane cytoplasmique. 4a) Insertion aléatoire des connexons à la membrane puis formation des jonctions. 4b) Migration des connexons vers les plaques de jonctions lacunaires. 5) Plaque de jonctions, regroupement de connexons liés aux connexons de l'autre cellule. 6) Internalisation des jonctions lacunaires en vésicules annulaires composés des jonctions des deux cellules. 7) Voie de dégradation par les lysosomes. 8) Voie de dégradation par les protéosomes.

\* figure inspirée Laird, 1996

Il existe plusieurs évidences qui laissent croire que les connexines sont importées en groupe au réticulum endoplasmique (**Figure 7, étape 1**). Falk et al., 1994 ont démontré ce co-transport via un signal de reconnaissance *in vitro*. Cependant, ces études sont controversées, car elles impliquent la présence de sites de clivage non identifiés.

Les connexines, comme il a été mentionné précédemment, sont des protéines transmembranaires, avec de multiples traversées. Cette topologie est établie, du moins en partie, dans le réticulum endoplasmique par la formation des ponts disulfures intramoléculaires au niveau des deux boucles extra-cellulaires (Laird, 1996). Cependant, les connexines ne semblent pas s'oligomériser au niveau du réticulum endoplasmique (Musil et Goodenough, 1993), mais plutôt au niveau de l'appareil de Golgi. Le transport de la Cx43 entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (**Figure 7, étape 2**) se fait par la voie des vésicules sécrétrices, tel que démontré par Musil et Goodenough.

Une des étapes importantes de la formation des jonctions lacunaires est l'oligomérisation des connexines qui se déroulerait après la sortie du réticulum endoplasmique, probablement dans le trans Golgi (Musil et Goodenough, 1993). Les connexons sont alors fermés afin d'éviter un déversement du contenu des différentes vésicules vers les autres milieux. Le contrôle de l'oligomérisation n'est pas connu. Plusieurs connexines sont phosphorylées. Puranam et al. (1993) et Laird et al. (1995) ont démontré que l'initiation de la phosphorylation de la Cx43 se fait avant sa sortie du Golgi. Cependant, l'importance de cette phosphorylation pour le cheminement de la Cx43 n'est pas connue.

Il est fort probable que le transport entre l'appareil de Golgi et la membrane se fasse par le transport vésiculaire (**Figure 7, étape 3**). Il a été démontré qu'au niveau de la membrane plasmique, les pores sont regroupés en plaques. Cependant, l'ordre des événements n'est pas connu. Il existe deux hypothèses concernant l'insertion, l'assemblage et le regroupement des connexons dans la membrane plasmique des cellules non polarisées. La première stipule que les connexons sont insérés de façon aléatoire (**Figure 7, étape 4a**), qu'ils se joignent à ceux de l'autre cellule et migrent sous forme de canal dans la membrane vers des endroits plus aplatis où sont situés les autres connexons pour former une plaque de jonctions (Johnson et al., 1974). La deuxième propose plutôt qu'il existe des régions dans lesquelles les connexons peuvent s'insérer (**Figure 7, étape**

**4b).** Les connexons nouvellement formés y seraient transportés automatiquement et se joindraient à ceux de l'autre cellule à cet endroit pour former les pores intercellulaires. Ils seraient ainsi déjà regroupés en plaques (**Figure 7, étape 5**). Wang et Rose (1996) ont démontré que des microfilaments étaient nécessaires pour le regroupement des connexons. Jordan et al. (1999) ont, quant à eux, suggéré une liaison directe ou indirecte au cytosquelette lors de la formation des plaques. De plus, l'utilisation de nocodazole, un produit brisant les microtubules, diminue l'apport de vésicules contenant des Cx43 à la membrane, ce qui suggère un mouvement régulé par les microtubules des vésicules de connexines vers la membrane.

Même si peu d'évidences ont été démontrées à ce sujet, il semble que l'assemblage de plusieurs canaux en plaques leur confère une certaine stabilité. Ces plaques sont de tailles diverses pouvant même varier entre 100 nm à 1 µm de diamètre et contenir entre 100 à 1000 connexons (Flak et Lauf, 2001). Cependant, il a été démontré, grâce aux cryofractions, que certains connexons présents à la membrane plasmique dans ces plaques ne sont pas couplés aux connexons de l'autre cellule. Cette récente découverte est encore passablement controversée. Pourtant, il y a de plus en plus d'évidences démontrant qu'ils pourraient servir à régulariser le milieu interne de la cellule par rapport au milieu extra-cellulaire (Lal et Lin, 2001).

Au niveau des cellules polarisées, les connexons sont situées majoritairement dans la région apicale. Plusieurs études démontrent que les différents type de jonctions, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires sont liées. Kojima et al (2001) ont démontré que la Cx32 est associée avec les protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-1 et ZO-1) dans les hépatocytes en culture. La régulation de la Cx43 est contrôlée par la protéine transmembranaire de la jonction adhérente E-cadhérine dans l'épiderme murin (Jongen et al., 1991). Pour que les connexons se joignent, les cellules doivent être assez près l'une de l'autre. Il est donc envisageable que l'assemblage des connexons ait lieu au même endroit que celui des autres types de cellules.

### 3.2.3.1 Retrait des jonctions de la membrane

Le retrait des jonctions de la membrane est, encore une fois, peu connu. Le premier modèle de l'internalisation des jonctions a été proposé par Larsen et al en 1979 (**Figure 7, étape 6**). Suite à la découverte de structures intracellulaires à double membrane contenant des jonctions lacunaires, Larsen et al. ont proposé que ces structures étaient en fait des anneaux comprenant les jonctions lacunaires provenant des deux cellules opposées. La jonction serait enlevée de façon intégrale par l'une ou l'autre des cellules, sans aucun autre composante de la membrane plasmique, sauf de l'actine et des clathérines (assignées probablement à l'invagination). Par la suite, il a été démontré dans plusieurs autres études que non seulement ces structures étaient présentes, mais qu'elles contenaient effectivement des connexines (Dermietzel et al., 1991; Risley et al., 1992; Naus et al., 1993). Plus récemment, Jordan et al. (2001) ont confirmé, à l'aide de Cx43 couplé à une protéine fluorescente, que de grandes régions contenant des connexines étaient internalisées à l'intérieur des cellules NRK. Ils ont également démontré qu'une cellule pouvait prendre en charge les connexines de la cellule voisine. Ces structures internalisées sont ensuite dégradées par la cellule.

### 3.2.3.2 Dégradation des jonctions

Plusieurs études ont été réalisées sur la dégradation des jonctions lacunaires. Quelques voies ont été trouvées, mais aucune encore n'a été favorisée par rapport aux autres. Une des voies possible est la dégradation des connexines par les lysosomes (**Figure 7, étape 7**). Rahman et al. (1993), Ginzberg et Gilula (1979), Murray et al. (1981), Larsen et Tung (1978), Larsen et Risinger (1985), Naus et al. (1993) et Larsen et Hai (1978) ont démontré la présence de connexines et/ou de jonctions lacunaires dans les lysosomes ou les phagolysosomes. De plus, Musil et al. (2000) ont démontré que l'emploi d'inhibiteurs de l'activité enzymatique lysosomale (chloroquinone) résulte en un retard de la dégradation de la Cx43 et en l'accumulation de Cx43 dans des cellules NRK.

Il est aussi possible que les connexines soient dégradées dans les protéosomes (**Figure 7, étape 8**). Laing et Beyer (1995), en utilisant un inhibiteur de l'activité enzymatique protéosomale (N-acétyl-L-leucyl-L-leucinylnorleucinal, ou ALLN), ont observé une augmentation de la demi-vie de la Cx43. Finalement, il a été démontré que

la Cx26, la Cx32 et la Cx40 peuvent être clivées par des calpaines (Elvira et al., 1993 ; Lin et al., 1997). Il est possible que plusieurs voies co-existent selon les connexines et/ou les types cellulaires. Berthoud et al. (2000) ont démontré qu'en utilisant soit du ALLN (un inhibiteur de la dégradation protéosomale), soit du primaquine (un inhibiteur de la dégradation lysosomale), il y avait, dans les deux cas, une accumulation de Cx43 que dans les cellules non-traitées. Ces résultats démontrent bien que les deux voies co-existent dans les cellules BWEM.

L'étude du cycle de vie des connexines et des connexons n'en est qu'à ses débuts. Il existe de nombreuses étapes importantes pour que la communication entre les cellules se fasse de façon adéquate. Dans les prochaines années, grâce aux nouvelles technologies utilisant des protéines comme des marqueurs fluorescents (CFP, cyan fluorescent protein, GFP, green fluorescent protein, YFP, yellow fluorescent protein), les mécanismes de régulation des jonctions lacunaires devraient être beaucoup mieux compris. Ces marqueurs ont déjà fait leur preuve et ont permis de suivre le cheminement de connexines dans la cellule sans toutefois interférer avec leur fonction (Windoffer et al., 2000 ; Laird et al., 2001; Falk et Lauf, 2001).

### **3.3 Les connexines**

#### **3.3.1 La découverte des connexines et leur distribution dans les tissus**

Les jonctions lacunaires sont formées grâce à l'oligomérisation d'une famille de protéines appelées connexines, possédant des caractéristiques communes. Les connexines constituent une famille de protéines bien conservée dans l'évolution. L'homologie des séquences est généralement supérieure à 90%. Les premières connexines clonées l'ont été dans le milieu des années 80 (Beyer et al., 1987 (Cx43) ; Zhang and Nicholson, 1989 (Cx26) ; Paul, 1986 (Cx32); Kumar et Gilula, 1986). Depuis, quinze connexines différentes ont été identifiées chez les vertébrés (**Tableau 1**). Cette grande diversité a d'abord été suggérée grâce aux analyses biochimiques de fractions cellulaires enrichies pour les jonctions lacunaires (Bruzzone et al., 1996).

Chez les invertébrés, bien que la présence des jonctions lacunaires soit démontrée, il existe encore un débat concernant leur composante. De récentes études suggèrent qu'une famille de protéines similaires aux connexines, les innexines, pourraient avoir les mêmes fonctions (Starich et al., 1996 ; Phelan et al., 1998; Todman et al., 1999 ; Phelan et Starich, 2001). Cependant, peu d'études concernant les innexines ont été réalisées et leur fonction spécifique demeure à être établie.

La découverte des connexines est assez récente. Certaines connexines ne sont connues que depuis quelques années. Au départ, les connexines ont été nommées en fonction de leur poids moléculaire, tel que proposé par Beyer et al. (1987). Ainsi, la protéine découverte dans le foie et ayant un poids moléculaire de trente-deux kilodaltons a été nommée connexine 32 (Cx32). Cependant, cette nomenclature est parfois contestée. En effet, une même connexine chez deux espèces différentes peut avoir des poids légèrement différents. Il est aussi possible que deux connexines, chez la même espèce, aient des poids semblables (Lo, 1999). C'est pourquoi, Kumar et Gilula (1992) ont proposé une autre nomenclature basée sur l'homologie des séquences. Trois sous-familles de connexines ont été identifiées grâce à leurs séquences homologues : les  $\alpha$ , les  $\beta$  et les  $\gamma$  (O'Brien et al., 1998). À l'intérieur de ces classes, chaque membre possède un numéro différent. Bien qu'encore sous étude, cette nomenclature rejoint de plus en plus d'adeptes.

**Tableau 1 : Distribution des connexines dans les tissus de mammifères.**

\* tableau inspiré de Cyr, Pillet et Nicholas., 2001

Type de connexine	Tissu	Référence
<b>Cx26</b>	foie, glande mammaire, intestin, pancréas, épидидyme, cochlée	Lautermann et al., 1998 ; Lee et Rhee, 1998 ; Monaghan et al., 1996 ; Pozzi et al., 1995 ; Kuraoka et al., 1993; Lee et al., 1992; Dufresne et al., 2001
<b>Cx30</b>	cerveau, peau, cochlée (souris)	Nagy et al., 1999 ; Dahl et al., 1996 ; Lautermann et al., 1999 ; Goliger et Paul, 1994
<b>Cx30.3</b>	rein, peau	Tucker et Barajas, 1994 ; Hennemann et al., 1992
<b>Cx31</b>	rein, peau, placenta	Tucker et Barajas, 1994
<b>Cx31.1</b>	peau, épithélium	Budunova et al., 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Hennemann et al., 1992a
<b>Cx32</b>	glande mammaire, foie, système nerveux, pancréas, thyroïde, rein, épидидyme	Munari-Silem, 1996 ; Pozzi et al., 1995 ; Krutovskikh et al., 1995 ; Zhang et Nicholson, 1994, 1989 ; Kuraoka et al., 1993 ; green et al., 1996 ; Dufresne et al., 2001
<b>Cx33</b>	Testicule	Haeflinger et al., 1992
<b>Cx36</b>	oeil, système nerveux central	Al Ubaidi et al., 2000 ; Belluardo et al., 1999
<b>Cx37</b>	cœur, endothélium, estomac, testicule, ovaire, peau, poumon	Haeflinger et al., 2000; Chang et al., 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Reed et al., 1993 ; Willecke et al., 1991
<b>Cx40</b>	cœur, endothélium, muscles lisses, poumon	Becker et al., 1998 ; Groenewegen et al., 1998 ; Little et al., 1995
<b>Cx43</b>	cœur, endothélium, œil, cellules immunitaires, épидидyme, glande mammaire, ovaire, utérus, pancréas, thyroïde, peau	Cyr et al., 1996 ; Monaghan et al., 1996 ; Munari-Silem, 1996 ; Pozzi et al., 1995 ; Goliger et Paul, 1994 ; Butterweck et al., 1994
<b>Cx45</b>	cerveau (embryonnaire), cœur, intestin, rein, poumon, peau	Davis et al., 1995 ; Butterweck et al., 1994 ; Hennemann et al., 1992b ; Willecke et al., 1991
<b>Cx46</b>	cœur, rein, lentille de l'œil	Hopperstad et al., 2000 ; Davis et al., 1995 ; Rup et al., 1993
<b>Cx50</b>	cœur, lentille de l'œil	Hopperstad et al., 2000 ; Zampighi et al., 1999 ; White et al., 1992
<b>Cx57</b>	Peau, cœur, rein, testicule, ovaire, intestin	Manthey et al., 1999

Les connexines présentes sont différentes d'un tissu à l'autre. En général, dans un tissu spécifique, seulement deux ou trois types de connexines sont présentes (**Tableau 1**). De plus, un même type ne sera présent que dans quelques tissus (Yamasaki et al., 1996). Malgré la présence de séquences conservées dans les connexines, la diversité ne semble pas être due à un épissage alternatif des ARNm. Il y a plutôt un gène par connexine. En effet, plusieurs connexines ont été cartographiées et sont localisées sur différents chromosomes, ce qui suggère une distribution aléatoire dans le génome (Trosko et Ruch, 1998). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la régulation de l'expression des connexines. Chaque connexine est régulée de façon indépendante tant au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, ainsi que lors de sa dégradation (Laird, 1996; Yamasaki et al., 1996).

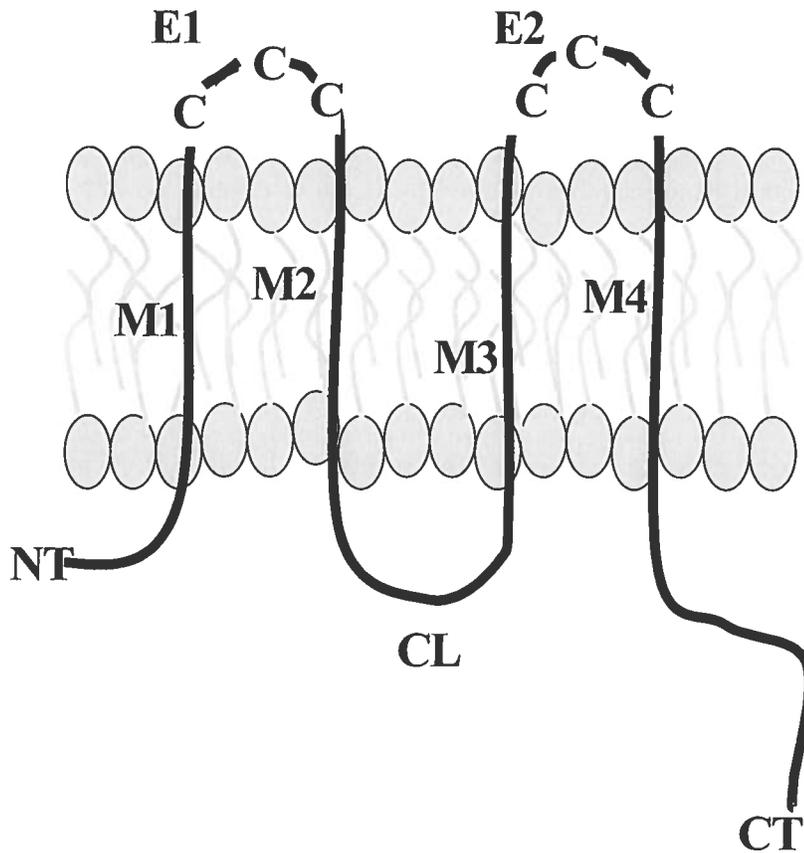
La raison pour laquelle il y a tant de connexines différentes n'est pas claire. Il semble y avoir certaines différences dans leurs fonction(s) et/ou la régulation de leur expression, leur formation et la perméabilité des canaux qu'elles forment (résumé dans Goodenough, 1996). Cette différence au niveau des tissus et de la grande diversité des connexines formant différents types de jonctions suggèrent une importance fonctionnelle spécifique à chaque connexine. Depuis quelques années, cette idée gagne de plus en plus d'adeptes. Niessen et al. (2000) ont démontré une différence de perméabilité selon le type de connexines composant le canal. En étudiant l'IP<sub>3</sub>, un second messager, et les vagues de calcium que celui-ci génère, ils ont démontré que ce messager passait plus facilement à travers des canaux formés de Cx32, que dans des canaux formés de Cx26 ou de Cx43. Malgré cette grande diversité au niveau des tissus et de leur expression, la structure des connexines demeure semblable d'un type à l'autre et d'une espèce à l'autre.

### 3.3.2 Structure des connexines

Le modèle structural des connexines a été proposé suite à des études impliquant les Cx26, Cx32 et Cx43 (Zimmer et al., 1987; Goodenough et al., 1988; Hertzberg et al., 1988; Milks et al., 1988; Yancey et al., 1989; Evans et al., 1992; Dahl et al., 1994; Falk et al., 1994; Zhang et Nicholson, 1994). Les connexines sont des protéines transmembranaires possédant deux domaines extracellulaires en boucles (E1 et E2), un

domaine cytoplasmique en boucle (CL), deux queues cytoplasmiques, le C-terminal et le N-terminal (NT et CT) et quatre domaines transmembranaires (Bowie, 1997) traversant la membrane en rangées parallèles (M1 à M4) (**Figure 8**). Un des domaines transmembranaire, le domaine M3, contient une grande proportion d'acides aminés hydrophiles qui tapissent probablement l'intérieur du connexon. Krutovskikh et al. (2000) ont démontré, en utilisant des dominant-négatifs, qu'une mutation dans le domaine M3 de la Cx43 abolit la GJIC soit par une fermeture des canaux, soit par un arrêt du transport des complexes à la membrane. Le domaine M3 est le plus susceptible à tapisser l'intérieur du pore à cause de ses composantes hydrophiles et parce qu'en laboratoire il peut être marqué avec des agents hydrosolubles (Nunn et al., 2001). Cependant, le domaine M1 pourrait aussi participer à la formation du pore, étant lui aussi marqué par des agents hydrophiles (Zhou et al., 1997). Les domaines transmembranaires seraient liés aux extrémités supérieures et inférieures par une ceinture de résidus aromatiques (Nunn et al., 2001).

Les deux boucles extra-cellulaires sont bien conservées. Elles possèdent trois résidus cystéines qui sont séparées par 3 à 6 acides aminés. Jusqu'à maintenant, les connexines semblent respecter cette structure, sauf la Cx31 où le nombre d'acides aminés entre les cystéines change dans le domaine E2. Ces cystéines semblent importants pour le repliement de la molécule. En effet, elles forment des ponts disulfures intramoléculaires qui relient les deux boucles (Dupont et al., 1989; Rahman et Evans, 1991; John et Revel, 1991). Dahl et al. (1992 et 1992) ont démontré que une mutation au niveau de n'importe laquelle de ces six cystéines sur la Cx32 bloque complètement la conductance entre les paires d'oocytes de *Xenopus*. Ces cystéines jouent donc également un rôle dans la communication en alignant les connexons pour former le pore intercellulaire.



**Figure 8 : Schéma de la structure des connexines.**

M1 à M4 : domaines membranaires (hélices- $\alpha$ ) 1 à 4 ; E1 et E2 : Domaines extracellulaires 1 et 2 ; c : cystéines ; NT : n-terminal ; CL : boucle cytoplasmique ; CT : c-terminal.

\* figure inspirée de Bruzzone et al., 1996

Les quatre domaines intramembranaires et la courte queue N-terminale sont aussi bien conservés. Le C-terminal, quant à lui, varie d'une connexine à l'autre, tant au niveau de la séquence qu'au niveau de sa longueur. En général, plus la boucle est longue, plus le poids moléculaire de la protéine est élevé. Les queues CT contiennent par ailleurs un motif de protéines kinases.

### **3.4 Le contrôle de la communication**

Pour pouvoir communiquer de façon efficace, les cellules doivent être en mesure de réguler le passage des molécules non seulement par leur taille, mais aussi en bloquant complètement le passage en certaines occasions. L'ouverture et la fermeture des canaux sont contrôlées par plusieurs mécanismes, à plus ou moins long terme. Il existe trois grands types de modulations de la communication par les jonctions lacunaires (Krutovskikh et Yamasaki, 1997; Trosko et Ruch, 1998; Holder, Elmore et Barrett, 1993) dont nous discuterons dans la prochaine section.

#### **3.4.1 Le contrôle rapide**

Il arrive parfois que la cellule ait besoin de refermer rapidement les pores aqueux des jonctions lacunaires. Cette fermeture peut s'effectuer en quelques millisecondes par le contrôle rapide. Il existe deux hypothèses pour expliquer cette fermeture. La première stipule que le canal se referme par suite d'un changement de configuration des connexines formant le connexon. Ce changement de conformation serait dû à une rotation du domaine M3. Cette rotation amènerait l'introduction de grosses phénylalanines hydrophobiques dans les pores aqueux. Le canal deviendrait ainsi hydrophobe et restreindrait le passage des molécules hydrophylques. Pour retourner à une GJIC efficace, il suffirait d'un retour à la conformation native par une nouvelle rotation dans l'autre direction, ce qui ramènerait de petits acides aminés hydrophiles dans le canal. Il y a alors réouverture du pore aqueux par la libération du passage. Pour que ce soit efficace et rapide, ce changement de conformation doit nécessiter peu d'énergie de la part de la cellule. Nunn et al. (2001) ont déterminé plusieurs conformations natives possibles pour le positionnement des quatre domaines intramembranaires. Plusieurs de ces conformations étaient très stables, plus stables que la conformation «acceptée» par la communauté scientifique. Cependant, ces conformations n'étaient souvent pas les plus plausibles pour différentes raisons. Tout d'abord, étant donné que le système d'analyse ne tient pas compte du milieu environnant, certaines de ces conformations très stables auraient présentées des groupements hydrophiles dans la membrane plasmique. De plus, certaines d'entre elles auraient demandé beaucoup trop d'énergie à la cellule lors de la

fermeture et de l'ouverture des canaux pour que le système soit efficace. Ils ont donc conclu que la conformation amenant M3 à l'intérieur du canal était la plus probable.

L'autre hypothèse implique la rotation progressive dans l'axe du pore de toutes les connexines formant le connexon. Il y aurait alors une diminution progressive de l'ouverture du canal, un peu comme la fermeture du diaphragme d'une caméra (Holder et al., 1993).

Plusieurs mécanismes ont été envisagés pour expliquer ces changements rapide de configurations. Il est possible que les connexines soient phosphorylées par des protéines kinases. Par exemple, il a été démontré que la PKA induit la phosphorylation des résidus sérines localisés sur la queue carboxyl des connexines 43 et 32. Ce changement est associé avec une augmentation de la perméabilité du canal (Saez et al., 1990). La PKC induit la phosphorylation de la connexine 43. Cette phosphorylation est, par contre, associée à une baisse de la perméabilité du canal (Berthoud et al., 1993). Cependant, ces résultats varient selon le type cellulaire utilisé. Par exemple, si dans les hépatocytes, la PKC induit la phosphorylation de Cx32, dans des cellules épithéliales de foie de rat transfectées avec Cx32, la phosphorylation de PKC résulte plutôt en une baisse de GJIC (Ren et al., 1998).

Par contre, certaines connexines, comme la connexine 26, ne sont pas phosphorylées. Le contrôle de l'ouverture rapide du canal ne peut alors pas s'effectuer par phosphorylation. D'autres mécanismes ont donc été proposés, comme des modulations des niveaux intracellulaires d'ions hydrogène (baisse de pH) et calcium, un changement du voltage transjonctionnel et une influence des radicaux libres. Cependant, le fonctionnement exact de ces mécanismes demeure peu clair. Dans tous ces cas, les mécanismes demandent peu d'énergie aux cellules et leur permettent de répondre rapidement.

### **3.4.2 Le contrôle moyen**

Comme il a été mentionné précédemment, la cellule dispose de mécanismes lui permettant d'acheminer des connexons nouvellement formés à la membrane plasmique pour former des jonctions, mais elle peut aussi internaliser les jonctions lacunaires afin d'en réduire le nombre à la membrane plasmique. Ce mécanisme constitue le contrôle à

moyen terme de la communication et peut s'effectuer en quelques minutes ou quelques heures. Cette évidence vient de l'observation de marquage à l'aide d'anticorps contre les connexines dans des vésicules à proximité de la membrane plasmique. Il y aurait donc une redistribution des connexines entre la membrane plasmique, où elles exercent leur fonction en formant des jonctions avec les autres cellules, et le cytoplasme, où elles s'accumulent. Pour certaines connexines (ex. Cx43), leur localisation semble dépendre de leur niveau de phosphorylation (Holder et al., 1993).

### **3.4.3 Le contrôle lent**

Le contrôle à long terme s'exerce au niveau de la synthèse de l'ARNm. La demi-vie des connexines est très courte, ce qui permet un changement rapide de la régulation par une synthèse d'ARNm. Le taux de formation des connexines et leur dégradation, le désassemblage et la perte des jonctions au niveau de la surface de la cellule est ainsi un mécanisme important dans la régulation de la GJIC (Musil et al., 2000 ; Holder et al., 1993; Berthoud et al., 2000). D'ailleurs, grâce à cette caractéristique, l'étude de l'expression de l'ARNm des connexines devient très intéressante. Elle permet d'observer à court terme des changements d'expression. En effet, comme les connexines sont «recyclées» rapidement, si la transcription est bloquée, il y aura rapidement une baisse de la quantité de protéine présente dans la cellule. Conséquemment, si une substance chimique exogène ou endogène vient perturber la transcription des connexines, il peut y avoir une perte importante de la GJIC. Cette perte sera rapidement visible et permettra d'évaluer rapidement les effets de cette exposition.

### **3.5. Importance de la GJIC dans le cancer**

Toutes ces caractéristiques mentionnées dans les premières pages de cette section (expression des connexines, translocation vers la membrane, formation des connexons et des jonctions, bon fonctionnement des jonctions...) sont requises pour un GJIC efficace. Si l'une ou l'autre de ces étapes fait défaut, il s'ensuit une baisse de la communication entre les cellules et l'homéostasie du tissu risque d'en être perturbée. C'est de cette constatation qu'est peu à peu venue l'idée que la communication via les jonctions lacunaires pouvait être importante au niveau de la cancérogenèse. Les agents promoteurs

de tumeurs pourraient agir à tous les niveaux de l'établissement de cette communication. Ils peuvent engendrer des perturbations au niveaux de l'ARNm codant pour les connexines, des protéines elles-mêmes, du nombre de jonctions efficaces présentes et/ou de la localisation des jonctions. Tous ces changements amènerait une baisse ou même un blocage total de la communication entre les cellules via les jonctions lacunaires.

Lorsqu'une cellule coupe les liens qui l'unissent aux autres cellules du même tissu, plusieurs éléments qui contrôlaient sa coordination avec les autres cellules (l'homéostasie du tissu), les hormones, les messagers secondaires et les métabolites essentiels, ne lui sont plus transmis. Elle devient alors en mesure de proliférer sans les contraintes des cellules avoisinantes.

Comme il a été démontré par les différentes études sur la cancérogenèse (voir chapitre 2), le cancer est défini comme une maladie des cellules souches, de la différenciation, et une maladie de la régulation cellulaire ou du contrôle de la croissance. La GJIC étant étroitement liée à ces fonctions, la relation entre la GJIC et l'homéostasie est venue s'imposer d'elle-même. En effet, plusieurs études ont vite démontré une corrélation inverse entre la croissance cellulaire et la GJIC dans les lignées cellulaires cancéreuses.

En 1966, Loewenstein fut le premier à proposer que la GJIC pouvait être impliquée dans le cancer. Cependant, ce n'est que récemment qu'une nouvelle théorie englobant toutes les autres a été proposée grâce aux nombreuses études des dernières années. La plupart de ces études ont été effectuées chez le rat, au niveau de l'hépatocarcinogénèse. En effet, l'étude du cancer du foie de rat offrait plusieurs avantages pour l'étude de la relation entre la GJIC et la cancérogenèse (Krutovskikh et Yamasaki, 1997):

- 1) La cancérogenèse du foie de rat est multi-stade. Elle est bien connue et elle a beaucoup été étudiée dans les dernières années. Ces études ont permis de développer de bons marqueurs de populations cellulaires dans les différents stades (l'initiation, la promotion et la progression);
- 2) Le foie de rat est un tissu cible pour de nombreux carcinogènes génotoxiques.

- 3) Les hépatocytes expriment abondamment les Cx26 et Cx32 (bien caractérisées). De plus, les anticorps et les sondes d'ADNc correspondantes sont largement disponibles;
- 4) La structure unique du parenchyme de foie permet de mesurer le fonctionnement de la GJIC directement dans le foie fraîchement prélevé à l'aide de plusieurs techniques, dont le transfert de colorant comme le Yellow Lucifer.

Ces études ont permis de déterminer de nombreux changements au niveau de la GJIC lors de la cancérogenèse et d'établir les bases de cette théorie. La GJIC peut être impliquée à toutes les étapes de la cancérogenèse. Au niveau de l'initiation, une cellule initiée demeurera dormante tant et aussi longtemps que les cellules autour d'elle exerceront leur influence pour contrôler sa croissance. Autrement dit, si la cellule reçoit des messages via la GJIC pour empêcher sa prolifération, elle ne pourra pas se diviser. Du point de vue des théories de la de-différentiation, des cellules souches et de l'ontogénie, si la cellule souche initiée (cellule dé-différenciée ou bloquée dans son ontogénie) communique avec les autres cellules normales ou avec les autres cellules initiées (dans lesquelles la mutation a été fixée) il n'y aura pas de prolifération cellulaire.

L'influence d'une mauvaise GJIC sera plus drastique au niveau de la promotion. Lorsque la GJIC sera bloquée par des agents promoteurs de tumeurs, il y aura libération des cellules initiées du contrôle des cellules avoisinantes et elles pourront se multiplier de façon clonale. Il a d'ailleurs été démontré que des agents promoteurs de tumeurs peuvent inhiber la GJIC (Krutovskikh et Yamasaki, 1997; Holder, Elmore et Barrett, 1993). Selon Yamasaki (1991), si la GJIC est inhibée dans les cellules initiées de façon considérable par des produits chimiques endogènes (facteurs cellulaires, hormones, cytokines) (nature et/ou produit mutagénique) ou par des chimiques non-génotoxiques exogènes («nurture» et/ou épigénétique), alors l'expansion clonale de ces cellules initiées peut s'effectuer. Si la GJIC est rétablie à ce moment, les cellules initiées retrouveront l'influence des cellules normales et la cancérogenèse pourra être interrompue (réversibilité du stade de promotion).

Enfin, il a été démontré que pour passer du stade de la promotion vers le stade de la progression, il doit y avoir un ou d'autres événements mutagéniques qui libèrent complètement la cellule de l'influence des autres et qui rendent le processus irréversible. Selon la théorie impliquant la GJIC, durant le processus d'expansion clonale des cellules initiées, mais préalablement couplées par les jonctions lacunaires, il se passe d'autres événements mutationnels dans le génome qui amènent une inhibition génomique de la GJIC (activation d'un oncogène, désactivation d'un gène suppresseur de tumeurs, mutation ou répression transcriptionnelle d'un gène des jonctions lacunaires ou d'une molécule d'adhésion cellulaire).

Plusieurs études ont permis d'émettre cette théorie. Au départ, il s'agissait surtout de constatations ou de déduction. Par contre, depuis quelques années, de nombreuses études sont venues confirmer les hypothèses émises. Ainsi, il a été possible de vérifier que la GJIC peut influencer la cancérogenèse à plusieurs niveaux. La suite de cette section présentera quelques études parmi toutes celles qui démontrent l'importance de la GJIC dans la cancérogenèse. Pour les raisons énumérées précédemment et parce-que la recherche dans le cadre de ce projet de maîtrise s'intéresse à ce tissu, la plupart de ces études présentées ont été réalisées dans le foie de rat.

### **3.5.1 Changements au niveau des connexines**

#### **3.5.1.1 ARNm et protéines**

La toute première étape de la formation des jonctions lacunaires est la synthèse des connexines à partir de l'ADN (transcription et traduction). Si l'une de ces deux étapes est modulée par des mutations ou par l'action de substances endogènes ou exogènes, la GJIC peut être diminuée ou inhibée. De nombreuses équipes de recherche se sont donc intéressées à ces deux étapes et ont regardé les niveaux d'ARNm codant pour les connexines et les niveaux protéiques lors de la cancérogenèse ou d'exposition à des produits carcinogènes. La Cx32 étant la principale connexine retrouvée dans le foie, la plupart des études la concerne (Bryant, 1997; Yamasaki et al.1993; Nicholson et al., 1987). Certaines d'entre elles s'intéressent aussi à la Cx26, la deuxième connexine présente dans ce tissu.

Krutovskikh et al. (1991) ont démontré une baisse de la Cx32 (ARNm et protéine) dans les EAF et les carcinomes hépatocellulaires durant la cancérogenèse chimique du foie chez le rat. Plusieurs produits, classés comme des carcinogènes épigénétiques, modulent la GJIC. Par exemple, le TCDD (Wärngard et al., 1994), le pentachlorophénol (Sai et al., 2000), le 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphényl (Bager et al., 1994), les biphényls polychlorés (BPC), le clofibrate (Krutovskikh et al., 1995), le DDT (Tateno et al., 1994 ; Ruch et al. 1994) et le cadmium (Fang et al., 2001) sont tous des promoteurs de tumeurs exerçant leur activité carcinogéniques au niveau de la GJIC.

Krutovskikh et Yamasaki, (1997) ont observé une inhibition de la GJIC aux premiers stades de l'hépatocarcinogénèse expérimentale chez le rat, à l'aide d'essais de micro-injection de colorant *in vivo*. Après d'autres analyses, ils ont démontré que certains foyers préneoplastiques (EAF) présents dans le foie de ces individus n'exprimaient pas de transcrits pour la Cx32. La protéine aussi était absente. Cependant, la Cx26 était affectée différemment. En effet, le niveau de Cx26 augmentait dans les EAF. Par contre, au niveau des hépatocarcinomes, des tumeurs bien développées, les niveaux protéiques des deux connexines du foie, Cx26 et Cx32, diminuaient.

La GJIC peut être altérée différemment lors des différents stades de la cancérogenèse. En 1993, Yamasaki et al., ont démontré qu'il existe une bonne corrélation entre l'avancement de la cancérogenèse et la quantité de Cx32 présente dans le foie. En effet, plus le cancer progresse, plus la quantité de la protéine diminue. Ils ont observé une quantité décroissante de Cx32 dans les cellules non-traitées, initiées (traitées avec du N-ethyl-N-hydroxy-ethylnitrosamine (EHEN)), des cellules de foyers, des cellules de nodules hyperplastiques et des cellules de carcinomes. De plus, ils ont aussi observé que la prolifération cellulaire augmentait au fur et à mesure que la cancérogenèse progressait, et vice-versa.

Toutes ces études ont été réalisées en laboratoire chez le rat. Afin de vérifier si ces résultats sont applicables aux humains, des chercheurs ont prélevés des tissus cancéreux provenant de patients. Dans ces tissus, sans qu'il n'y ait nécessairement de baisse, il y a souvent une expression anormale des connexines. Par exemple, les études de Yamasaki (1991), Oyamada et al. (1990) et Wilgenbus et al. (1992) ont démontré qu'il n'y avait aucune différence significative de l'ARNm codant pour la Cx32 dans les

carcinomes hépatocellulaires humains, mais plutôt une augmentation de la Cx43. Cette connexine n'est normalement pas présente dans les hépatocytes humains. Par contre, elle est présente chez les cellules souches qui forment les hépatocytes, ce qui suggère une dé-différentiation des hépatocytes. Cependant, les études dans nos laboratoires suggèrent que cette théorie n'est pas valable pour l'HCB chez le rat, puisque l'ARNm de la Cx43 n'était pas augmentée, mais tendait à diminuer, sous l'influence d'un promoteur (voir article).

Finalement, plusieurs études moléculaires ont été réalisées pour mieux comprendre l'action directe des connexines et leur implication dans la cancérogenèse. Ces études sur les gènes des connexines ont été réalisées, majoritairement, sur des lignées cellulaires à l'aide de technique permettant d'inhiber ou d'exprimer un gène particulier dans ces lignées.

#### **3.5.1.1.1 Études des connexines à l'aide d'anti-sens**

Cette technique permet l'insertion d'un brin d'ADN ou d'ARN contenant une mutation anti-sens dans une cellule à l'aide d'un vecteur. Ce brin d'ADN ou d'ARN ira se lier à l'ARNm «normal» du gène produit par la cellule. Cette liaison mène à l'inhibition de l'expression du gène et à l'induction de sa dégradation, ou à l'inhibition de la traduction. Elles permettent de démontrer l'influence d'un gène dans le fonctionnement d'une cellule. Grâce à ce type d'étude, Goldberg et al. (1994) ont démontré que lorsque des cellules exprimant la Cx43 sont placées en co-culture avec des cellules tumorales, elles peuvent inhiber la croissance de la tumeur. Cependant, si ces mêmes cellules sont transfectées avec des anti-sens de Cx43, elle perdent la capacité d'inhiber la prolifération des foyers des cellules transformées. Ruch et al., 1995, ont quant à eux démontré que dans les cellules BALB/c 3T3 traitées avec des anti-sens de Cx43 il y a inhibition de la GJIC et elles croissent plus rapidement.

#### **3.5.1.1.2 Études utilisant l'inhibition dominante négative de la fonction des connexines**

Ces études consistent en l'introduction d'un gène muté dans des cellules. Les protéines produites interféreront avec les produits normaux du gène et en empêcheront le

bon fonctionnement. Pour les connexines, ces expériences résultent généralement en une mauvaise formation des canaux ce qui peut mener à un blocage de la GJIC. L'inhibition dominante négative de la Cx26 bloque la GJIC par les Cx26, augmente la croissance cellulaire et augmente la tumorigénicité des cellules transfectées (Duflot-Dancer et al., 1997). Plus récemment, par utilisation de dominant-négatifs, Krutovskikh et al. (2000) ont démontré que des cellules transfectées avec un dominant-négatif de Cx43 formaient des canaux, mais que ceux-ci étaient moins perméables et que ces cellules avaient une croissance plus rapide *in vivo*. De plus, ils ont démontré que des cellules tumorales transfectées avec une Cx43 de type sauvage (actif) perdent leur caractère cancéreux. Finalement, ils ont été en mesure de démontrer que l'emplacement des connexines dans la cellule est primordiale. Une transfection avec des dominants-négatifs qui demeurent séquestrés dans le cytoplasme n'augmente pas la croissance cellulaire.

#### **3.5.1.1.3 Études utilisant la technique de knockout pour les gènes de connexines**

La formation de souris knockout permet l'inactivation d'un gène particulier par l'insertion d'une séquence non-codante. Plusieurs lignées de souris knockout sont disponibles pour les connexines (**Tableau 2**). Cependant, quelques unes, comme pour la Cx43, sont létales à la naissance. Les souris knockout pour la Cx43 présentent des anomalies cardiaques tel un cœur élargi et anormalement développé (Reaume et al., 1995) et des problèmes avec la formation de l'aorte. Les souris knockout pour la Cx26 meurent *in utero* suite à un mauvais transport placentaires des nutriments. Des souris knockout pour la Cx32, quant à elle, démontrent un taux élevé de prolifération des hépatocytes, tant au niveau des foyers que des cellules normales, et elles sont plus susceptibles à la formation de tumeurs spontanées et induites par les carcinogènes (Temme et al., 1997). De plus, Moennikes et al. (1999) ont démontré que peu importe le background génétique des souris (lignées plus ou moins susceptibles à la formation de tumeurs), la déficience en Cx32 augmente surtout la vitesse de développement des tumeurs, plutôt que le nombre de foyers présents. Cette constatation confirme bien que le rôle de la GJIC, du point de vue de la cancérogenèse, est d'empêcher l'expansion clonale des cellules initiées.

Un des problèmes rencontrés lors de l'utilisation de souris knock-out pour les connexines est que les effets de la déficience ne s'observe pas uniquement au niveau du

tissu cible, mais peut s'exprimer au niveau de tous les tissus où cette connexine est présente. Depuis quelques années, il existe une technique, utilisant des dominants-négatifs dont l'expression est contrôlé par un gène spécifique au tissu cible, permettant de bloquer le gène dans ce seul tissu. Omori et al. (2001) ont masquée la fonction de la Cx32 dans le foie de souris, par l'utilisation du promoteur spécifique à l'albumine, qui est exprimé uniquement dans le foie. Les effets observés étaient semblables à ceux des souris knock-out sur certains points, comme une baisse de la GJIC et un délais dans la régénération du foie, mais les souris dominantes-négatives ne démontraient pas de susceptibilité au développement de tumeurs hépatiques spontanées, contrairement au souris déficientes. Cependant, il est bon de noter que, contrairement aux knock-out, il est possible que des jonctions efficaces soient formées entre les hépatocytes par les protéines de types sauvages encore présentes. Mais le plus intéressant, du point de vue de la présente recherche, est que les souris dominantes négatives pour la Cx32 hépatique demeuraient plus susceptibles à l'hépatocarcinogénèse chimique, tout comme les souris knock-out.

**Tableau 2 : Phénotypes des souris knock-out pour les connexines.**

\* tableau inspiré de Omori et al., 2001

<b>Connexine</b>	<b>Phénotype</b>	<b>Référence</b>
<b>Cx26</b>	Mauvais transfert de nutriments à travers le placenta (mort <i>in utero</i> )	Gabriel et al., 1998
<b>Cx31</b>	Légers retard du bourgeonnement des membres	Omori et al., 2001
<b>Cx32</b>	Prédisposition à la formation de tumeurs hépatiques	Temme et al., 1997 Moennikes et al., 1999
<b>Cx37</b>	Mauvaises oogenèse et ovulation (infertilité féminine)	Simon et al., 1997
<b>Cx40</b>	Arythmie cardiaque	Simon et al., 1998 Kirchhoff et al., 1998
<b>Cx43</b>	Malformations cardiaques (mort à la naissance)	Reaume et al., 1995
<b>Cx45</b>	Malformation du coussin endocardiaque (mort embryonique)	Kumai et al., 2000 Kruger et al., 2000
<b>Cx46</b>	Cataractes nucléaires	Gong et al., 1997
<b>Cx50</b>	Micro-ophtalmie et cataractes	White et al., 1998

#### 3.5.1.1.4 Études à l'aide de transfection de connexines

L'expression des connexines a été augmentée dans des lignées cellulaires malignes par transfection de l'ADNc de certaines connexines. Cette technique permet de rétablir et/ou d'améliorer l'expression d'un gène cible dans une lignée cellulaire. En transfectant une ou plusieurs connexines dans une lignée où la communication est déficiente, il est possible de rétablir cette communication. Lors de ces expériences, le taux de croissance et/ou la formation de tumeurs ont été hautement réduite, démontrant l'effet «bénéfique» d'une bonne communication pour empêcher la prolifération des

cellules initiées. Hirschi et al. (1996) ont observé un changement au niveau de la prolifération cellulaire et l'apparition de fonctions de cellules plus différenciées dans des cellules de carcinomes mammaires humains, lorsque celles-ci étaient transfectées avec la Cx26 ou la Cx43. Dans une autre étude réalisée par Naus et al., (1992), les cellules C6 transfectées avec Cx43 ont sécrété un peptide inhibiteur de croissance. Zhu et al (1991), ont également démontré que la transfection de Cx43 dans des cellules de gliomes C6 résulte en une suppression de la croissance cellulaire et de la tumorigénicité. Mesnil et al. (1995) ont obtenu un résultat semblable, soit une baisse du niveau de croissance cellulaire, en transfectant des cellules HeLa avec Cx26. Finalement, Goldberg et al. (2000) ont utilisé cette technique pour étudier les différentes fonctions des connexines 32 et 43 dans des cellules de gliomes C6. Ils ont ainsi pu observer que Cx43, mais pas Cx32, inhibait la croissance de ces cellules tumorales. De plus, le passage de molécules entre les cellules était différent selon type de connexine transfectée : le transfert de colorant était plus efficace chez les cellules transfectées avec Cx32 qu'avec Cx43, mais les macromolécules endogènes transféraient mieux avec Cx43 qu'avec Cx32. Cette étude démontre non seulement que le type de molécules passant par les jonctions lacunaires peut être spécifique aux types de connexines présentes, mais aussi que l'efficacité du passage des molécules endogènes reflète bien la capacité de contrôle de la prolifération cellulaire.

Toutes ces expériences démontrent qu'une baisse au niveau des connexines, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, peut mener à une baisse de la GJIC et amener les cellules initiées à poursuivre la cancérogenèse. Par contre, il est important de noter qu'aucune étude réalisée dans les différentes tumeurs chez les humains ne démontraient des mutations dans la région codante de connexines, incluant les hépatocarcinomes (Krutvskikh et al., 1994). Chez l'humain, des mutations au niveau de la Cx32 ont plutôt été associées à la maladie Charcot-Marie-Tooth (CMT), une maladie neurologique qui se traduit par une atrophie des membres, des problèmes sensitifs, une lente conduction nerveuses et de plusieurs autres problèmes liés à la propagation des influx nerveux (Hahn et la., 2001). Comme la Cx32 est présente au niveau dans la gaine de myéline entourant les cellules nerveuses, plus particulièrement au niveau des cellules de Schwann, son

absence crée une perte de GJIC et une baisse de la propagation des influx (Lewis, 2000 ; Abrams et al., 2001 ; Nakagawa et al., 2001). Une mutation au niveau de la Cx26 chez l'humain résulte plutôt en des problèmes auditifs. Les Cx26 sont situées au niveau des cellules de l'oreille interne. Les mutations amènent une surdité partielle ou totale (White, 2000 ; Masuda et al., 2001 ; Lefebvre et Van De Water, 2000 ; Janecke et al., 2001).

Chez les rats, quelques mutations ont été identifiées (Krutovskikh et al, 1991). Dans des hépatocarcinomes induits par l'EHEN, la présence d'une mutation faux-sens sur le gène de la Cx32 a été démontrée. Chez des rats possédant des tumeurs avec une telle localisation aberrante de la Cx32, il a été démontré que ce changement était dû à une modulation de la mobilité de la Cx32 à cause d'un changement dans structure primaire (mutation) ou d'une modification post-transcriptionnelle.

### **3.5.1.2 Changements dans la distribution des connexines**

Pour que la GJIC fonctionne adéquatement, il est nécessaire que les connexons soient non seulement bien formés, mais aussi qu'ils soient situés au bon endroit. Dans certains tissus, la baisse de la GJIC n'est pas due à une baisse des connexines, mais plutôt à un changement de leur localisation. Les connexines n'étant plus présentes à la membrane plasmique des cellules, les jonctions ne peuvent pas se former et la GJIC est interrompue. Outre les résultats obtenus par Krutovskikh et al. (1991), Omori et al. (1998) ont démontré une baisse de la GJIC due à une localisation intracytoplasmique et périnucléaire des connexines. Chez l'humain, dans des tumeurs primaires hépatiques où la GJIC était déficiente, il n'y avait pas de baisse de l'ARNm de la Cx32, mais plutôt un changement dans la localisation de la Cx32 (Budunova et al, 1995).

### **3.5.1.3 Changements dans la phosphorylation des connexines**

La plupart des connexines sont phosphorylées. Comme il a été démontré précédemment, un changement du niveau de phosphorylation peut amener une fermeture des canaux et empêcher la GJIC (voir contrôle rapide de la communication). Yamasaki (1991) a suggéré que le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate bloque la GJIC dans les

cellules exprimant Cx43. Il provoquerait l'activation de la protéine Kinase C qui phosphorylerait les connexines, ce qui inhiberait leur fonction. Musil et al. (1991) ont démontré que pour certaines connexines, comme la Cx43, la localisation cellulaire est déterminée par leur degré de phosphorylation. Une phosphorylation inadéquate peut donc amener une baisse de la GJIC soit par la fermeture des canaux, soit par un mauvais emplacement des connexines.

### **3.5.2 Influence de la GJIC sur la prolifération cellulaire**

La théorie classique de Loewenstein concernant l'implication de la GJIC dans la cancérogenèse affirmait que l'une des fonctions principales de la GJIC est de gérer le passage des facteurs du contrôle de la prolifération à travers les cellules, ce qui crée une homéostasie de la croissance cellulaire. Ce contrôle s'exerce par le passage intracellulaire direct d'informations à travers les jonctions, ou au niveau des connexines qui sont reliées au comportement de la cellule par leur influence sur l'adhésion cellulaire et/ou l'expression génique.

L'interaction entre la GJIC et la prolifération cellulaire a été démontrée par plusieurs études. Comme il a été mentionné précédemment, il existe une relation inverse entre les capacités de communication et de prolifération et la GJIC et le développement de la cancérogenèse (Yamasaki et al., 1993, p.18). Par la transfection de gènes de connexines, il est possible de restaurer une GJIC déficiente dans des cellules tumorales (Omori et al. 1998, p.20) et de baisser le taux de croissance cellulaire. Finalement, une stimulation de la croissance par différents types de mitogènes baisse la GJIC dramatiquement. Au contraire, l'inhibition de la croissance augmente le couplage cellulaire par les jonctions lacunaires.

Dans un foie de rat adulte, les hépatocytes sont très bien reliés par des jonctions lacunaires et seulement une petite proportion sont en répllication (<1%), les autres étant stationnaires en phase G0. Toutefois, ils peuvent entrer en division de façon synchronisée lors d'une hépatectomie partielle. Cette technique a permis d'observer des changements significatifs au niveau de la GJIC lors de la prolifération (Yamasaki et al., 1993 ; Meyer et al., 1981 ; Traub et al., 1983 ; Dermietzel et al., 1987). Dans les trois heures suivant la chirurgie, on observe une baisse de Cx32, ce qui suggèrent une baisse de

la GJIC. À douze heures, il y a induction de la phase S du cycle cellulaire. Il y aurait donc un blocage de la GJIC précédant la phase S, probablement afin de laisser un contrôle individuel de la prolifération. Le niveau de Cx32 continue de baisser pendant 24 heures, où l'indice de prolifération atteint son maximum. Tous ces changements montrent une régulation importante de la communication intercellulaire lors du cycle cellulaire, ce qui amène à penser que le rôle des GJIC change selon le cycle cellulaire.

De plus, lorsqu'on synchronise de façon artificielle des cellules en culture, on observe une baisse de la GJIC en fin de phase G1 et lors de la mitose (Gordon et al., 1982 ; Stein et al., 1992). Koo et al. (1997) ont démontré que cette baisse de la GJIC en G1 correspond avec un changement de phosphorylation de Cx43 par la protéine kinase C.

La GJIC est probablement un mécanisme du contrôle de la croissance cellulaire qui fonctionne de façon coordonnée avec d'autres processus : réponse aux facteurs de croissance et aux signaux de transduction, le contrôle du cycle cellulaire, la réponse des cellules à la matrice extracellulaire et aux molécules d'adhésion cellule-cellule. Cette influence de la GJIC sur la prolifération cellulaire en fait une bonne cible pour les agents promoteurs de tumeurs.

De toutes ces études, plusieurs conclusions peuvent être tirées. Cependant, il est important de retenir que les connexines jouent un rôle primordial dans la GJIC. Sans leur fonctionnement adéquat, les organismes sont prédisposés de façon importante au développement de tumeurs. De plus, contrairement aux rares altérations génétiques, les mécanismes épigénétiques semblent jouer un rôle essentiel dans l'altération de la GJIC par les connexines durant la cancérogenèse, en abaissant leur transcription ou leur traduction, ou en changeant leur localisation ou leur niveau de phosphorylation. Ils permettent de libérer les cellules du contrôle des autres cellules et leur permet ainsi de proliférer de façon clonale. Les carcinogènes peuvent aussi venir moduler la GJIC à d'autre niveau. Les mécanismes mentionnés précédemment vont surtout être présents lors de la promotion de la cancérogenèse et donc être réversibles. Cependant, lors de la progression, la GJIC peut être bloqué de façon définitive par d'autres mécanismes, dont l'activation d'oncogènes.

### 3.5.3 Inhibition de la GJIC par des oncogènes

Comme il a été mentionné précédemment, les oncogènes sont importants au niveau du contrôle de la cellule. Ce sont des gènes codant pour des protéines essentielles à la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose. Lors du stade de la progression, il se produit des mutations qui feront progresser la tumeur vers un stade encore plus transformé. Ces mutations sont souvent au niveau des oncogènes. Ceux-ci peuvent moduler la GJIC et les facteurs nucléaires et interagir lors de la cancérogenèse. Certaines études ont démontré que des oncogènes (*src*, SV40, antigène T, *neu*, *ras*, *fps*) peuvent inhiber la GJIC (Yamasaki, 1991). En général, dans différentes lignées cellulaires, ils inhibent la perméabilité des canaux ce qui bloque la GJIC (Budunova et al., 1995). De plus, ils peuvent coopérer entre eux pour exercer leur fonction : *raf* ou *myc* ne sont pas capables d'inhiber la GJIC dans les cellules de l'épithélium du foie de rat, mais lorsqu'ils sont mis ensemble, la GJIC est inhibée (Trosko et Ruch, 1998). Plus récemment, DeoCampo et al. (2000) ont démontré que *v-myc* et *blc-2* peuvent coopérer dans les cellules épithéliales de foie de rat pour transformer des cellules normales, mais que leur efficacité est facteur de la capacité à communiquer des cellules. Finalement, Rumsby et al. (1992) ont démontré que dans des souris surexposées en Fer (Iron-Overloaded-mice), l'exposition à l'HCB peut causer une mutation dans le gène *Ha-ras*. Bien que cette mutation soit rare, il est important de noter qu'elle peut être reliée à une baisse de GJIC.

Ces études, résumées dans le **tableau 3**, démontrent bien comment les oncogènes et les suppresseurs de tumeur peuvent interférer avec la GJIC pour favoriser le développement d'un cancer en engendrant un processus irréversible.

**Tableau 3 : Oncogènes interagissant avec la communication intercellulaire via les jonction lacunaires.**

\* inspiré de Ruch (1994) et de Hotz-Wagenblatt et Shalloway (1993)

Oncogène	Effet sur la GJIC	Tissu(s) utilisé(s)	Mécanisme
v-src, c-src	Baisse	Fibroblastes	Phosphorylation des Cxs
EJ-Ha-ras	Baisse	Fibroblastes et Cellules épithéliales de foie	Phosphorylation et baisse de l'expression des Cxs
SV40	Baisse	Fibroblastes embryonnique de rat et cellules des ilos du pancréas	?
v-raf + c-myc	Baisse	Cellules épithéliales de foie	?
neu-1A	Baisse	Cellules épithéliales de foie	Perturbe la formation des jonctions
v-myc +blc-2	Leur action oncogénique dépend de l'efficacité de la GJIC	Cellules épithéliales de foie	?

### 3.6 Les perspectives de traitement du cancer impliquant la GJIC

Les polluants de l'environnement sont souvent des promoteurs de tumeurs. Il a été démontré que plusieurs d'entre eux exercent leur influence en bloquant la GJIC, ce qui permet l'expansion clonale des cellules initiées lors de la promotion. Comme il a été mentionné précédemment, la promotion est un stade réversible lors de la cancérogenèse. En rétablissant la GJIC, le processus menant au cancer peut être arrêté. Cette phase du cancer en fait une bonne cible pour combattre la progression de la maladie.

Cette perspective a été envisagée au cours des dernières années. Plusieurs se sont penchés sur les effets de certains produits thérapeutiques sur la GJIC et sur les tumeurs induites par des promoteurs. Niessen et al. (2000) ont démontré que le Resveratrol, un polyphénol produit par les plantes pour combattre les attaques des pathogènes et largement présent dans les raisins, le vin et plusieurs autres fruits et légumes consommés par les humains, pouvait non seulement améliorer la GJIC dans des cellules épithéliales de rats, mais il pouvait aussi la rétablir suite à une inhibition par le DDT ou le TPA. Kang et al. (2000 et 2001) ont démontré des effets semblables en utilisant du TPA et/ou du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme promoteurs, et de l'épicatéchine et du ginsenoside (deux composantes du thé vert) ou du dioxyde de germanium (un produit retrouvé dans la chair de crabe crue, dans le thon en conserve, dans le poisson séché, dans le jus de tomates...). Les effets bénéfiques du thé vert ont aussi été démontrés par Sai et al. (2000). Finalement, Na et al. (2000) ont utilisé de l'ester phénéthyl de l'acide cafféique (provenant du propolis des abeilles) pour rétablir la GJIC dans des cellules épithéliales de foie transformées par *ras*.

Toutes ces études démontrent bien l'importance de la GJIC dans la prévention de la cancérogenèse. Une cellule initiée ne pourra proliférer que si elle coupe ses liens avec les autres cellules. Autrement, les cellules environnantes bloqueront sa croissance par des signaux traversant les jonctions lacunaires afin de maintenir l'homéostasie dans le tissu (Wislon et al. 2000 ; résumé dans Kanno, 1985). Les substances carcinogènes peuvent agir à différents niveaux pour moduler la GJIC et favoriser le cancer. Cependant, le stade de la promotion demeure la cible de choix de plusieurs polluants environnementaux, comme c'est le cas pour l'HCB. Il apparaît donc qu'une baisse de la GJIC, plus particulièrement un changement du niveau de Cx32, soit un indicateur de cancérogenèse dans le foie. Une baisse de la Cx32 pourrait donc servir de marqueur de la cancérogenèse

dans le foie et être très utile pour la détermination de l'exposition limite acceptable de la population aux polluants et ainsi pouvoir mieux réglementer leur utilisation.



## HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Suite à la lecture des trois sections du chapitre précédent, différents points peuvent être mis en évidence. Tout d'abord, l'HCB est un polluant très présent dans l'environnement et sa capacité à promouvoir la formation de tumeurs hépatiques a été pleinement démontrée. De plus, les femelles sont plus susceptibles que les mâles à cette formation.

Deuxièmement, la GJIC est impliquée à de nombreux stades de la cancérogenèse et elle peut être une cible de choix pour les promoteurs de tumeurs. Ceux-ci peuvent agir à différents niveaux, de la transcription des connexines jusqu'à la communication intercellulaire elle-même.

Finalement, il n'existe pas de mécanismes connus de la cancérogenèse hépatique induite par l'HCB chez le rat. Ce manque d'information fait en sorte que la réglementation de son utilisation est basée sur une dose maximale d'exposition non adéquate car basée sur un mécanisme génotoxique.

Tenant compte de tous ces faits, l'objectif principal de ce projet de recherche était d'étudier les mécanismes par lesquels l'HCB promouvoit la formation de tumeurs hépatiques chez le rat de façon spécifique aux femelles. L'hypothèse de recherche est que l'HCB exerce son action épigénétique en modulant la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires, libérant ainsi les cellules initiées du contrôle des cellules avoisinantes et leur permettant de croître de façon clonale, sans l'emprise des autres cellules.

Cette analyse comportait différents sous-objectifs. Le premier objectif était d'étudier les effets de l'HCB sur la régulation et de l'expression des connexines en regardant les niveaux d'ARNm par analyse de type Northern et les niveaux protéiques par analyses de type Western, puis de vérifier si la communication entre les cellules par les jonctions lacunaires était réellement altérée à l'aide de transfert de colorant.

Il a été démontré dans plusieurs études que la porphyrie induite par l'HCB est présente uniquement chez les femelles et qu'elle est grandement influencée par l'estradiol. De plus, dans plusieurs tissus, l'expression des connexines (niveau d'ARNm) est modulée par les hormones sexuelles. Il apparaît donc probable que les hormones

sexuelles jouent un rôle dans l'expression des connexines et/ou dans le mécanisme d'action de l'HCB. Ainsi, le deuxième objectif visait à comparer les niveaux d'expression des connexines dans le foie chez les mâles et les femelles, puis chez les femelles intactes, les ovariectomisées et les ovariectomisées recevant une dose physiologique d'estradiol à l'aide d'un implant. Cette expérience a permis de vérifier s'il existait des différences au niveau de la régulation des connexines pouvant prédisposer les femelles au développement de tumeurs hépatiques.

Enfin, le dernier objectif était de vérifier si les différences entre les mâles et les femelles trouvées lors de la deuxième étape étaient responsables de la susceptibilité des femelles au développement de tumeurs hépatiques.

Les résultats des analyses réalisées au cours de ce projet ainsi que les méthodes utilisées pour les obtenir sont compilés dans un article constituant le deuxième chapitre de ce mémoire.

## SECONDE PARTIE : ARTICLE

### **Decreased Gap Junctional Intercellular Communication In Hexachlorobenzene-Induced Gender-Specific Hepatic Tumor Formation In The Rat**

#### **1. Résumé français de l'article**

L'hexachlorobenzène (HCB) est un carcinogène épigénétique très répandu dans l'environnement de par son utilisation massive dans les années passées, sa synthèse industrielle et sa bio-accumulation. La présence de l'HCB a été démontrée dans les tissus humains et animaux. Lorsque des rats sont exposés à l'HCB, seules les femelles développent des cancers suite à l'administration d'un initiateur de tumeurs.

Plusieurs polluants épigénétiques induisent la formation de cancers en modulant la communication intercellulaire, plus particulièrement au niveau des jonctions lacunaires (GJIC). L'objectif de ce projet était de caractériser la prédisposition des femelles au développement de tumeurs hépatiques induites par l'HCB. Selon l'hypothèse de recherche, l'HCB exercerait son action en modulant l'expression des connexines (Cxs, protéines formant les jonctions lacunaires) dans le foie des rats femelles, ce qui amènerait une baisse de la communication entre les cellules et favoriserait le développement de tumeurs cancéreuses.

Pour évaluer l'effet sur les jonctions lacunaires, des rats mâles et femelles ont été exposés à l'HCB durant cinq jours consécutifs. Les résultats ont démontré une baisse des ARNm codant pour Cx26 et Cx32 uniquement chez les femelles traitées à l'HCB. Par la suite, des analyses Western ont confirmé cette double diminution au niveau protéique. Ces modulations amènent une inhibition de la GJIC.

Les résultats expérimentaux ont aussi démontré qu'il existe un dimorphisme sexuel au niveau des Cxs dans le foie de rat. Pour étudier la régulation de l'expression menant à ce dimorphisme, des rats femelles ont été ovariectomisées (OV) et la moitié

d'entre elles ont reçu un implant afin de maintenir un niveau physiologique d'estradiol. Les analyses ont démontré une modulation ovarienne chez la femelle, qui augmente le niveau d'ARNm de Cx26, mais abaisse le niveau de Cx32 par rapport aux femelles OV. De plus, l'estradiol joue un rôle partiel de rétro-inhibition dans la régulation de l'expression de Cx32, mais n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm de Cx26.

Afin de vérifier si ces modulations étaient responsables de la prédisposition des femelles à la formation de tumeurs hépatiques, des femelles intactes et des femelles OV ont été traitées à l'HCB et comparées à leur correspondantes non-traitées. Les résultats ont démontré que les femelles ovariectomisées tout comme les femelles intactes traitées à l'HCB avaient des niveaux inférieurs de Cx26 et de Cx32 comparativement aux femelles ovariectomisées et intactes non-exposées.

Cette étude a permis de suggérer que l'HCB favorise la formation de tumeurs hépatiques induites par l'HCB chez les rats femelles en modulant l'expression des Cxs et en inhibant la GJIC. De plus, il existe un dimorphisme au niveau des Cxs hépatiques chez les rats modulé par les ovaires. Cependant, l'HCB exercerait son action épigénétique en modulant la GJIC par un mécanisme non-ovarien.

## **2. Contribution de l'étudiant**

Lors de la première expérience, les animaux, mâles et femelles, furent traités et sacrifiés par Ruppert Abdalian et Guylaine Lassonde, respectivement stagiaire d'été et technicienne dans les laboratoires des Docteurs Cyr et Charbonneau. Les analyses de type Northern, uniquement pour cette expérience, ont aussi été réalisées par Ruppert Abdalian. Toutes les autres expériences et la rédaction de ce chapitre ont été réalisées par l'étudiante dans le cadre de ce projet de maîtrise.

Decreased Gap Junctional Intercellular Communication In Hexachlorobenzene-Induced  
Gender-Specific Hepatic Tumor Formation In The Rat

Isabelle Plante, Michel Charbonneau and Daniel G. Cyr

Centre de recherche en santé humaine, INRS-Institut Armand-Frappier,  
Université du Québec, Pointe-Claire, QC, Canada.

Running Title : HCB alterations of hepatic connexins

Article soumis à la revue Cancer Research (2001)

Address for correspondence :

Dr Daniel Cyr  
INRS-Institut Armand Frappier  
245 Hymus boulevard  
Pointe Claire, QC, H9R 1G6  
Tel. (514) 630-8833  
Fax (514) 630-8850  
e-mail: [daniel.cyr@inrs-sante.quebec.ca](mailto:daniel.cyr@inrs-sante.quebec.ca)



## ABSTRACT

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread environmental pollutant. As an epigenetic carcinogen, HCB induces the formation of liver tumors in female rats, whereas only a small percentage of males are responsive. Intercellular communication via gap junctions is associated with carcinogenesis. Gap junctions are composed of proteins termed connexins (Cxs). There are two Cxs in the liver, Cx26 and Cx32. The objectives of this study were to determine: 1) if HCB-induced tumor development is associated with a loss of gap junctional communication; 2) whether or not HCB causes a gender-specific decrease in the expression of Cx32 and Cx26; 3) if these effects result from a gender difference in the constitutive expression of these Cxs. Rats were given HCB by gavage during five consecutive days. In a first series of experiments, control and HCB-treated female rats were sampled on day 100, a time when diethylnitrosamine injection can initiate the development of tumors. Gap junctional intercellular communication was measured using the incision-loading/dye-transfer method; a significant decrease has been found in HCB-treated females as compared to controls. To investigate whether or not changes in Cxs levels were present early in the day 5 to 100 period and to look at the gender-related tumor promotion, in a second series of experiments, male and female rats were sampled on day 50. Hepatic mRNA levels for Cx26 and Cx32 were significantly lower in livers of HCB-treated females when compared to controls, whereas in males there were no differences between controls and HCB-treated. Furthermore, Cx26 and Cx32 mRNA levels were respectively 3-fold higher and 8-fold lower in females compared to males. In a third series of experiments, ovariectomy abolished any differences between males and females for both Cxs 10 days after surgery and estradiol had a partial role in the regulation of Cx32 mRNA levels, thereby suggesting that the sexual dimorphism in

hepatic Cxs levels is determined by the ovarian hormones. However, HCB-induced decreased Cx32 and Cx26 mRNA levels was maintained in OV rats suggesting that these effects are not mediated via an ovary-dependent pathway. Overall results show that HCB exposure induces gender-specific long-term alterations in intercellular gap junctional communication in female rat liver, an effect believed to be pivotal in the mechanism of HCB-induced liver carcinogenesis and tumor promotion.

## INTRODUCTION

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread environmental contaminant, which has been used as a fungicide and as a byproduct of industrial processes. While the use of HCB as a fungicide has been banned in most industrialized countries, it is a persistent contaminant which is still present in the environment (1-3). Exposure to HCB has been linked to the development of porphyria and hepatic cancer (3- 8).

Previous studies in rodents have shown that HCB is an epigenetic carcinogen, i.e. that does not cause DNA mutations. Studies from our laboratory have shown that short-term exposure (5 days) to HCB renders females more susceptible than males to develop porphyria, which begins approximately 40 days after the end of the HCB treatment (9). Furthermore, the administration of the tumor initiator, diethylnitrosamine (DEN), 95 days after the end of treatment results in the development of hepatic tumors in females, with few males exhibiting tumors. This gender-specific effect of HCB in the liver has also been reported by others (10-13). This observation not only allows us to use this exposure model to study the mechanisms of action of HCB but also provides a unique model to address gender-specific tumor formation.

Gap junctions form transmembrane channels between adjacent cells which permit bidirectional communication between cells by selectively allowing the passage of small molecules (<1kDa) including secondary messengers (eg. IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>, cAMP). Gap junctions are formed by a family of integral transmembrane proteins termed connexins (Cx). Cx subunits oligomerize in the trans-Golgi network to form hemichannels or connexons, which consist of six Cxs arranged radially around a central pore. In adult rat hepatocytes

there are two main connexins which modulate intercellular communication: Cx32 and Cx26.

Several studies have shown that gap junctional communication is decreased in carcinogenesis (14). While the reason for this loss of intercellular communication has not been completely elucidated, it has been suggested that the loss of apoptotic control from adjacent cells may be essential in the tumor development (15). Furthermore, the loss of cell-cell interactions between adjacent cells may be necessary for the clonal expansion of tumors.

The objective of this study was to determine whether or not HCB-induced tumor development was associated with a loss of gap junctional communication and a gender-specific decrease in the expression of Cx32 and Cx26, and whether these effects result from differences in the constitutive expression of these connexins between males and females.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and Experimental Protocol*

*Animals:* Male and female Sprague-Dawley rats (180-200 g) were purchased from Charles River Canada Inc. (St. Constant, QC). Rats were maintained under a constant photoperiod of 12h-light:12h-dark and received food and water *ad libitum*. All animal protocols used in this study were approved by the University Animal Care Committee.

*Experiment 1:* In order to determine if there was an alteration in hepatic gap junctional communication at day 100 (day of DEN injection (9)), an experiment was done

using two experimental groups of female rats divided into: control and HCB-treated. Rats were administered HCB (100 mg/kg) or vehicle (corn oil, controls) by gavage for 5 consecutive days. Rats were sampled 95 days after the end of the HCB treatment and the livers were used to assess junctional communication by dye transfer.

*Experiment 2:* Female and male rats were divided into four experimental groups : Control females, control males, HCB-treated females and HCB-treated males. Each group consisted of 6 rats, except for HCB-treated females (n=7). Rats were administered HCB (100 mg/kg body weight) by gavage every day for 5 consecutive days. Controls received vehicle only (corn oil). Rats were then sampled 45 days after the last HCB treatment (day 50 of the experiment, in the early phase of porphyria (9)). Rats were anesthetized with xylazine/ketamine (50:10 mg/kg), the livers removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -86 °C in order to determine the effects of HCB on hepatic Cx32 and Cx26 mRNA levels using Northern blot analysis and on Cx protein levels using Western blot analysis.

*Experiment 3:* To assess whether or not differences in the constitutive expression of Cx32 and Cx26 mRNA levels in rat hepatocytes were due to ovarian estrogens, an experiment was done using three experimental groups of female rats: Intact controls, ovariectomized (OV), ovariectomized given a silastic implant of estradiol (OV + E2). Each group consisted of 10 individuals. Rats were sampled 10 days after surgery. Estradiol-filled polydimethylsiloxane capsules were prepared according to the method outlined by Stratton et al. (16) and have well characterized steroid release rates (17).

Ovariectomized rats were implanted with either an empty capsule (1.6 cm) or a capsule filled with 17 $\beta$ -estradiol. The latter mimics serum estradiol levels. Capsules were maintained in a solution of 2% bovine serum albumin for 3-days prior to the start of the experiment ensuring that the newly made capsules had a constant estradiol release rate. Rats were killed 10 days after surgery, the livers were removed and frozen in liquid nitrogen and stored at -86 °C.

*Experiment 4:* To assess whether or not ovarian hormones modulated the HCB response, an experiment was done using four groups of female rats: Intact controls, HCB-treated, ovariectomized as well as an ovariectomized and HCB-treated group. There were 6 animals in each experimental group. Rats were ovariectomized (control were sham operated) and HCB treatment was initiated three days after surgery. Rats were given HCB (100 mg/kg) by gavage for 5 consecutive days; intact controls and OV rats received vehicle alone (corn oil). Rats were sampled 5 and 40 days after the end of the HCB treatment. The liver from each rat was removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -86 °C in order to determine hepatic Cx32 and Cx26 mRNA levels using Northern blot analysis.

#### ***Northern blot analysis***

Northern blot analysis was done on total cellular RNA isolated from the liver. RNA was isolated using the guanidinium isothiocyanate method (18) and a 10  $\mu$ g aliquot of total RNA was separated by electrophoresis in a 1.2% agarose-formaldehyde gel. The

RNA was then transferred onto a charged nylon membrane (Genescreen plus, Dupont Chemicals, Mississauga, ON) as previously described (19).

Full-length Cx26 and Cx32 cDNA probes were obtained as generous gifts from Drs. B. Nicholson (SUNY, Buffalo, NY) and D. Paul (Harvard Univ., Cambridge, MA). The cDNA probes were labeled by random priming with  $^{32}\text{P}$ -dCTP (Oligonucleotide Labelling Kit, Pharmacia-Amersham Biotech, Baie D'Urfé, QC; (20). Each Northern blot was standardized for RNA loading by hybridizing the membranes with an end-labeled oligonucleotide probe recognizing the 18S rRNA (20). Hybridizations of the cDNA probes and 18S rRNA probes were done as previously described (19). The resulting unsaturated phosphorimages were scanned using a Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager SI<sup>TM</sup> Molecular Dynamics) and the integrated area under the curve for each signal was standardized against the signal for the 18S rRNA to determine the relative levels of either Cx32 or Cx26 mRNA.

### ***Western Blot Analyses***

Frozen liver samples were homogenized in buffer (0.25mM sucrose; 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mg/ml leupeptine; 50 mg/ml aproptinine; 25 mg/ml pepstatine; 50 mg/ml anti-pain; 2.5g/ml PMSF) and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant containing the gap junctions was removed and its protein content determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON).

Protein samples (50µg) were diluted in loading buffer (Laemmli buffer), and loaded onto a 12% polyacrylamide gel with a 5% stacking gel (21). Electrophoresis was done at 120 V for 1.5 hrs until the dye front reached the end of the gel.

The gel was removed from the glass plates, and the proteins transferred onto a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad Transblot apparatus at 100 V for 45 min in transfer buffer (25 mM Tris-Base, 0.195 M Glycine, 0.1% SDS, 20 % methanol and 2mM CaCl<sub>2</sub>). At the end of the transfer, the membrane was removed. The transfer of proteins was determined by staining with a solution of Ponceau Red S (0.5% Ponceau, 1% acetic acid). Nitrocellulose membranes containing the transferred proteins were then blocked overnight with Tris Buffered Saline (TBS) buffer (100 mM TRIS, 154 mM NaCl) containing 0.1% tween and 5% Carnation instant milk. Membranes were then incubated for 1.5 hrs at room temperature with primary antisera (rabbit anti-mouse Cx26 or mouse anti-rabbit Cx32; Chemicon Int'l, Temecula, CA). The membranes were washed three times with TBS containing 0.1% tween and subsequently incubated for 45 min at room temperature with secondary antibody (anti-rabbit-IgG conjugated to an alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; or anti-mouse conjugate to peroxidase; Sigma Chemicals, Mississauga, ON). Signal detection was done according the manufacturers recommendations.

To standardize for protein loading, the membranes were probed for actin. Membranes were incubated 1 hr with monoclonal mouse anti-actin (Sigma Chemicals). The membranes were washed three times with TBS containing 0.1% tween and subsequently incubated for 1 hr at room temperature with secondary antibody (anti-mouse-IgG conjugated to peroxidase, Sigma Chemicals). Signal detection was done according the manufacturers recommendations.

### *Incision Loading Dye Transfer*

At the time of sampling, livers were excised and a transversal incision was made on one of the lobes of the liver according to the methods of Sai et al. (22). A 100  $\mu$ l aliquot of a dye mixture (0.5% Lucifer Yellow (Sigma Chemicals); 0.5% rhodamine-Dextran (Sigma Chemicals) in PBS) was placed in the incision. Following the addition of the dye mixture, three longitudinal incisions were made, across the initial incision and an additional 100  $\mu$ l aliquot of dye mixture was added to each incision. Samples were incubated for 3 min at room temperature and subsequently washed in PBS. A sample of the liver was then placed in buffered formalin (10%) overnight, dehydrated and embedded in paraffin. Lucifer Yellow (YL) and Rhodamine-Dextran (RhD) transfer were detected by fluorescence microscopy. The RhD migration was used to assess the non-specific transfer while the YL was used to determine gap junction specific transfer (22). The extent of the dye migration was determined using digital images that were analyzed using the ImagePro Plus computer program (Media Cybernetics, Silver Spring MD). Two to three sites per incision were randomly evaluated for dye migration. Means of each animal were used to evaluate differences between groups.

### *Statistics*

To determine whether there were differences in either Cx32 or Cx26 mRNA or protein levels, the data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov tests while the Levine median test was done for equal variance. Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed a posteriori by a Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons between experimental groups. Significance was established

at  $P < 0.05$ . All analyses were done using the SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

## RESULTS

*Experiment 1.* The functionality of gap junctional intercellular communication was determined using incision-loading/dye transfer method as described (22). This method evaluates intercellular communication *in vivo* by tracking RhD as an indicator of non-specific dye migration (Figure 1Ai) and LY as an indicator of gap junctional communication (Figure 1Aii). The distance of migration for the latter is measured on a picture combining the two dye readings (Figure 1Aiii). Animals were sampled at day 100 of the experiment to test effects of HCB on gap junctional communication since this is the time when DEN was injected in our previous study showing a gender-specific promotion of liver tumors in female rats. Results indicate that in HCB-treated females (Figure 1Bii) gap junctional communication was significantly decreased compared to controls (Figure 1Bi) by approximately 36% (Figure 1C).

*Experiment 2.* Female rats treated with HCB and sampled 45 days following the end of the HCB treatment (day 50 of the experiment), i.e. in the middle of the period of time between the gavage phase and the DEN injection in the promotion study, had significantly lower levels of Cx32 (Figure A) and Cx26 (Figure 2B) mRNA levels compared to females given vehicle alone (controls). Cx26 mRNA levels were approximately 40% lower in treated females compared to controls, while Cx32 mRNA levels were approximately 30 % lower. There were no significant differences in either Cx32 (Figure 2C) or Cx26 (Figure 2D) mRNA levels between control and HCB-treated

males. This is consistent with the fact that only female rats are sensitive to HCB tumor promotion.

While Cx26 and Cx32 mRNA levels were not altered in the male rats, it is interesting to note that there are important differences in basal levels of these two Cxs between males and females. Indeed, Cx26 mRNA levels were almost 3-fold higher in female rats as compared to males, while Cx32 mRNA levels are 8-fold higher in male rats (see control levels in Figure 2A to D).

In order to establish whether or not the HCB-decreases in Cx26 and Cx32 mRNA also occurred at the protein level, liver samples of control and HCB-treated female rats were subjected to Western blot analysis. The results indicate that at the protein level, the effects of HCB are in fact much more pronounced as Cx26 protein levels were approximately 90% lower in HCB-treated rats (Figure 3B), while Cx32 levels were decreased by 63% compared to female control rats (Figure 3A).

*Experiment 3.* The differences in Cx32 and Cx26 mRNA levels between control males and females suggest that ovarian hormones may be important regulators of hepatic connexin mRNA levels. To establish whether or not this was the case we compared Cx26 and Cx32 mRNA levels in the livers of intact control females with levels in ovariectomized (OV) and ovariectomized with estradiol (OV + E2) maintained females.

Northern blot analysis indicated that hepatic Cx26 mRNA levels in OV females were approximately 66% lower than levels in intact controls (Figure 4B), while Cx32 mRNA levels were 6-fold higher in OV females (Figure 4A). The difference between intact controls and OV rats is almost identical to the difference observed in the basal expression of these two connexins between males and females. Interestingly, estradiol

maintenance did not alter Cx26 mRNA levels when levels were compared to levels in OV rats thereby suggesting that the differences in connexin mRNA levels is not the result of a loss of circulating estradiol in OV rats. Unlike Cx26 mRNA levels, Cx32 mRNA levels appear to be partially regulated by estradiol as levels were significantly lower in OV + E2 rats than levels found in OV rats. However, Cx32 mRNA levels remained significantly elevated as compared to intact controls, suggesting that other ovarian factors may contribute to the regulation of steady-state hepatic Cx32 mRNA levels (Figure 4).

***Experiment 4.*** The results from the first two experiments indicate that the ovary and ovarian hormones may be important regulators of hepatic Cx26 and Cx32 mRNA levels. In this experiment we wanted to assess whether or not the ovary could influence the HCB response with respect to hepatic Cx26 and Cx32 mRNA levels. To address this objective an experiment was designed using four experimental groups of female rats : a control group, an HCB-treated group, an OV group, and an HCB-treated OV group (OV-HCB). Rats were sampled on day 45 of the experiment.

Both Cx26 and Cx32 mRNA levels were lower in the HCB-treated group as compared to control female rats (Figure 5). Ovariectomy resulted in a significant decrease in Cx26 mRNA levels of almost 75% (Figure 5B). Interestingly, Cx32 mRNA level were not significantly different from controls (Figure 5A) suggesting that the increase levels observed 10 days after ovariectomy may be transitory. Furthermore, there was also a decrease in both Cx32 and Cx26 mRNA levels in the OV-HCB group compared to the OV group (Figure 5). This suggests that HCB-induced lower hepatic Cx32 and Cx26 mRNA levels are not mediated via an ovary-mediated pathway.

## DISCUSSION

HCB promotes gender-specific tumor formation in female rat livers (10, 11). The mechanism responsible for this gender-specific effect is unknown. It has been shown that the formation of tumors is associated with a loss of intercellular communication (23-26). In the present study we have demonstrated that HCB administration resulted in significantly lower levels of both Cx32 and Cx26 mRNA and protein levels in the liver of female rats sampled 45 days after the last administration of HCB (Figures 2 and 3). Interestingly, Cx32 and Cx26 mRNA and protein levels in the liver of male rats who received an identical exposure to HCB were not significantly different from vehicle-exposed controls. Since female rats develop hepatic tumors, our results suggest that decreased Cx32 and Cx26 expression as well as decreased gap junctional intercellular communication is associated specifically with carcinogenesis.

Several studies have reported that intercellular communication is decreased during carcinogenesis. In fact it has been suggested that the majority of malignant tumors have altered intercellular communication. While it has not been clearly established why there is aberrant gap junctional intercellular communication in tumor cells, transfecting malignant cells with certain connexins, such as Cx26, can decrease tumor progression, thereby suggesting that connexins and gap junctional communication can act as tumor suppressors (27). What is particularly interesting with the present observations is that HCB decreases gap junctional communication prior to the formation of hepatic tumors in female rats. This suggests that the decreased expression of cellular Cxs and gap junctional communication is an early event in the process of chemically-induced liver carcinogenesis. In fact, Cx32 may serve as an early marker of liver tumors, as it has been suggested that the loss of Cx43 expression can serve as a marker of breast tumors (28).

Furthermore, since HCB is an epigenetic carcinogen, it is unlikely that HCB exposure is resulting in mutations to either Cx32 or Cx26 but that their expression is altered via other intracellular pathways.

While other organochlorines such as TCDD (29), pentachlorophenol (22), 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (30), polychlorinated biphenyls, clofibrate (31), DDT (32, 33) and the metal cadmium (34) have all been shown to decrease gap junctional communication, HCB is the only chemical to our knowledge which causes gender-specific decreased gap junctional communication. While other environmental carcinogens such as PCBs, TCDD and polybrominatedbiphenyls (PBBs) have been suggested to cause female-specific hepatic tumors it is not known whether or not these chemicals act via similar mechanisms as HCB (10).

Our present data suggest that there exists a sexual dimorphism in Cx32 and Cx26 mRNA levels of control rats. This dimorphism may be responsible for rendering female rat livers more susceptible to the formation of hepatic tumors than their male counterparts. In order to determine whether the sex differences were the result of ovary and estradiol, an experiment was undertaken to determine how hepatic Cxs are regulated by the ovary. In ovariectomized rats, Cx26 mRNA levels were around 3-fold lower than intact controls. In ovariectomized rats given an estradiol implant to maintain circulating estradiol levels, Cx26 mRNA levels remained significantly lower than controls, and were not significantly different from levels observed in ovariectomized rats. These data indicate that while the ovary appears to be an important regulator of hepatic Cx26 mRNA levels, estradiol does not appear to be responsible for this regulation. While it is difficult to establish which other ovarian factors are responsible for regulating Cx26, other studies

have reported that progesterone can regulate Cx mRNA levels in the uterus (35). Further studies will be necessary to establish if progesterone regulates Cx26 in the liver.

Cx32 mRNA levels were significantly higher in OV rats sampled 10 days after surgery. Unlike Cx26, Cx32 mRNA levels were decreased in OV rats given estradiol, although this decrease did not maintain Cx32 mRNA levels to control levels. This suggests that estradiol can only partially regulate Cx32 mRNA levels and that other unidentified factors contribute to the regulation of hepatic Cx32. The ovarian regulation of hepatic Cx32 mRNA levels however, appears to be transitory since in OV rats sampled 45 days after surgery Cx32 mRNA levels are not significantly different from intact control rats. Several studies have reported that either cellular levels or the cellular distribution of Cxs in a variety of tissues can be influenced by steroid hormones (36-41). While in many of these studies estradiol results in increased Cx levels, clearly our data indicate that in the liver estradiol down regulates Cx32 or does not influence Cx26 mRNA levels. Our results indicate that the ovary and, most likely, ovarian hormones are responsible for the sexual dimorphism in hepatic Cx26 and Cx32 mRNA levels of control rats.

In OV rats sampled at day 45, HCB decreased both Cx26 and Cx32 mRNA levels, despite the fact that Cx26 mRNA levels were already depressed as a result of the ovariectomy. This suggests that the effects of HCB are not mediated via a peripheral action of HCB on the ovary but is most likely the result of a direct effect of HCB on the liver. This is particularly interesting since HCB did not alter Cx26 and Cx32 mRNA levels in the males (Fig. 2), thereby indicating that the gender-dependent differences in Cx26 and Cx32 mRNA levels are attributable to non-ovarian factors.

Cx32 is approximately 10 times more abundant than Cx26 in the liver. The importance of both Cxs in promoter-induced tumors may therefore be different. It has been demonstrated using mutated Cx32 transgenic mice, that a lack of Cx32 results in a higher incidence of spontaneous and chemically-induced hepatic tumors (42). Omori et al. (43) have recently reported, using transgenic mice in which mutated Cx32 was specifically expressed in the liver, thereby decreasing gap junctional communication, that the occurrence of spontaneous liver tumors was not different from wild type mice, however these mice were more susceptible to DEN-induced hepatocarcinomas than wild type mice. Those results suggest that a deficiency in liver Cx32 render mice more susceptible to chemical tumor formation induced by DEN. In light of our results, one can postulate that exposure to HCB leads to a “chemically-knocked-out” Cx32, as supported by the gender-specific decrease in Cx32 and liver tumor formation.

These studies indicate that HCB exposure results in gender-specific long-term alterations in intercellular gap junctional communication in female rat liver. This decrease occurs prior to the development of hepatic tumors and may represent an early indicator of chemically induced carcinogenesis. This effect occurs independently of the presence of the ovaries thereby suggesting that non ovarian factors play an important role in HCB-induced decreased intercellular communication and carcinogenesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Rupert Abdalian, Guylaine Lassonde, and Julie Dufresne are thanked for their assistance. This study was supported by grant to MC and DGC from the Toxic Substances Research Initiative (Health Canada) and a studentship from the Armand-Frappier Foundation to IP.

**REFERENCES**

1. Newhook, R. and Meek, M. E. Hexachlorobenzene: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcino. Ecotox. Rev. C12*: 345-360, 1994.
2. Williams, G. M., Iatropoulos, M. J. and Weisburger, J. H. Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology. *Exp Toxicol Pathol. 48*: 101-111, 1996.
3. Gouvernement du Canada. Canadian Environmental Protection Act Priority Substances List. Supporting Document, Hexachlorobenzene. National Health and Welfare/ Department of the Environment. 56 pages, Ottawa, Canada, 1993
4. Legault, N., Sabik, H., Coopert, S. F. and Charbonneau, M. Effet of estradiol on the induction of porphyria by hexachlorobenzene in the rat. *Biochem Pharmacol. 54*, 19-25. 1997.
5. Carpenter, H. M., Williams, D. E. and Buhler, D. R. Hexachlorobenzene-induced porphyria in Japanese quail: an in vitro study of changes in cytochrome P-450 and monooxygenases. *J Toxicol Environ Health. 16*: 207-217, 1985.
6. Arnold, D. L., Moodie, C. A., Charbonneau, S. M., Grice, H. C., McGuire, P. F., Bryce, F. R., Collins, B. T., Zawidzka, Z. Z., Krewski, D. R., Nera, E. A. and Munro, I.C. Long-term toxicity of hexachlorobenzene in the rat and the effect of dietary vitamin A. *Food Chem Toxicol. 23*: 779-793, 1985.

7. Cabral, J. R., Mollner, T., Raitano, F. and Shubik, P. Carcinogenesis of hexachlorobenzene in mice. *Int J Cancer*. 23: 47-51, 1979.
8. Cabral, J. R., Shubik, P., Mollner, T. and Raitano, F. Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in hamsters. *Nature*. 269: 510-511, 1977.
9. Krishnan K., Brodeur J. and Charbonneau M. Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria in the rat. *Fundam Appl Toxicol*. 17:433-441, 1991.
10. Smith, A. G. and Cabral, J. R. Liver-cell tumours in rats fed hexachlorobenzene. *Cancer Lett*. 11: 169-172, 1980.
11. Lambrecht, R. W., Ertürk, E., Grunden, E. E., Headley, D. B., Peters, H. A., Morris, C. R. and Bryan, B. T. Renal toxicity and tumorigenicity of hexachlorobenzene (HCB) in Syrian golden hamsters (H) after subchronic administration. *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. 42: 786, 1983.
12. Smith, A. G., Francis, J. E., Dinsdale, D., Manson, M. M. and Cabral, J. R. Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria. *Carcinogenesis*, 6: 631-636, 1985.
13. Pereira, M. A., Herren, S. L., Britt, A. L. and Khoury, M. M. Sex difference in enhancement of GGTase-positive foci by hexachlorobenzene and lindane in rat liver. *Cancer Lett*. 15: 95-101, 1982.
14. Yamasaki, H., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Columbano, A., Tsuda, H. and Ito, N.

- Gap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis. *Environ Health Persp.* 101:191-198, 1993
15. DeoCampo, N.D., Wilson, M.R. and Trosko, E.J. Cooperation of *blc-2* and *myc* in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication. *Carcinogenesis.* 21:1501-1506, 2000.
  16. Stratton, I.G., Ewing, L.L. and Desjardins, C. Efficacy of testosterone-filled polydimethylsiloxane implants in maintaining plasma testosterone in rabbits. *J Reprod Fertil.* 35:235-244, 1973
  17. Brawer J.R., Schipper, H. and Robaire, B. Effects of long term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus. *Endocrinology.* 112:194-199, 1983
  18. Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159, 1987.
  19. Cyr, D.G., Hermo, L., Blaschuck, O.W. and Robaire, B. Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology.* 130: 353-363, 1992.
  20. Cyr, D. G., Dufresne, J., Pillet, S., Alfieri, T. J. and Hermo, L. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J Androl.* 22: 124-135, 2001.
  21. Cyr, D. G., Hermo, L. and Laird, D. W. Immunocytochemical localization and

- regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology*. 137: 1474-1484, 1996.
22. Sai, K., Kanno, J., Hasegawa, R., Trosko, J. E. and Inoue, T. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis*. 21: 1671-1676, 2000.
  23. Yamasaki, H., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Tanaka, T., Zaidan-Dagli, M. L. and Omori, Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III*. 322: 151-159, 1999.
  24. Ruch, Randall J. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 24: 216-231, 1994.
  25. Hotz-Wagenblatt, A. and Shalloway, D. Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit Rev Oncog*. 4: 541-558, 1993.
  26. Kanno, Y. Modulation of cell communication and carcinogenesis. *Jpn J Physiol*. 35: 693-707, 1985.
  27. Hireschi, K.K., Xu, C.E., Tsukamoto, T. and Sager, R. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinomas cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff*. 7:861-870, 1996.
  28. Laird, D.W., Fistouris, P., Batist, G., Alpert, L., Huynh, H.T., Carystinos, G.D. and Alaoui-Jamali, M.A. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res*. 59(16): 4104-10, 1999

29. Warngard, L., Bager, Y., Kato, Y., Kenne, K. and Ahlborg, U. G. Mechanical studies of the inhibition of intercellular communication by organochlorine compounds. *Arch Toxicol.* 18: 149-159, 1996.
30. Bager, Y., Kenne, K., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Traub, O. and Wärngard, L. Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3'4'-pentachlorobiphenyl. *Carcinogenesis.* 15: 2439-2443, 1994.
31. Krutovskikh, V. A., Mesnil, M., Mazzoleni, G. and Yamasaki, H. Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo association with aberrant localization of connexin proteins. *Laboratory Investigation.* 72: 571-577, 1995.
32. Tateno, C., Ito, S., Tanaka, M., Oyamada, M. and Yoshitake, A. Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats. *Carcinogenesis.* 15: 517-521, 1994.
33. Ruch, R.J., Bonney, W.J., Sigler, K., Guan, X., Matesic, D., Schafer, L.D., Dupont, E. and Trosko, J.E. Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis.* 15: 301-306, 1994.
34. Fang, M. Z., Mar, W. C. and Cho, M. H. Cadmium-induced alterations of connexin expression in the promotion stage of in vitro two-stage transformation. *Toxicology.* 161: 117-127, 2001.
35. Risek, B., George K., F., Hahn, D. W. and Gilula, N. B. Gap junction regulation in

- the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. *J Cell Sci.* *108*: 1017-1032, 1995.
36. MacKenzie, L. W., Puri, C. P. and Garfield, R. E. Effect of estradiol-17 $\beta$  and prostaglandins on rat myometrial gap junctions. *Prostaglandins.* *26*: 925-941, 1983.
  37. Grümmer, R., Chwalisz, K., Mulholland, J., Traub, O. and Winterhager, E. Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod.* *51*: 1109-1116, 1994.
  38. Grümmer, R., Traub, O. and Winterhager, E. Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology.* *140*: 2509-2516, 1999.
  39. Antoskiewicz, B., Muller, G., Grummer, R. and Winterhager, E. Induction of connexin 32 expression by potential embryonic signals in rabbit uterine epithelium. *Early Pregnancy.* *2*: 253-263, 1996.
  40. Orsino, A., Taylor, C. V. and Lye, S. J. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology.* *137*: 1545-1553, 1996.
  41. Shinohara, K., Funabashi, T., Mitushima, D. and Kimura, F. Effects of estrogen on the expression of connexin32 and connexin43 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci Lett.* *286*: 107-110, 2000.
  42. Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H. D., Nelles, E., Schwarz, M. and Willecke,

- K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol.* 7: 713-716, 1997.
43. Omori, Y., Zaidan Dagi, M. L., Yamakage, K. and Yamasaki, H. Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. *Mutat Res.* 477: 191-196, 2001.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Effects of HCB on intercellular communication in female rat liver. Rats were administered HCB (100 mg/kg) by gavage every day for 5 days and sampled on day 100 of the experiment. Livers were excised and subject to incision-loading/dye-transfer analysis using rhodamine-dextran (RhD) and Lucifer Yellow (LY). Tissues were fixed in buffered formalin (10%) overnight, dehydrated and embedded in paraffin. For all images, RhD (A, panels i and iii) and LY (A, panels ii and iii; B, panels i et ii) fluorescence are shown by white arrows (100X magnification). The distance of migration is indicated by a yellow line (A and B). Section B represents LY migration in a control (panel i) and in a HCB-treated female liver (panel ii). Hepatic gap junctional intercellular communication in an intact female and HCB-treated groups are shown (C). The data are expressed as the Mean  $\pm$  SEM (n = 6). The “a” in section C indicates the mean is significantly different from controls (P<0.05).

Figure 2 : Northern blot analysis of Cx32 and Cx26 mRNA levels in female rat liver 50 days following the first day of HCB exposure. Rats were administered HCB (100 mg/kg) by gavage every day for 5 days and the livers were sampled on day 50 of the experiment. Total cellular mRNA was isolated and subjected to Northern blot analysis using specific Cx32 and Cx26 cDNA probes. Data were standardized for loading using an 18S rRNA probe. Hepatic Cx32 (A,C) and Cx26 (B,D) mRNA levels in female (A,B) and male (C,D) are shown. The data are presented as the Mean  $\pm$  SEM (n = 6 for males and n = 7 for females). The “a” denotes a significant difference from controls (P<0.05)

Figure 3: Western blot analysis of connexin 26 and connexin 32 protein levels in female rat livers 50 days following the first day of HCB exposure. Rats were administered HCB (100 mg/kg) by gavage every day for 5 days and the livers were sampled on day 50 of the experiment. Livers were homogenized and 50 µg of protein for each sample subjected to Western blot analysis using specific Cx26 and Cx32 antisera. Data were standardized for loading using an actin antisera. Hepatic Cx32 (A) and Cx26 (B) protein levels in female are shown. The data are presented as the Mean  $\pm$  SEM (n = 6). The “a” denotes a significant difference from controls (P<0.05)

Figure 4 : Northern blot analysis of connexin 26 and connexin 32 expression in female rat liver 10 days after surgery. Rats were ovariectomized (OV) and estradiol implanted (OV + E<sub>2</sub>) (controls were sham operated) and the livers were sampled on day 10 after surgery. Total cellular mRNA was isolated and subjected to Northern blot analysis using specific Cx32 and Cx26 cDNA probes. Data were standardized for loading using an 18S rRNA probe. Hepatic Cx32 (A) and Cx26 (B) mRNA levels in females are shown. The data are presented as the Mean  $\pm$  SEM (n = 10). The “a” denotes a significant difference from controls (P<0.05) and “b” denotes a significant difference from the OV group.

Figure 5 : Northern blot analysis of connexin 26 and connexin 32 expression in female rat livers 45 days following the first day of HCB exposure. Rats were ovariectomized (OV) (controls were sham operated) and were administered HCB (100 mg/kg) by gavage every

day for 5 days, beginning three days after the surgery. The livers were sampled on day 45 of the experiment. Total cellular mRNA was isolated and subjected to Northern blot analysis using specific Cx32 and Cx26 cDNA probes. Data were standardized for loading using an 18S rRNA probe. Hepatic Cx32 (A) and Cx26 (B) mRNA levels in females are shown. The data are presented as the Mean  $\pm$  SEM (n = 6). The "a" denotes a significant difference from controls (P<0.05) and "b" denotes a significant difference from OV group (P<0.05)



Figure 1

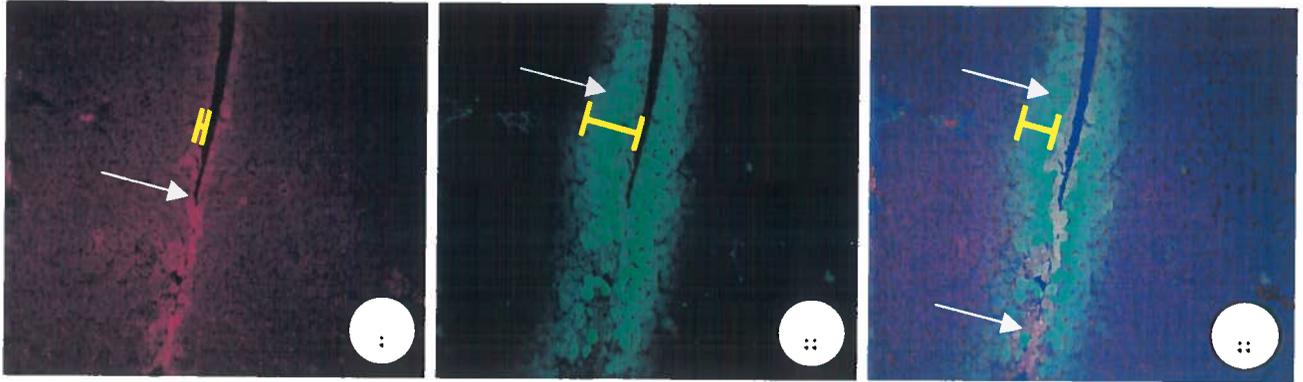
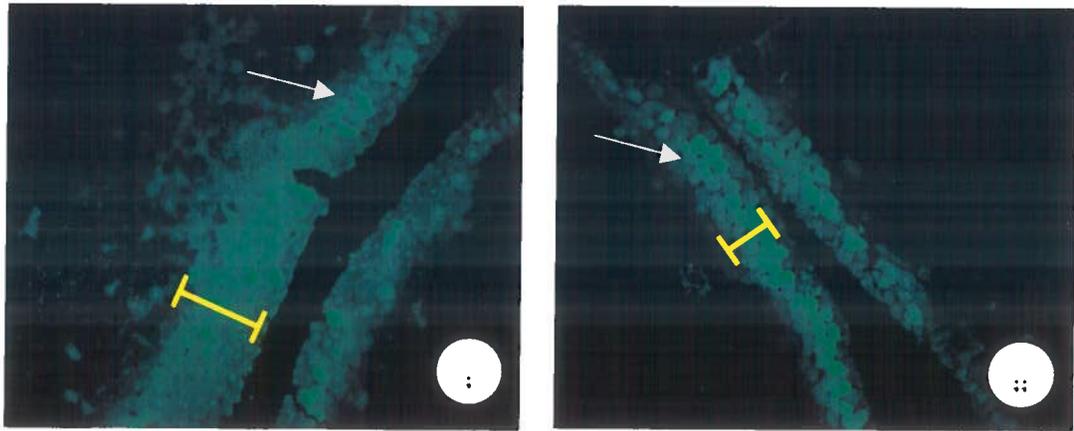
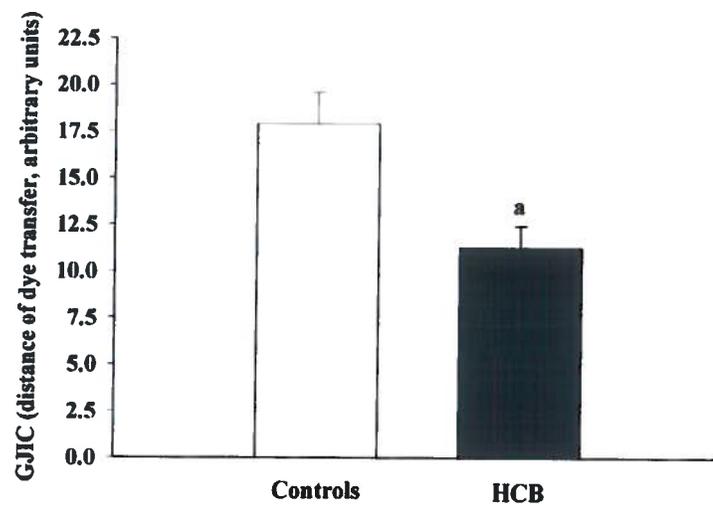
**A****B****C**



Figure 2

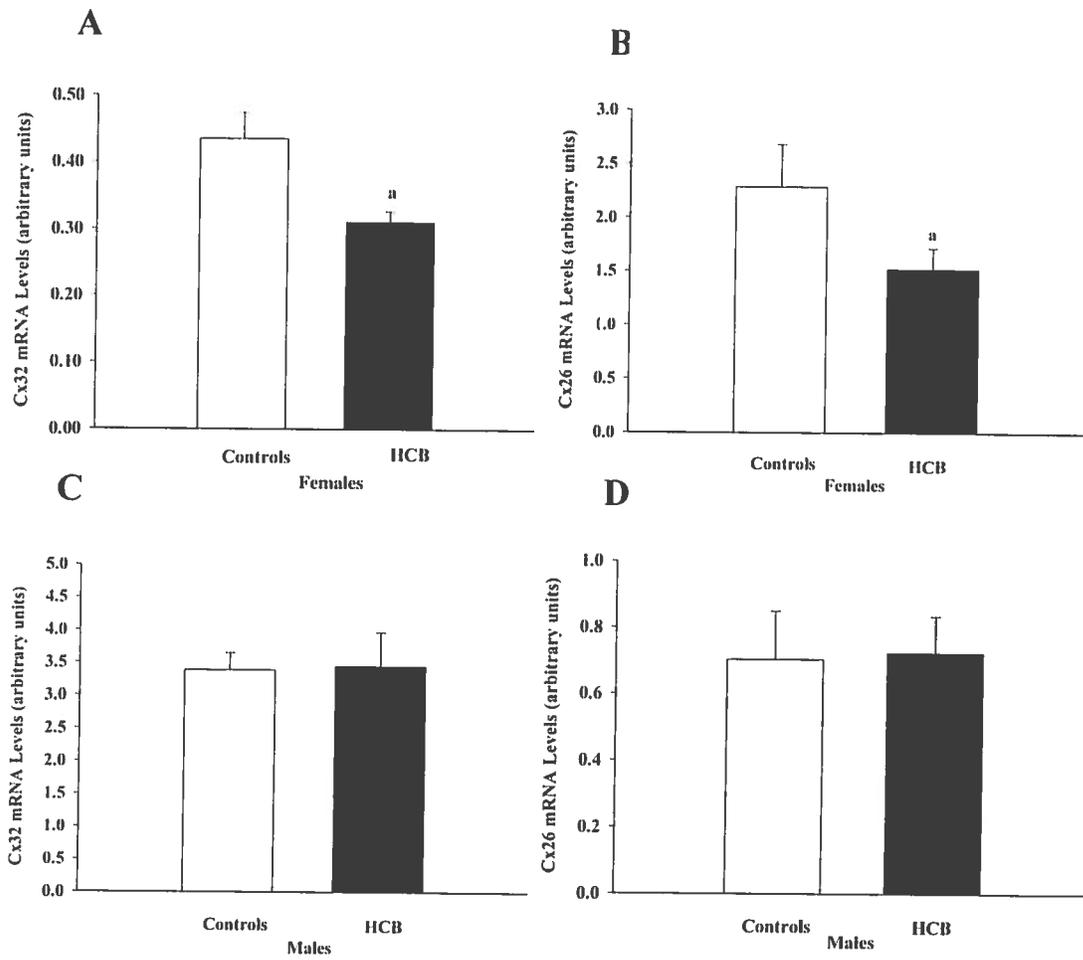


Figure 3

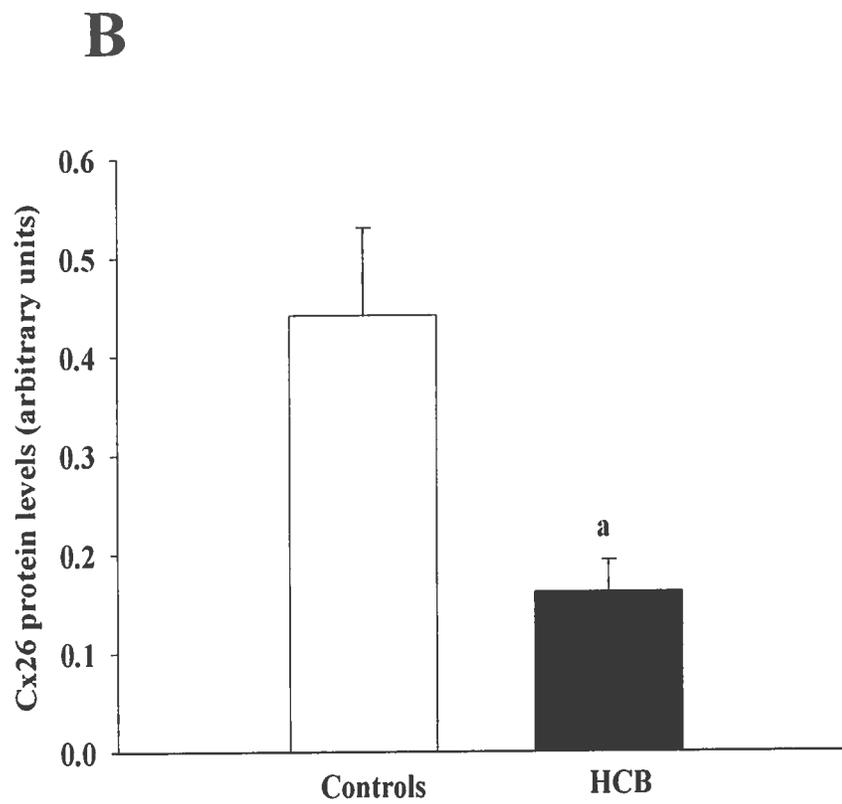
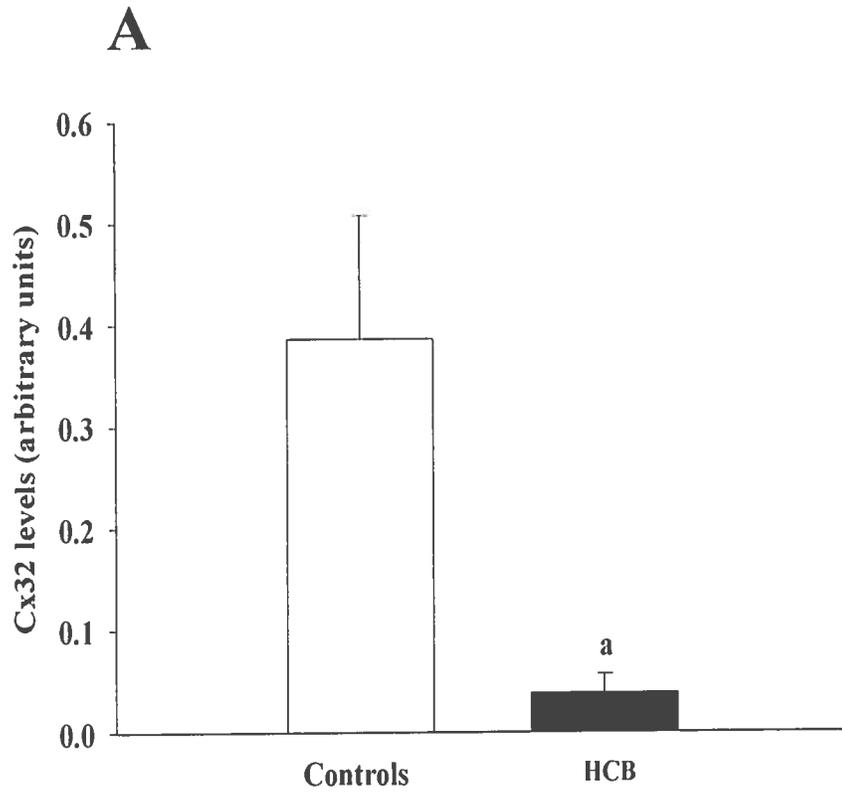


Figure 4

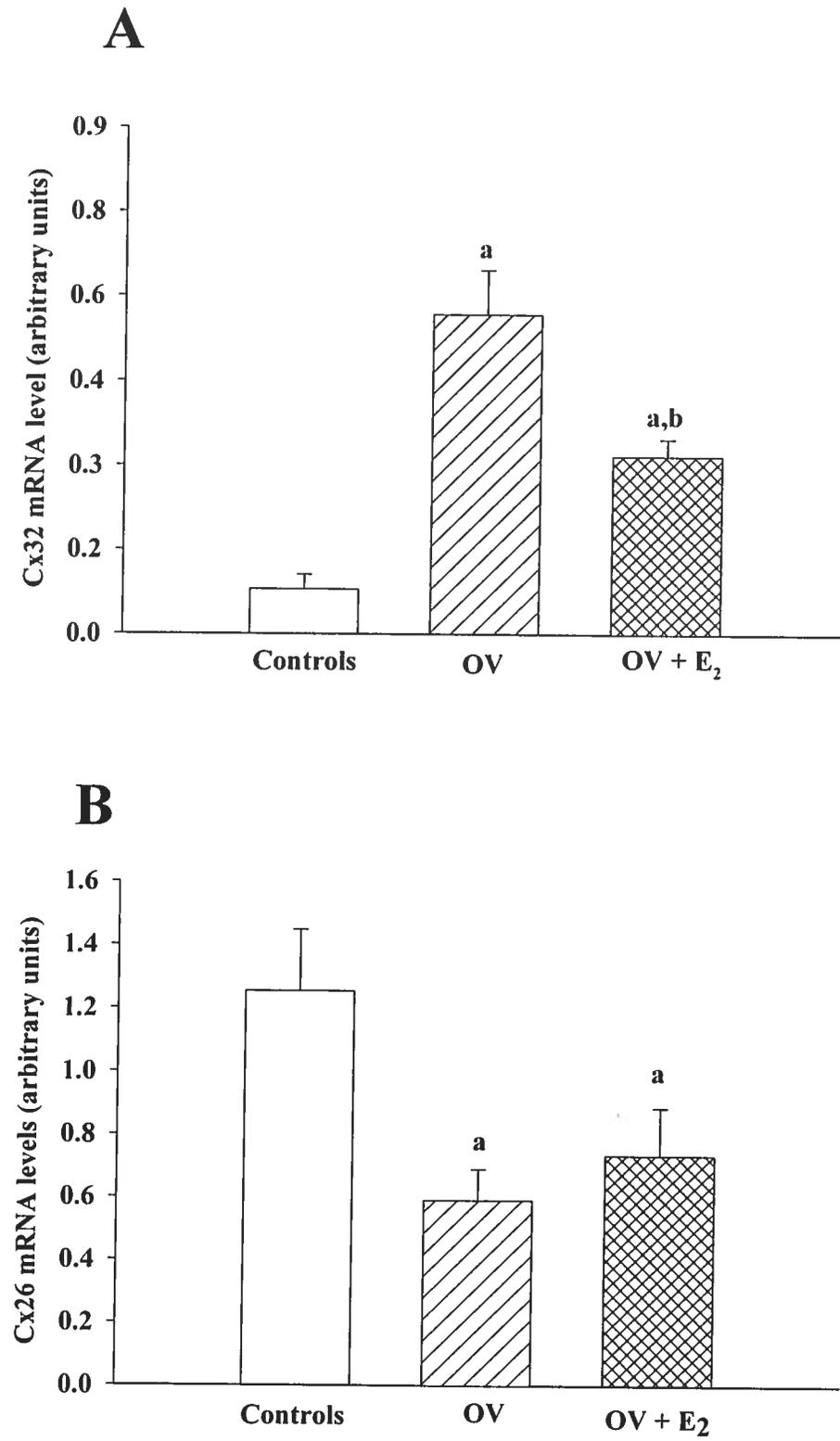
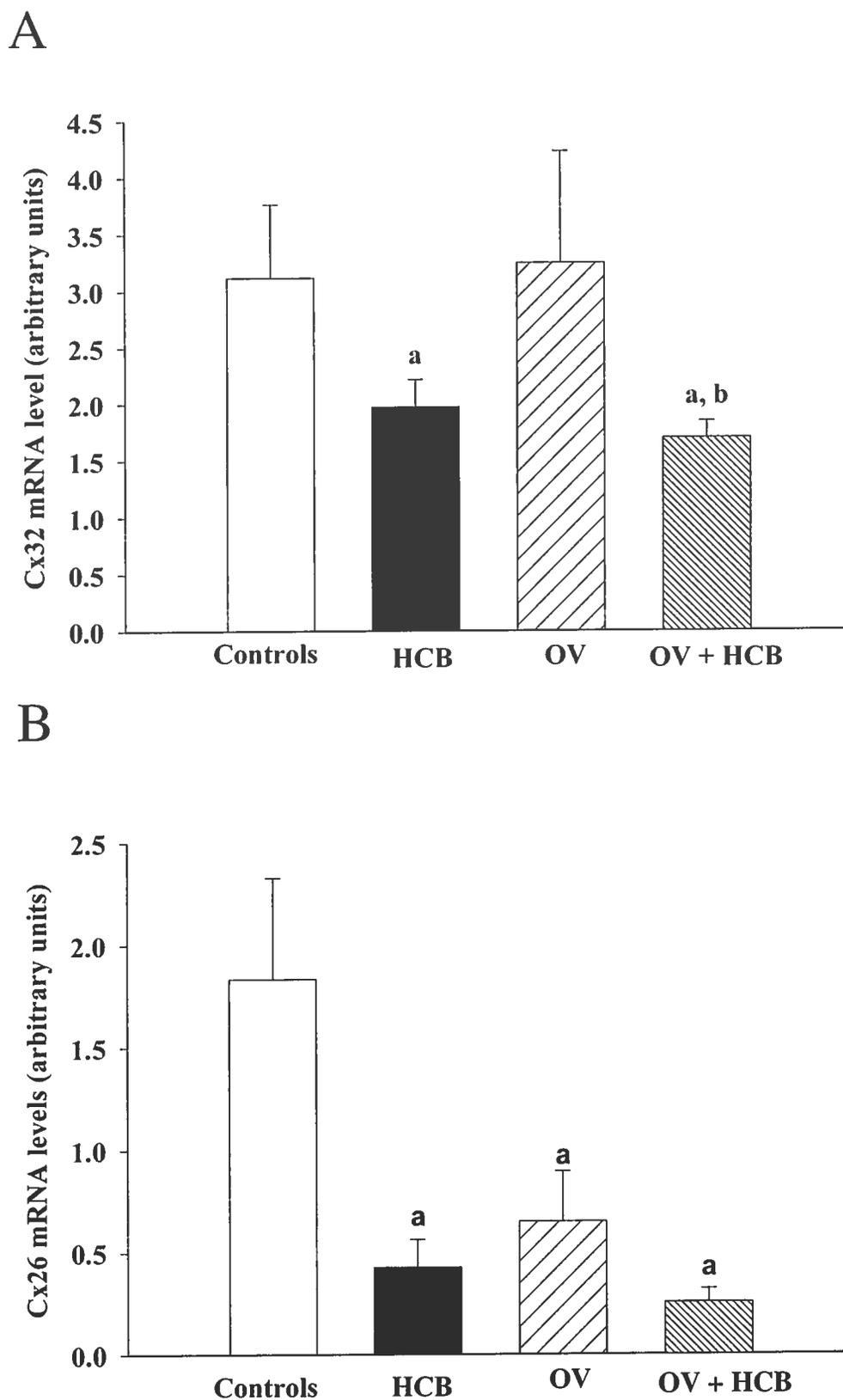


Figure 5



## TROISIÈME PARTIE

### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Plusieurs polluants environnementaux sont des promoteurs de tumeurs exerçant leur action par des mécanismes épigénétiques. Certains mécanismes ont été identifiés et peuvent être impliqués dans cette promotion. Parmi ceux-ci, la baisse de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires est un mécanisme courant et de plus en plus étudié. Compte tenu de l'omniprésence de l'HCB dans l'environnement et, surtout, dans les tissus humains, et de sa capacité à favoriser le développement de tumeurs chez les rats femelles, il est primordial de déterminer les effets de l'HCB sur la cancérogenèse. L'hypothèse de recherche de cette étude était que l'HCB favorise la formation des tumeurs hépatiques chez les rats femelles en inhibant la communication intercellulaire, ce qui favorise la libération des cellules initiées du contrôle des cellules saines avoisinantes et permet leur prolifération clonale.

Le premier objectif de cette étude était de déterminer les effets de l'HCB sur la communication cellulaire. Les résultats expérimentaux suggèrent que l'HCB promouvait la formation de tumeurs hépatiques chez les rats femelles en abaissant considérablement l'expression des connexines 26 et 32 par rapport aux femelles témoins. Il n'y avait aucune différence chez les mâles traités à l'HCB par rapport aux mâles témoins. Ceci est en accord avec le fait que les femelles sont beaucoup plus susceptibles au développement de tumeurs que les mâles, qui eux, n'en développent que très peu. De plus, cette baisse du niveau d'ARNm se reflète au niveau de la protéine. Cependant, la diminution était encore plus grande à ce niveau, ce qui laisse sous-entendre qu'il y aurait des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels affectés par l'HCB. Cette rétro-inhibition des connexines se traduisait, au jour 100, par une baisse de la communication intercellulaire. Suite à l'injection de l'initiateur de tumeurs, cette baisse permet aux cellules initiées de se libérer de l'influence des cellules environnantes et de proliférer.

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées quant au(x) mécanisme(s) impliqué(s) dans la baisse des niveaux de connexines. Tout d'abord, il est possible que l'HCB active des enzymes essentielles pour la dégradation des ARNm et/ou des protéines de

connexines, de façon plus importante chez les femelles que chez les mâles. Il est également possible que les effets de l'HCB soient au niveau de la transcription de l'ARNm. L'HCB peut moduler les facteurs de transcription de l'ARNm et/ou de la traduction de la protéine chez les femelles, et abaisser ainsi le taux de formation des connexines. Cependant, compte tenu de l'importante baisse des ARNm, il semble que l'HCB exerce son action plutôt au niveau transcriptionnel.

De plus, il a été démontré que plusieurs enzymes sont exprimées de façon différente chez les femelles comparativement aux mâles (Roberts et al (1996); Jarukamjorn et al. (1999)). Sachant que les cytochromes sont impliqués dans le métabolisme de l'HCB et qu'il existe un dimorphisme au niveau des cytochromes dans le foie, il est possible que les effets néfastes de l'HCB soient produits par un de ses métabolites, plus présent chez les femelles que chez les mâles. Il a été démontré que la liaison au glutathion (la voie excrétrice) était plus utilisée chez les mâles par rapport aux femelles (D'Amour et Charbonneau (1992)). Il est donc possible que les produits néfastes provenant de la voie oxydative de l'HCB soient plus présents chez la femelle et puissent ainsi causer des dommages. Toutes ces hypothèses pourraient être vérifiées dans des travaux futurs.

Une des hypothèses concernant la cancérogenèse est que les cellules tumorales seraient des cellules souches bloquées dans leur ontogenèse. Elles posséderaient donc des caractéristiques des cellules différenciées et des cellules souches. Il a été proposé que, comme les cellules souches peuvent exprimer des connexines différentes des cellules différenciées, il serait possible que les cellules tumorales présentent des connexines différentes des cellules normales environnantes. Au niveau des hépatocytes, les cellules souches expriment la Cx43. Cette hypothèse a été appuyée par la découverte de Cx43 dans des tumeurs hépatiques humaines. En effet, dans plusieurs cas, la présence de la Cx43 a été observée dans les cellules tumorales, mais pas dans les cellules environnantes (Yamasaki (1991), Oyamada et al. (1990) et Wilgenbus et al., 1992). Afin de vérifier si l'HCB pouvait rendre les hépatocytes semblables à leurs cellules souches, le niveau d'expression de la Cx43 a été mesuré par Northern blot. Cependant, les résultats obtenus (données non montrées) dans le cadre de la présente étude démontrent que dans le foie de

rat, contrairement aux humains, il n'y a pas d'augmentation du niveau d'ARNm codant pour la Cx43. Au contraire, les niveaux de Cx43 tendaient à diminuer, bien que cette baisse ne soit pas significative. Il est possible que ces résultats *à priori* contradictoires soient dus à la différence d'espèce ou encore, que les mécanismes d'hépatocarcinogénèse chimique opèrent de façon différentes.

Un résultat expérimental surprenant fut de constater qu'il existe un dimorphisme sexuel des niveaux d'ARNm connexines 26 et 32 dans le foie des rats. Un tel dimorphisme au niveau des Cxs n'avait jamais été démontré dans le foie auparavant. Cependant, il est connu que les connexines, dans différents tissus, peuvent être régulées par les facteurs et hormones ovariens (MacKenzie et al., 1983 ; Grümmer et al., 1999 et 1994 ; Antoskiewicz et al., 1996 ; Orsino et al., 1996 ; Shinohara et al., 2000 ; Cyr et al., 1996). Afin de vérifier l'implication des hormones ovariennes sur la régulation des connexines dans le foie, des femelles ont été ovariectomisées, puis la moitié d'entre-elles ont reçu un implant permettant de maintenir des niveaux physiologiques d'estradiol et de vérifier le rôle de cette hormone. Les résultats de ces analyses ont démontré que l'ovariectomie ramène les niveaux d'expression des connexines des femelles semblables à ceux des mâles et que l'estradiol joue un rôle partiel dans la régulation de la Cx32. Les niveaux de Cx26, quant à eux, n'étaient nullement affectés par l'estradiol. La progestérone pourrait être l'un des facteurs régulateurs possibles dans les deux cas (rôle partiel chez la Cx32 et partiel ou total chez la Cx26). Il a été démontré que cette hormone ovarienne pouvait réguler l'expression des connexines dans certains tissus (Risek et al., 1995). Il est donc possible que les connexines du foie soient influencées par cette hormone.

Cependant, il a par la suite été démontré que l'HCB exerce son action épigénétique par un mécanisme hépatique non influencé par les facteurs ovariens. En effet, en absence d'ovaires, les niveaux d'ARNm codant pour les Cx26 et Cx32 étaient abaissés par l'HCB à des niveaux même plus bas que chez les femelles intactes traitées à l'HCB. Ce qui suggère que l'HCB exerce son action au niveau des connexines hépatiques, mais que le mécanisme est indépendant des ovaires.

Il a été démontré que les différents types de jonctions, lacunaires, serrées et adhérentes, sont inter-reliées (voir annexe). Il est donc possible que la régulation des

connexines et des protéines formant les jonctions serrées et adhérentes, proviennent de mécanismes semblables et que l'expression des connexines soit influencée par celle des protéines des autres types de jonctions. De plus, tout comme les jonctions lacunaires, les jonctions serrées et adhérentes ont été associées au développement de tumeurs (Yamaoka et al., 1995 ; Genda et al., 2000 ; Hirohashi, 1998 ; Mullin et al., 2000) et leur expression peut être influencée par les ovaires et/ou l'estradiol (MacCalman et al., 1995 ; Blaschuk et Farookhi, 1989 ; Habermann et al., 2001). Il semblait donc pertinent de déterminer si la E-cadhérine, protéine des jonctions adhérentes, et la Claudine-1, protéine des jonctions serrées, étaient régulées elles aussi par les ovaires et/ou l'estradiol et si elles pouvaient influencer l'expression des connexines. Les résultats expérimentaux (voir annexe) ont démontré que la Claudine-1 n'est pas influencée par l'ovariectomie seule, mais est rétro-inhibée par l'estradiol en absence d'ovaire. Ces résultats suggèrent que l'expression de cette protéine, chez la femelle intacte, est augmentée par un ou des facteur(s) ovarien(s) et rétro-inhibée par l'estradiol. L'expression de la E-cadhérine, quant à elle, n'est influencée ni par les ovaires, ni par l'estradiol. Ces deux protéines, la E-cadhérine et la Claudine-1, sont influencées de façon différente des connexines par les facteurs ovariens. Il est donc fort peu probable que la régulation des jonctions lacunaires et des connexines soit reliée à celle des autres types de jonctions.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant au(x) mécanisme(s) employé(s) par l'HCB pour moduler les niveaux de connexines dans le foie des rats femelles. Outre celles mentionnées précédemment, il est possible que l'HCB exerce un knock-out chimique sur la Cx32. Il a été démontré que les souris knock-out sont plus sensibles au développement de tumeurs hépatiques spontanées induites par un carcinogène que leur homologues de type sauvage. L'HCB pourrait venir inhiber l'expression des connexines en se fixant sur l'ADN au niveau du promoteur des connexines, ou encore en bloquant l'accès aux facteurs de transcription. Il pourrait aussi moduler l'expression de ces facteurs de transcription, ce qui inhiberait la transcription des connexines.

Les résultats de cette recherche démontrent que l'HCB, un polluant omniprésent dans l'environnement, favorise la formation de tumeurs hépatiques chez les rats femelles

en inhibant la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires par une rétro-inhibition des Cx26 et Cx32, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. De plus, il existe un dimorphisme sexuel dans les niveaux d'ARNm codant pour les Cx26 et Cx32 dû à des facteurs ovariens. L'HCB promouvoit cependant le développement de tumeurs par un mécanisme hépatique non influencé par les ovaires.

Le protocole ABC, utilisé pour l'exposition des animaux, a déjà permis de démontrer que l'injection d'un initiateur de tumeurs au jour 100, soit 95 jour après la dernière exposition, induit la formation de tumeurs de façon drastique chez les femelles, mais de façon minime chez les mâles (Larouche et al., 1993), et ce, même si l'HCB était pratiquement indétectable dans le foie à ce moment. Il apparaît évident que les changements induits par l'HCB et prédisposant les femelles au développement de tumeurs se déroulent entre la dernière exposition à l'HCB et le jour 100. Les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette présente étude ont permis de démontrer que la baisse des connexines observée au jour 50 amenait une baisse de la GJIC au jour 100. Il est important de comprendre que la baisse des connexines survient alors qu'aucune tumeur n'est présente dans le foie. Contrairement aux autres études, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ne proviennent pas de tumeurs, mais précèdent le développement de tumeurs. La baisse de communication induite par la rétro-inhibition des connexines serait donc une des premières manifestations des tumeurs malignes. Cette notion est importante dans la perspective de pouvoir diagnostiquer les tumeurs à un stade précoce afin de mieux les combattre. En établissant qu'une baisse de la Cx32 dans le foie prédispose au développement de tumeurs avant que celles-ci n'apparaissent, il sera possible d'utiliser la Cx32 comme marqueur de l'hépatocarcinogénèse. L'idée d'utiliser les connexines comme marqueur de cancérogenèse a été également suggérée par Laird et al. (1999). Suite à des études à partir de cellules tumorales du sein *in vitro* et de tumeurs provenant à la fois de tumeurs humaines et de tumeurs induites chez le rat, ils ont démontré que l'expression de la Cx43 était rétro-inhibée dans le cancer du sein à différents stades de la cancérogenèse et suggéré que la Cx43 pouvait être utilisée comme marqueur des premiers stades de cancérogenèse du sein.

Ces travaux sont primordiaux pour la compréhension de l'hépatocarcinogénèse chimique chez le rat. Ils apportent un élément mécanistique du développement des tumeurs. Un tel élément est essentiel à l'évaluation du risque d'une exposition à l'HCB pour la carcinogénèse hépatique. De plus, ils démontrent que la susceptibilité des femelles provient, en partie, d'un dimorphisme sexuel au niveau de protéines essentielles au maintien d'une bonne homéostasie dans le tissu et d'un bon contrôle de la prolifération. L'étude des mécanismes de formation de tumeurs par les produits environnementaux est un processus essentiel non seulement pour la compréhension du phénomène de la carcinogénèse, mais aussi afin de pouvoir trouver un remède éventuel à ce fléau qu'est le cancer. Elle permettra également de mieux réglementer l'utilisation des produits chimiques. Ces mécanismes permettront d'établir une norme environnementale acceptable pour la population et éventuellement d'établir les risques avant de permettre l'utilisation de ces substances.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS, C. K., M. M. Freidin, V. K. Verselis, M. V. Bennett et T. A. Bargiello. 2001. «Functional alterations in gap junction channels formed by mutant forms of connexin 32: evidence for loss of function as a pathogenic mechanism in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease». Brain Research, vol. 900, p. 9-25.
- AL-UBAIDI, M. R., T. W. White, H. Ripps, I. Poras, P. Avner, D. Gomes et R. Bruzzone. 2000. «Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain». Journal of Neuroscience Research, vol. 59, p. 813-26.
- ALVAREZ, L., A. Randi, P. Alvarez, G. Piroli, A. Chamson-Reig, V. Lux-Lantos et D. Kleiman de Pisarev. 2000. «Reproductive effects of hexachlorobenzene in female rats». Journal of Applied Toxicology, vol. 20, p. 81-7.
- AMDUR, M., J., Doull, et C.D., Klaassen. 1991. «Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons», New York, Pergamon Press, 1033 pages.
- ANDO, M., S. Hirano et Y. Itoh. 1985. «Transfert of Hexachlorobenzene (HCB) from Mother to New-born Baby through Placenta and Milk». Archives of Toxicology, vol. 56, p. 195-200.
- ARNOLD, D. L., C. A. Moodie, S. M. Charbonneau, H. C. Grice, P. F. McGuire, F. R. Bryce, B. T. Collins, Z. Z. Zawidzka, D. R. Krewski, E. A. Nera et a. l. et. 1985. «Long-term toxicity of hexachlorobenzene in the rat and the effect of dietary vitamin A». Food and Chemical Toxicology, vol. 23, p. 779-93.
- BAGER, Y., K. Kenne, V. Krutovskikh, M. Mesnil, O. Traub et L. Wärngard. 1994. «Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3'4'-pentachlorobiphenyl». Carcinogenesis, vol. 15, p. 2439-2443.
- BEAVON, I. R. 2000. «The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation». European Journal of Cancer, vol. 36, p. 1607-20.
- BECKER, D. L., J. E. Cook, C. S. Davies, W. H. Evans et R. G. Gourdie. 1998. «Expression of major gap junction connexin types in the working myocardium of eight chordates». Cell Biology International, vol. 22, p. 527-43.
- BEHRENS, J. 1995. «Cell Contacts, Differentiation, and Invasiveness of Epithelial Cells». Invasion and Metastasis, vol. 14, p. 61-70.
- BELLUARDO, N., A. Trovato-Salinaro, G. Mudo, Y. L. Hurd et D. F. Condorelli. 1999. «Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene». Journal of Neuroscience Research, vol. 57, p. 740-52.
- BERTHOUD, V. M., M. B. Rook, O. Traub, E. L. Hertzberg et J. C. Saez. 1993. «On the

mechanisms of cell uncoupling induced by a tumor promoter phorbol ester in clone 9 cells, a rat liver epithelial cell line». European Journal of Cell Biology, vol. 62, p. 384-96.

BERTHOUD, V. M., P. N. Tadros et E. C. Beyer. 2000. «Connexin and gap junction degradation». Methods, vol. 20, p. 180-7.

BEYER, E. C., D. L. Paul et D. A. Goodenough. 1987. «Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver». Journal of Cell Biology, vol. 105, p. 2621-9.

BLASCHUK, O. W. et R. Farookhi. 1989. «Estradiol stimulates cadherin expression in rat granulosa cells». Developmental Biology, vol. 136, p. 564-7.

BLEAVINS, M. R., W. J. Breslin, R. J. Aulerich et R. K. Ringer. 1982. «Excretion and placental and mammary transfer of hexachlorobenzene in the European ferret (*Mustela putorius furo*)». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 10, p. 929-40.

BORGSTROM, P., K. J. Hillan, P. Sriramarao et N. Ferrara. 1996. «Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy». Cancer Research, vol. 56, p. 4032-9.

BOWIE, J. U. 1997. «Helix packing in membrane proteins». Journal of Molecular Biology, vol. 272, p. 780-9.

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

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.

BRYANT, P. J. 1997. «Junction genetics». Developmental Genetics, vol. 20, p. 75-90.

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

BUDUNOVA, I. V., S. Carbajal et T. J. Slaga. 1995. «The expression of gap junctional proteins during different stages of mouse skin carcinogenesis». Carcinogenesis, vol. 16, p. 2717-24.

BUDUNOVA, I. V., S. Carbajal, A. Viaje et T. J. Slaga. 1996. «Connexin expression in epidermal cell lines from SENCAR mouse skin tumors». Molecular Carcinogenesis, vol. 15, p. 190-201.

BUICK, R. N. et M. N. Pollak. 1984. «Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes». Cancer Research, vol. 44, p. 4909-18.

- BUTTERWECK, A., C. Elfgang, K. Willecke et O. Traub. 1994. «Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin». European Journal of Cell Biology, vol. 65, p. 152-63.
- CABRAL, J. R., T. Mollner, F. Raitano et P. Shubik. 1979. «Carcinogenesis of hexachlorobenzene in mice». International Journal of Cancer, vol. 23, p. 47-51.
- CAM, C. 1959. «Cutaneous porphyria dues to intoxication». Dirim (Istanbul), vol. 34, p. 11-15.
- CARPENTER, H. M., D. E. Williams et D. R. Buhler. 1985. «Hexachlorobenzene-induced porphyria in Japanese quail: an in vitro study of changes in cytochrome P-450 and monooxygenases». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 16, p. 207-17.
- CCREM (CANADIAN COUNCIL OF RESOURCE AND ENVIRONMENTAL MINISTERS). 1987. «Canadian Water Quality Guidelines of the Canadian Council of Resource and Environement Minister», Environment Ministers, Ottawa, Ontario.
- CEREIJIDO, M., L. Shoshani et R. G. Contreras. 2000. «Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity». Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, vol. 279, p. G477-82.
- CHANG, M., R. Werner et G. Dahl. 1996. «A role for an inhibitory connexin in testis?». Developmental Biology, vol. 175, p. 50-6.
- CHOMCZYNSKI, P. et N. Sacchi. 1987. «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction». Analytical Biochemistry, vol. 162, p. 156-159.
- CHRISTENSEN, C., D., Van der Sluis et C. Skinner. 1989. «A Review and Summary of the Literature on Hexachlorobenzene». SRI International 7443, prepared for Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Ottawa, 69 pages.
- COHEN, S. M., M. Arai, J. B. Jacobs et G. H. Friedell. 1979. «Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary bladder carcinogenesis». Cancer Research, vol. 39, p. 1207-17.
- COLE, M. D. 1986. «The myc oncogene: its role in transformation and differentiation». Annual Review of Genetics, vol. 20, p. 361-84.
- COLUMBANO, A., G. M. Ledda, P. M. Rao, S. Rajalakshmi et D. S. Sarma. 1982. «Dietary orotic acid, a new selective growth stimulus for carcinogen altered hepatocytes in rat». Cancer Letters, vol. 16, p. 191-6.
- COURTNEY, K. D., J. E. Andrews et M. A. Grady. 1985. «Placental transfer and fetal deposition of hexachlorobenzene in the hamster and guinea pig». Environmental Research, vol. 37, p. 239-49.

CYR, D. G., L. Hermo, N. Egenberger, C. Mertineit, J. M. Trasler et D. W. Laird. 1999. «Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis». Endocrinology, vol. 140, p. 3815-25.

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

D'AMOUR, M. et M. Charbonneau. 1992. «Sex-Related Difference in Hepatic Glutathione Conjugation of Hexachlorobenzene in the rat». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 112, p. 229-234.

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

DAHL, G., E. Levine, C. Rabadan-Diehl et R. Werner. 1991. «Cell/cell channel formation involves disulfide exchange». European Journal of Biochemistry, vol. 197, p. 141-4.

DAHL, G., W. Nonner et R. Werner. 1994. «Attempts to define functional domains of gap junction proteins with synthetic peptides». Biophysical Journal, vol. 67, p. 1816-22.

DAHL, G., R. Werner, E. Levine et C. Rabadan-Diehl. 1992. «Mutational analysis of gap junction formation». Biophysical Journal, vol. 62, p. 172-80; discussion 180-2.

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

DE CATABBI, S. C. B., C. Aldonatti et L. C. de Viale. 2000. «Heme metabolism after discontinued hexachlorobenzene administration in rats: possible irreversible changes and biomarker for hexachlorobenzene persistence». Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, vol. 127, p. 165-75.

DE LA COSTE, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C.-A. Renard, M.-A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn et C. Perret. 1998. «Somatic mutations of b-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocarcinomas». Processing of National Academy Science USA, vol. 95, p. 8847-8851.

DEBETS, F. M., J. J. Strik et K. Olie. 1980. «Effects of pentachlorophenol on rat liver changes induced by hexachlorobenzene, with special reference to porphyria, and alterations in mixed function oxygenases». Toxicology, vol. 15, p. 181-95.

DEN BESTEN, C. 1992. «The relationship between biotransformation and toxicity of halogenated benzenes: nature of the relative metabolites and implications for toxicity», Thesis Wageningen, Wageningen.

- DEOCAMPO, N. D., M. R. Wilson et J. E. Trosko. 2000. «Cooperation of bcl-2 and myc in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication». Carcinogenesis, vol. 21, p. 1501-6.
- DERMIETZEL, R., E. L. Hertberg, J. A. Kessler et D. C. Spray. 1991. «Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis». Journal of Neuroscience, vol. 11, p. 1421-32.
- DERMIETZEL, R., S. B. Yancey, O. Traub, K. Willecke et J. P. Revel. 1987. «Major loss of the 28-kD protein of gap junction in proliferating hepatocytes». Journal of Cell Biology, vol. 105, p. 1925-34.
- DOGRAMACI, H. M. 1959. «Presentation of a new form of porphyria with highest incidence in childhood». Ann. Univ. d'Ankara, vol. 7, p. 1-7.
- DRAGAN, Y. P., J. R. Hully, J. Nakamura, M. J. Mass, J. A. Swenberg et H. C. Pitot. 1994. «Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis». Carcinogenesis, vol. 15, p. 1451-8.
- DUFLOT-DANCER, A., M. Mesnil et H. Yamasaki. 1997. «Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes». Oncogene, vol. 15, p. 2151-8.
- DUFRESNE, J. et D. G. Cyr. 1999. «Effects of short-term methylmercury exposure on metallothionein mRNA levels in the testis and epididymis of the rat». Journal of Andrology, vol. 20, p. 769-78.
- DUFRESNE, J., K. Finnsen et D. G. Cyr. 2001. «Identification and developmental regulation of connexins in the rat epididymis». North American Testis Workshop, vol. Abstract.
- DUPONT, E., A. el Aoumari, J. P. Briand, C. Fromaget et D. Gros. 1989. «Cross-linking of cardiac gap junction connexons by thiol/disulfide exchanges». Journal of Membrane Biology, vol. 108, p. 247-52.
- DYM, M. et D. W. Fawcett. 1970. «The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.». Biology of Reproduction, vol. 3, p. 308-326.
- EFSTATHIOU, J. A., D. Liu, J. M. D. Wheeler, H. C. Kim, N. E. Beck, M. Ilyas, A. J. Karayiannakis, N. J. M. Mortensens, W. Kmiot, R. J. Palyford, M. Pignatelli et W. F. Bodmer. 1999. «Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and responsiveness to the motogenis trefoil factor 2 in colon carcinoma cells». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 2316-2321.
- ELDER, G. H., J. O. Evans et S. A. Matlin. 1976. «The effect of the porphyrogenic

- compound, hexachlorobenzene, on the activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in the rat». Clinical Science and Molecular Medicine, vol. 51, p. 71-80.
- ELVIRA, M., J. A. Diez, K. K. Wang et A. Villalobo. 1993. «Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by mu-calpain and m-calpain». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 14294-300.
- EVANS, W. H., G. Carlile, S. Rahman et K. Torok. 1992. «Gap junction communication channel: peptides and anti-peptide antibodies as structural probes». Biochemical Society Transactions , vol. 20, p. 856-61.
- FALK, M. M., N. M. Kumar et N. B. Gilula. 1994. «Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins». Journal of Cell Biology, vol. 127, p. 343-55.
- FALK, M. M. et U. Lauf. 2001. «High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells». Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 251-62.
- FALLON, M. B., A. R. Brecher, M. S. Balda, K. Matter et J. M. Anderson. 1995. «Altered hepatic localization and expression of occludin after common bile duct ligation». The American Journal of Physiology, vol. 269, p. C1057-C1062.
- FALLON, R. F. et D. A. Goodenough. 1981. «Five/hour Half-life of Mouse Liver Gap-junction Protein». The Journal of Cell Biology, vol. 90, p. 521-526.
- 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.
- FAROOKHI, R., C. S. Geng, C. D. MacCalman et O. W. Blaschuk. 1997. «Hormonal regulation of N-cadherin mRNA levels in rat granulosa cells». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 816, p. 165-72.
- FAUSTO, N. et E. M. Webber. 1993. «Control of liver growth». Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, vol. 3, p. 117-35.
- FREY, S., A. Buchmann, W. Bursch, R. Schulte-Hermann et M. Schwarz. 2000. «Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha-ras oncogene». Carcinogenesis, vol. 21, p. 161-6.
- FRIXEN, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Löchner et W. Birchmeier. 1991. «E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human carcinoma Cells». The Journal of Cell Biology, vol. 113, p. 173-185.
- FUJIMOTO, 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.
- GABRIEL, H. D., D. Jung, C. Butzler, A. Temme, O. Traub, E. Winterhager et K. Willecke. 1998. «Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice». Journal of Cell Biology, vol. 140, p. 1453-61.
- GENDA, T., M. Sakamoto, T. Ichida, H. Asakura et S. Hirohashi. 2000. «Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell- substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells». Laboratory Investigation, vol. 80, p. 387-94.
- GINZBERG, R. D. et N. B. Gilula. 1979. «Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium». Developmental Biology, vol. 68, p. 110-29.
- GOLDBERG, G. S., J. F. Bechberger, Y. Tajima, M. Merritt, Y. Omori, M. A. Gawinowicz, R. Narayanan, Y. Tan, Y. Sanai, H. Yamasaki, C. C. Naus, H. Tsuda et B. J. Nicholson. 2000. «Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells». Cancer Research, vol. 60, p. 6018-26.
- GOLDBERG, G. S., K. D. Martyn et A. F. Lau. 1994. «A connexin 43 antisense vector reduces the ability of normal cells to inhibit the foci formation of transformed cells». Molecular Carcinogenesis, vol. 11, p. 106-14.
- GOLIGER, J. A. et D. L. Paul. 1994. «Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis». Developmental Dynamics, vol. 200, p. 1-13.
- GONG, X., E. Li, G. Klier, Q. Huang, Y. Wu, H. Lei, N. M. Kumar, J. Horwitz et N. B. Gilula. 1997. «Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice». Cell, vol. 91, p. 833-43.
- GOODENOUGH, D. A., D. L. Paul et L. Jesaitis. 1988. «Topological distribution of two connexin32 antigenic sites in intact and split rodent hepatocyte gap junctions». Journal of Cell Biology, vol. 107, p. 1817-24.
- GOODENOUGH, D. A. et J. P. Revel. 1970. «A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver». Journal of Cell Biology, vol. 45, p. 272-90.
- GOODENOUGH, D. A., J. A. Goliger et D. L. Paul. 1996. «Connexins, Connexons, and Intercellular Communication». Annual Reviews in Biochemistry, vol. 65, p. 475-502.
- GORDON, R. E., B. P. Lane et M. Marin. 1982. «Regeneration of rat tracheal epithelium: changes in gap junctions during specific phases of the cell cycle». Experimental Lung Research, vol. 3, p. 47-56.
- GORSKI, T., E. Gorska, D. Gorecka et M. Sikora. 1986. «Hexachlorobenzene is non-

genotoxic in short-term tests». IARC Scientific Publications, vol. 399-401.

GOULET, L. et G. Thériault. 1991. «Stillbirth and Chemical Exposure of Pregnant Workers». Scandinave Journal of Work and Environmental Health, vol. 17, p. 25-31.

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

GOYETTE, M. C., K. Cho, C. L. Fasching, D. B. Levy, K. W. Kinzler, C. Paraskeva, B. Vogelstein et E. J. Stanbridge. 1992. «Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer». Molecular and Cellular Biology, vol. 12, p. 1387-95.

GRANT, D. L., W. E. J. Phillips et G. V. Hatina. 1977. «Effect of Hexachlorobenzene on Reproduction in the Rat». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 5, p. 207-216.

GRANT, D. L., J. B. Shields et D. C. Villeneuve. 1975. «Chemical (HCB) porphyria: effect of removal of sex organs in the rat». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 14, p. 422-5.

GRANT, D. L., J. B. Shields et D. C. Villeneuve. 1975. «Chemical (HCB) porphyria: effect of removal of sex organs in the rat». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 14, p. 422-5.

GRASL-KRAUPP, B., W. Bursch, B. Ruttkay-Nedecky, A. Wagner, B. Lauer et R. Schulte-Hermann. 1994. «Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 9995-9.

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

GREGORY, M., J. Dufresne, L. Hermo et D. G. Cyr. 2001. «Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis». Endocrinology, vol. 142, p. 854-63.

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

GRÜMMER, R., K. Chwalisz, J. Mulholland, O. Traub et E. Winterhager. 1994. «Regulation of Connexin26 and Connexin43 Expression in Rat Endometrium by Ovarian Steroid Hormones». Biology of Reproduction, vol. 51, p. 1109-1116.

GRÜMMER, R., O. Traub et E. Winterhager. 1999. «Gap Junction Connexin Genes cx26

and cx43 Are Differentially Regulated by Ovarian Steroid Hormones in Rat Endometrium». Endocrinology, vol. 140, p. 2509-2516.

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

HAEFLIGER, J. A., R. Bruzzone, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland et D. L. Paul. 1992. «Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 2057-64.

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

HAHN, A. F., P. J. Ainsworth, C. F. Bolton, J. M. Bilbao et J. M. Vallat. 2001. «Pathological findings in the x-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis». Acta Neuropathologica, vol. 101, p. 129-39.

HAZAN, R. B., G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton et S. A. Aaronson. 2000. «Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis». Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 779-90.

HENDRICH, S., H. A. Campbell et H. C. Pitot. 1987. «Quantitative stereological evaluation of four histochemical markers of altered foci in multistage hepatocarcinogenesis in the rat». Carcinogenesis, vol. 8, p. 1245-50.

HENDRICH, S., H. P. Glauert et H. C. Pitot. 1986. «The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital». Carcinogenesis, vol. 7, p. 2041-5.

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

HENNEMANN, H., H. J. Schwarz et K. Willecke. 1992. «Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs». European Journal of Cell Biology, vol. 57, p. 51-8.

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

HERTZBERG, E. L., R. M. Disher, A. A. Tiller, Y. Zhou et R. G. Cook. 1988. «Topology of the Mr 27,000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of

amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease-hypersensitive». Journal of Biological Chemistry, vol. 263, p. 19105-11.

HIROHASHI, S. 1998. «Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion System Inhuman Cancers». American Journal of Pathology, vol. 153, p. 333-339.

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

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

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

HOTZ-WAGENBLATT, A. et D. Shalloway. 1993. «Gap Junctional Communication and Neoplastic Transformation». Critical Reviews in Oncogenesis, vol. 4, p. 541-558.

HSU, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang et C. C. Harris. 1991. «Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas». Nature, vol. 350, p. 427-8.

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

ITANO, O., M. Ueda, K. Kikuchi, M. Shimazu, Y. Kitagawa, K. Aiura et M. Kitajima. 2000. «A new predictive factor for hepatocellular carcinoma based on two-dimensional electrophoresis of genomic DNA». Oncogene, vol. 19, p. 1676-83.

JACOFF, F. S., R. Scarberry et D. Rosa. 1986. «Source assessment of hexachlorobenzene from the organic chemical manufacturing industry». IARC Scientific Publications, vol. 31-7.

JANECKE, A. R., D. Nekahm, J. Loffler, A. Hirst-Stadlmann, T. Muller et G. Utermann. 2001. «De novo mutation of the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic sensorineural hearing loss». Human Genetics, vol. 108, p. 269-70.

JARUKAMJORN, K., T. Sakuma, J. Miyaura et N. Nemoto. 1999. «Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital». Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 369, p. 89-99.

JENG, Y. M., M. Z. Wu, T. L. Mao, M. H. Chang et H. C. Hsu. 2000. «Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma». Cancer Letters, vol. 152, p. 45-51.

JIANG, J. X. et D. A. Goodenough. 1996. «Heteromeric connexons in lens gap junction

- channels». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 1287-91.
- JOHN, S. A. et J. P. Revel. 1991. «Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 1312-8.
- JOHNSON, K. J., S. R. Patel et K. Boekelheide. 2000. «Multiple Cadherin Superfamily Members with Unique Expression Profiles Are Produced in Rat Testis». Endocrinology, vol. 141, p. 675-683.
- JOHNSON, R., M. Hammer, J. Sheridan et J. P. Revel. 1974. «Gap junction formation between reaggregated Novikoff hepatoma cells». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 71, p. 4536-40.
- JONGEN, W. M. F., D. J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T. J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi et K. Yamasaki. 1991. «Regulation of Connexin 43-Mediated Gap Junctional Intercellular Communication by Ca<sup>2+</sup> in Mouse Epidermal Cells Is Controlled by E-Cadherin». The Journal of Cell Biology, vol. 115, p. 545-555.
- JORDAN, K., R. Chodock, A. R. Hand et D. W. Laird. 2001. «The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization». Journal of Cell Science, vol. 114, p. 763-73.
- JORDAN, K., J. L. Solan, M. Dominguez, M. Sia, A. Hand, P. D. Lampe et D. W. Laird. 1999. «Trafficking, assembly, and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells». Molecular Biology of the Cell, vol. 10, p. 2033-50.
- KAKUNAGA, T. 1975. «The role of cell division in the malignant transformation of mouse cells treated with 3-methylcholanthrene». Cancer Research, vol. 35, p. 1637-42.
- KANG, K. S., B. C. Kang, B. J. Lee, J. H. Che, G. X. Li, J. E. Trosko et Y. S. Lee. 2000. «Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>». Cancer Letters, vol. 152, p. 97-106.
- KANG, K. S., J. W. Yun, B. Yoon, Y. K. Lim et Y. S. Lee. 2001. «Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA». Cancer Letters, vol. 166, p. 147-53.
- KANNO, Y. 1985. «Modulation of cell communication and carcinogenesis». Japanese Journal of Physiology, vol. 35, p. 693-707.
- KELLY, K. et U. Siebenlist. 1986. «The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells». Annual Review of Immunology, vol. 4, p. 317-38.
- KITCHIN, K. T. et J. L. Brown. 1988. «Biochemical effects of DDT and DDE in rat and

mouse liver». Environmental Research, vol. 46, p. 39-47.

KLEIMAN DE PISAREV, D. L., A. M. Ferramola de Sancovich et H. A. Sancovich. 1995. «Hepatic Indices of Thyroid Status in Rats Treated with Hexachlorobenzene». Journal of Endocrinological Investigation, vol. 18, p. 271-276.

KLEIMAN DE PISAREV, D. L., H. A. Sancovich et A. M. Ferramola de Sancovich. 1989. «Enhanced Thyroxine Metabolism in Hexachlorobenzene-Intoxicated Rats». Journal of Endocrinological Investigations, vol. 12, p. 767-772.

KNIESEL, U. et H. Wolburg. 2000. «Tight junctions of the blood-brain barrier». Cellular and Molecular Neurobiology, vol. 20, p. 57-76.

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

KOJIMA, T., N. Sawada, H. Chiba, Y. Kokai, M. Yamamoto, M. Urban, G. H. Lee, E. L. Hertzberg, Y. Mochizuki et D. C. Spray. 1999. «Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 266, p. 222-9.

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.

KOO, S. K., D. Y. Kim, S. D. Park, K. W. Kang et C. O. Joe. 1997. «PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells». Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 167, p. 41-9.

KOSS, G., W. Koransky et K. Steinbach. 1976. «Studies on the toxicology of hexachlorobenzene. II. Identification and determination of metabolites». Archives of Toxicology, vol. 35, p. 107-14.

KOSS, G. et D. Manz. 1976. «Residues of hexachlorobenzene in wild mammals of Germany». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 15, p. 189-91.

KOSS, G., S. Seubert, A. Seubert, W. Koransky et H. Ippen. 1978. «Studies on the toxicology of hexachlorobenzene. III. Observations in a long-term experiment». Archives of Toxicology, vol. 40, p. 285-94.

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

KRUGER, O., A. Plum, J. S. Kim, E. Winterhager, S. Maxeiner, G. Hallas, S. Kirchhoff, O. Traub, W. H. Lamers et K. Willecke. 2000. «Defective vascular development in connexin 45-deficient mice». Development, vol. 127, p. 4179-93.

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. 761-768.

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.

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

KRUTOVSKIKH, V. A., M. Oyamada et H. Yamasaki. 1991. «Sequential Changes of Gap-junctional intercellular Communications during Multistage Rat Liver Carcinogenesis : Direct Measurement of Communication In Vivo». Carcinogenesis, vol. 12, p. 1701-1706.

KUMAI, M., K. Nishii, K. Nakamura, N. Takeda, M. Suzuki et Y. Shibata. 2000. «Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis». Development, vol. 127, p. 3501-12.

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

KUMAR, N. M. et N. B. Gilula. 1992. «Molecular biology and genetics of gap junction channels». Seminars in Cell Biology, vol. 3, p. 3-16.

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

LAING, J. G. et E. C. Beyer. 1995. «The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 26399-403.

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., K. Jordan, T. Thomas, H. Qin, P. Fistouris et Q. Shao. 2001. «Comparative analysis and application of fluorescent protein-tagged connexins». Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 263-72.

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

LAIRD, D. W., K. L. Puranam et J. P. Revel. 1991. «Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes». Biochemical Journal, vol. 273(Pt 1), p. 67-72.

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

LAL, R. et H. Lin. 2001. «Imaging molecular structure and physiological function of gap junctions and hemijunctions by multimodal atomic force microscopy». Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 273-88.

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

LAMBRECHT, R. W., E. Erturk, H. A. Peters, C. R. Morris et G. T. Bryan. 1986. «Effects of ethylenediaminetetracetic acid on hexachlorobenzene-induced changes in rats». IARC Scientific Publications, vol. 505-6.

LARSEN, W. J. et T. Hai-Nan. 1978. «Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells». Tissue and Cell, vol. 10, p. 585-98.

LARSEN, W. J., H. N. Tung, S. A. Murray et C. A. Swenson. 1979. «Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane». Journal of Cell Biology, vol. 83, p. 576-87.

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

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

LEE, M. J. et S. K. Rhee. 1998. «Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in

- which the expression of connexin26 is induced». Molecules and Cells, vol. 8, p. 295-300.
- LEE, S. W., C. Tomasetto, D. Paul, K. Keyomarsi et R. Sager. 1992. «Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines». Journal of Cell Biology, vol. 118, p. 1213-1221.
- LEFEBVRE, P. P. et T. R. Van De Water. 2000. «Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene». Brain Research. Brain Research Reviews, vol. 32, p. 159-62.
- LEGAULT, N., H. Sabik, S. F. Coopert et M. Charbonneau. 1997. «Effet of Estradiol on the Induction of Porphyria by Hexachlorobenzene in the Rat». Biochemical Pharmacology, vol. 54, p. 19-25.
- LEONI, V., L. Fabiani, G. Marinelli, A. Morini, V. Aleandri, V. Pozzi, F. Cappa, D. Barbati, G. Pucetti, G. F. Tarsitani, A. De Carolis et N. Vescia. 1986. «Spontaneous Abortion in Relation to the presence of Hexachlorobenzene in the Italian Environment». IARC Science Publication, vol. 143-146.
- LEWIS, R. A. 2000. «The challenge of CMTX and connexin 32 mutations». Muscle and Nerve, vol. 23, p. 147-9.
- LI, D. et R. J. Mrsny. 2000. «Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin». Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 791-800.
- LIN, J. S., S. Fitzgerald, Y. Dong, C. Knight, P. Donaldson et J. Kistler. 1997. «Processing of the gap junction protein connexin50 in the ocular lens is accomplished by calpain». European Journal of Cell Biology, vol. 73, p. 141-9.
- LITTLE, T. L., E. C. Beyer et B. R. Duling. 1995. «Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo». American Journal of Physiology, vol. 268, p. H729-39.
- LO, C. W. 1999. «Genes, Gene Knockouts, and Mutations in the Analysis of Gap Junctions». Developmental Genetics, vol. 24, p. 1-4.
- LOEWENSTEIN, W. R. 1966. «Permeability of membrane junctions». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 137, p. 441-72.
- LYNCH, H. T., B. C. Frichot et J. F. Lynch. 1977. «Cancer control in xeroderma pigmentosum». Archives of Dermatology, vol. 113, p. 193-5.
- MACCALMAN, C. D., R. Farookhi et O. W. Blaschuk. 1994. «Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary». Clinical and

Experimental Metastasis, vol. 12, p. 276-82.

MACCALMAN, C. D., R. Farookhi et O. W. Blaschuk. 1995. «Estradiol Regulates N-Cadherin mRNA Levels in the Mouse Ovary». Developmental Genetics, vol. 16, p. 20-24.

MAKOWSKI, L., D. L. Caspar, W. C. Phillips et D. A. Goodenough. 1977. «Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data». Journal of Cell Biology, vol. 74, p. 629-45.

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

MARCHIO, A., P. Pineau, M. Meddeb, B. Terris, P. Tiollais, A. Bernheim et A. Dejean. 2000. «Distinct chromosomal abnormality pattern in primary liver cancer of non- B, non- C patients». Oncogene, vol. 19, p. 3733-8.

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

MARIEB, E.N. 1993. «Anatomie et Physiologie Humaine». ,Canada, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1014 pages.

MASUDA, M., S. Usami, K. Yamazaki, Y. Takumi, H. Shinkawa, K. Kurashima, T. Kunihiro et J. Kanzaki. 2001. «Connexin 26 distribution in gap junctions between melanocytes in the human vestibular dark cell area». Anatomical Record, vol. 262, p. 137-46.

MEITES, J. 1972. «Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat». Journal of the National Cancer Institute, vol. 48, p. 1217-24.

MEYER, D. J., S. B. Yancey et J. P. Revel. 1981. «Intercellular communication in normal and regenerating rat liver: a quantitative analysis». Journal of Cell Biology, vol. 91, p. 505-23.

MILKS, L. C., N. M. Kumar, R. Houghten, N. Unwin et N. B. Gilula. 1988. «Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site- directed antibody localizations». EMBO Journal, vol. 7, p. 2967-75.

MILLS, J. J., R. L. Jirtle et I. Boyer. 1995. «Liver regeneration and Carcinogenesis», Chapitre 9: Mechanisms of Liver Tumor Promotion, Academic Press, p. 199-226.

MIRONESCU, S. et R. Love. 1974. «DNA synthesis and transformation induced in density-inhibited cultures of hamster embryo cells by the carcinogen

- benzo(alpha)pyrene». Cancer Research, vol. 34, p. 2562-70.
- MIRSALIS, J. C., J. A. Monforte et R. A. Winegar. 1994. «Transgenic animal models for measuring mutations in vivo». Critical Reviews in Toxicology, vol. 24, p. 255-80.
- MOENNIKES, O., A. Buchmann, T. Ott, K. Willecke1 et M. Schwarz. 1999. «The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains». Carcinogenesis, vol. 20, p. 1379-82.
- 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.
- MUMMA, C. F. et E.W., Lawless. 1975. «Survey of Industrial Processing Data Task I - Hexachlorobenzene and Hexachlorabutadiene Pollution from Chlorocarbon Processes». Midwest Research Institute, prepared for Office of Toxic substances, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 175 pages.
- MUNARI-SILEM, Y. 1996. «Gap junctions in the thyroid gland: distribution, regulation, function». Annales d Endocrinologie, vol. 57, p. 484-6.
- MURRAY, S. A., W. J. Larsen, J. Trout et S. T. Donta. 1981. «Gap junction assembly and endocytosis correlated with patterns of growth in a cultured adrenocortical tumor cell (SW-13)». Cancer Research, vol. 41, p. 4063-74.
- MUSIL, L. S., E. C. Beyer et D. A. Goodenough. 1990. «Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post- translational phosphorylation». Journal of Membrane Biology, vol. 116, p. 163-75.
- MUSIL, L. S. et D. A. Goodenough. 1991. «Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques». Journal of Cell Biology, vol. 115, p. 1357-74.
- 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.
- NA, H. K., M. R. Wilson, K. S. Kang, C. C. Chang, D. Grunberger et J. E. Trosko. 2000. «Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line». Cancer Letters, vol. 157, p. 31-8.
- NAGY, J. I., D. Patel, P. A. Ochalski et G. L. Stelmack. 1999. «Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance». Neuroscience, vol. 88, p. 447-68.

- NAKAGAWA, M., H. Takashima, F. Umehara, K. Arimura, F. Miyashita, N. Takenouchi, W. Matsuyama et M. Osame. 2001. «Clinical phenotype in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with an entire deletion of the connexin 32 coding sequence». Journal of the Neurological Sciences, vol. 185, p. 31-7.
- NAUS, C. C., K. Elisevich, D. Zhu, D. J. Belliveau et R. F. Del Maestro. 1992. «In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA». Cancer Research, vol. 52, p. 4208-13.
- NAUS, C. C., S. Hearn, D. Zhu, B. J. Nicholson et R. R. Shivers. 1993. «Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA». Experimental Cell Research, vol. 206, p. 72-84.
- NEWHOOK, R. et M. E. Meek. 1994. «Hexachlorobenzene: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada». Environ. Carcino. Ecotox. Rev, vol. C12, p. 345-360.
- NICHOLSON, B., R. Dermietzel, D. Teplow, O. Traub, K. Willecke et J.-P. Revel. 1987. «Two homologous protein components of hepatic gap junctions». Nature, vol. 329, p. 732-734.
- NIELSEN, M., R. J. Ruch et O. Vang. 2000. «Resveratrol Reverses Tumor-Promoter-Induced Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 275, p. 804-809.
- NIESSEN, H., H. Harz, P. Bedner, K. Kramer et K. Willecke. 2000. «Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate». Journal of Cell Science, vol. 113 ( Pt 8), p. 1365-72.
- NUNN, R. S., T. J. Macke, A. J. Olson et M. Yeager. 2001. «Transmembrane alpha-helices in the gap junction membrane channel: systematic search of packing models based on the pair potential function». Microscopy Research and Technique, vol. 52, p. 344-51.
- O'BRIEN, J., R. Bruzzone, T. W. White, M. R. Al-Ubaidi et H. Ripps. 1998. «Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family». Journal of Neuroscience, vol. 18, p. 7625-37.
- OKAJIMA, E. et U. P. Thorgeirsson. 2000. «Different regulation of vascular endothelial growth factor expression by the ERK and p38 kinase pathways in v-ras, v-raf, and v-myc transformed cells». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 270, p. 108-11.
- OMORI, Y., M. L. Zaidan Dagli, K. Yamakage et H. Yamasaki. 2001. «Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice». Mutation Research, vol. 477, p. 191-6.

- OMORI, Y., A. Doflot-Dancer, M. Mesnil et H. Yamasaki. 1998. «Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects». Toxicology Letters, vol. 96, p. 105-110.
- OYAMADA, M., V. A. Krutovskikh, M. Mesnil, C. Partensky, F. Berger et H. Yamasaki. 1990. «Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43». Molecular Carcinogenesis, vol. 3, p. 273-8.
- PAUL, D. L. 1986. «Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein». Journal of Cell Biology, vol. 103, p. 123-34.
- PERAINO, C., R. J. Fry et E. Staffeldt. 1971. «Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene». Cancer Research, vol. 31, p. 1506-12.
- PEREIRA, M. A., S. L. Herren, A. L. Britt et M. M. Khoury. 1982. «Sex difference in enhancement of GGTase-positive foci by hexachlorobenzene and lindane in rat liver». Cancer Letters, vol. 15, p. 95-101.
- PETERS, H., D. Cripps, A. Gocmen, G. Bryan, E. Erturk et C. Morris. 1987. «Turkish epidemic hexachlorobenzene porphyria. A 30-year study». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 514, p. 183-90.
- PHELAN, P., J. P. Bacon, J. A. Davies, L. A. Stebbings, M. G. Todman, L. Avery, R. A. Baines, T. M. Barnes, C. Ford, S. Hekimi, R. Lee, J. E. Shaw, T. A. Starich, K. D. Curtin, Y. A. Sun et R. J. Wyman. 1998. «Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins». Trends in Genetics, vol. 14, p. 348-9.
- PHELAN, P. et T. A. Starich. 2001. «Innexins get into the gap». Bioessays, vol. 23, p. 388-96.
- PITOT, H. C. 1993. «The molecular biology of carcinogenesis». Cancer, vol. 72, p. 962-70.
- PITOT, H. C., Y. P. Dragan, J. Teegarden, S. Hsia et H. Campbell. 1996. «Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver». Toxicologic Pathology, vol. 24, p. 119-28.
- PITOT, H. C., T. Goldsworthy et S. Moran. 1981. «The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer». Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry, vol. 17, p. 133-46.
- PITOT, H. C., H. Hikita, Y. Dragan, L. Sargent et M. Haas. 2000. «Review article: the stages of gastrointestinal carcinogenesis-- application of rodent models to human disease». Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 14 Suppl 1, p. 153-60.
- POTTER, V. R. 1978. «Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of

partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture». British Journal of Cancer, vol. 38, p. 1-23.

POTTER, V. R. 1968. «Recent trends in cancer biochemistry: the importance of studies on fetal tissue». Can. Cancer Conf., vol. 8, p. 9-30.

POZZI, A., B. Risek, D. T. Kiang, N. B. Gilula et N. M. Kumar. 1995. «Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland». Experimental Cell Research, vol. 220, p. 212-9.

PURANAM, K. L., D. W. Laird et J. P. Revel. 1993. «Trapping an intermediate form of connexin43 in the Golgi». Experimental Cell Research, vol. 206, p. 85-92.

RAHMAN, S., G. Carlile et W. H. Evans. 1993. «Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 1260-5.

RAHMAN, S. et W. H. Evans. 1991. «Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops». Journal of Cell Science, vol. 100 ( Pt 3), p. 567-78.

RAMLJAK, D., R. J. Calvert, P. W. Wiesenfeld, B. A. Diwan, B. Catipovic, W. F. Marasas, T. C. Victor, L. M. Anderson et W. C. Gelderblom. 2000. «A potential mechanism for fumonisin B(1)-mediated hepatocarcinogenesis: cyclin D1 stabilization associated with activation of Akt and inhibition of GSK-3beta activity». Carcinogenesis, vol. 21, p. 1537-46.

REAUME, A. G., P. A. de Sousa, S. Kulkarni, B. L. Langille, D. Zhu, T. C. Davies, S. C. Juneja, G. M. Kidder et J. Rossant. 1995. «Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43». Science, vol. 267, p. 1831-4.

REDDY, B. S., K. Watanabe, J. H. Weisburger et E. L. Wynder. 1977. «Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats». Cancer Research, vol. 37, p. 3238-42.

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

REN, P., 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.

REVEL, J. P. et M. J. Karnovsky. 1967. «Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver». Journal of Cell Biology, vol. 33, p. C7-C12.

- RISLEY, M. S., I. P. Tan, C. Roy et J. C. Saez. 1992. «Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes». Journal of Cell Science, vol. 103 ( Pt 1), p. 81-96.
- RIZZARDINI, M. et A. G. Smith. 1982. «Sex differences in the metabolism of hexachlorobenzene by rats and the development of porphyria in females». Biochemical Pharmacology, vol. 31, p. 3543-8.
- ROBERTS, A. E., M. A. Ritz, S. Hoekstra, G. Descotes et J. R. Hincks. 1996. «Induction of liver cytochrome P-450 (CYP) 3A in male and female rats by a steroidal androgen receptor antagonist, zanoterone». Journal of Biochemical Toxicology, vol. 11, p. 101-10.
- ROZMAN, K., J. R. Gorski, P. Rozman et A. Parkinson. 1986. «Reduced Serum Thyroid Hormone Levels in Hexachlorobenzene-Induced Porphyria». Toxicology Letters, vol. 30, p. 71-78.
- RUCH, R. J., X. Guan et K. Sigler. 1995. «Inhibition of gap junctional intercellular communication and enhancement of growth in BALB/c 3T3 cells treated with connexin43 antisense oligonucleotides». Molecular Carcinogenesis, vol. 14, p. 269-74.
- RUCH, R. J. 1994. «The Role of Gap Junctional Intercellular Communication in Neoplasia». Annals of Clinical and Laboratory Science, vol. 24, p. 216-231.
- RUCH, R. J., W. J. Bonney, K. Sigler, X. Guan, D. Matesic, L. D. Schafer, E. Dupont et J. E. Trosko. 1994. «Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells». Carcinogenesis, vol. 15, p. 301-306.
- RUMSBY, P. C., J. G. Evans, H. E. Phillimore, P. Carthew et A. G. Smith. 1992. «Search for Ha-ras codon 61 mutations in liver tumours caused by hexachlorobenzene and Aroclor 1254 in C57BL/10ScSn mice with iron overload». Carcinogenesis, vol. 13, p. 1917-20.
- RUP, D. M., R. D. Veenstra, H. Z. Wang, P. R. Brink et E. C. Beyer. 1993. «Chick connexin-56, a novel lens gap junction protein. Molecular cloning and functional expression». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 706-12.
- SAETER, G. et P. O. Seglen. 1990. «Cell biology of hepatocarcinogenesis». Critical Reviews in Oncogenesis, vol. 1, p. 437-66.
- SAEZ, J. C., V. M. Berthoud, A. P. Moreno et D. C. Spray. 1993. «Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications». Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, vol. 27, p. 163-98.
- 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.

SAINATI, L., A. Leszl, M. Stella, A. Montaldi, G. Perilongo, M. Rugge, S. Bolcato, A. Iolascon et G. Basso. 1998. «Cytogenetic analysis of hepatoblastoma: hypothesis of cytogenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study». Cancer Genetics and Cytogenetics, vol. 104, p. 39-44.

SAITOU, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda et S. Tsukita. 1998. «Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions». The Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 397-408.

SALA, M., N. Ribas-Fito, E. Cardo, M. E. de Muga, E. Marco, C. Mazon, A. Verdu, J. O. Grimalt et J. Sunyer. 2001. «Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure across placenta». Chemosphere, vol. 43, p. 895-901.

SALA, M., J. Sunyer, C. Herrero, J. To-Figueras et J. Grimalt. 2001. «Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population». Occupational and Environmental Medicine, vol. 58, p. 172-7.

SASAKI, Y., T. Tsujiuchi, N. Murata, T. Kubozoe, M. Tsutsumi et Y. Konishi. 2000. «Absence of p16, p21 and p53 gene alterations in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine or a choline-deficient L- amino acid-defined diet in rats». Cancer Letters, vol. 152, p. 71-7.

SATOH, K., A. Kitahara, Y. Soma, Y. Inaba, I. Hatayama et K. Sato. 1985. «Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, p. 3964-8.

SCHERER, E. et P. Emmelot. 1975. «Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and liver tumour formation by diethylnitrosamine in the rat». European Journal of Cancer, vol. 11, p. 689-96.

SCHULTE-HERMANN, R., B., Grasl-Kraupp, et W. Bursch. 1995. «Apoptosis and Hepatocarcinogenesis». Academic Press, San Diego.

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

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

- SIMON, A. M., D. A. Goodenough, E. Li et D. L. Paul. 1997. «Female infertility in mice lacking connexin 37». Nature, vol. 385, p. 525-9.
- SIMON, A. M., D. A. Goodenough et D. L. Paul. 1998. «Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block». Current Biology, vol. 8, p. 295-8.
- SMITH, A. G. et J. R. Cabral. 1980. «Liver-cell tumours in rats fed hexachlorobenzene». Cancer Letters, vol. 11, p. 169-72.
- SMITH, A. G. et J. E. Francis. 1981. «Increased inhibition of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase by hexachlorobenzene in male rats given the oestrogenic drugs diethylstilboestrol and chlorotrianisene». Biochemical Pharmacology, vol. 30, p. 1849-53.
- SMITH, A. G., J. E. Francis, D. Dinsdale, M. M. Manson et J. R. Cabral. 1985. «Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria». Carcinogenesis, vol. 6, p. 631-6.
- SOSINSKY, G. 1995. «Mixing of connexins in gap junction membrane channels». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 9210-4.
- STARICH, T. A., R. Y. Lee, C. Panzarella, L. Avery et J. E. Shaw. 1996. «eat-5 and unc-7 represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling». Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 537-48.
- STAUFFER, K. A. 1995. «The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2- connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 6768-72.
- STECHEP, P.G., M., Windholz et D.S., Leahy. 1968. «The Merk Index». Merk et Co., Inc, Rahway, N.J., USA, 714 pages.
- STEEL, G.G. 1977. «Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer». Chapitre 7, Clarendon Press, Oxford, England, pages 217-267.
- STEIN, L. S., J. Boonstra et R. C. Burghardt. 1992. «Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells». Experimental Cell Research, vol. 198, p. 1-7.
- STEINEL, H. H., A. M. Bonin, S. He et R. S. Baker. 1993. «Cytogenetic damage and tumor incidence in mouse skin after single, topical applications of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene». Mutation Research, vol. 285, p. 19-26.
- STRIK, J. J. 1986. «Subacute toxicity of hexachlorobenzene». IARC Scientific Publications, vol. 335-42.
- TAKAKURA, S., T. Kohno, K. Shimizu, S. Ohwada, A. Okamoto et J. Yokota. 2000.

- «Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers». Oncogene, vol. 19, p. 836-40.
- TATENO, C., S. Ito, M. Tanaka, M. Oyamada et A. Yoshitake. 1994. «Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats». Carcinogenesis, vol. 15, p. 517-21.
- TEMME, A., A. Buchmann, H. D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz et K. Willecke. 1997. «High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32». Current Biology, vol. 7, p. 713-6.
- TODMAN, M. G., R. A. Baines, L. A. Stebbings, J. A. Davies et J. P. Bacon. 1999. «Gap-Junctional communication between developing Drosophila muscles is essential for their normal development». Developmental Genetics, vol. 24, p. 57-68.
- TRAUB, O., P. M. Druge et K. Willecke. 1983. «Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 80, p. 755-9.
- TRAUB, O., J. Look, D. Paul et K. Willecke. 1987. «Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes». European Journal of Cell Biology, vol. 43, p. 48-54.
- TROSKO, J. E. et C. Chang. 1978. «Genes, pollutants and human diseases». Quarterly Reviews of Biophysics, vol. 11, p. 603-27.
- TROSKO, J. E. et R. J. Ruch. 1998. «Cell-Cell Communication in Carcinogenesis». Frontiers in Biosciences, vol. 3, p. d208-236.
- TUCKER, M. A. et L. Barajas. 1994. «Rat connexins 30.3 and 31 are expressed in the kidney». Experimental Cell Research, vol. 213, p. 224-30.
- TUTTLE, J.R. 1979. «A survey of the sources, uses and environmental distribution of hexachlorobenzene in Alberta, Saskatchewan, Manitoba and hte NorthWest Territories». Environmental Protection Service, Fisheries and Environment Canada, Edmonton, 94 pages.
- VAN OMMEN, B. et P. J. van Bladeren. 1989. «Possible reactive intermediates in the oxidative biotransformation of hexachlorobenzene». Drug Metabolism and Drug Interactions, vol. 7, p. 213-43.
- VAN RAAIJ, J. A. G. M., C. M. G. Frijters et K. J. van den Berg. 1993. «Hexachlorobenzene-Induced Hypothyroidism Involvement of Different Mechanisms by Parent compound and Metabolite». Biochemical Pharmacology, vol. 46, p. 1385-1391.

- VAN RAAIJ, J. A. G. M., K. J. van den Berg et W. R. F. Notten. 1991. «Hexachlorobenzene and its Metabolites Pentachlorophenol and Tetrachlorohydroquinone: Interaction with Thyroxine Binding Sites of Rat Thyroid Hormones Carriers Ex Vivo and In Vitro». Toxicology Letters, vol. 59, p. 101-107.
- VLEMINCKX, K., L. Vakaet Jr, M. Mareel, W. Fiers et F. van Roy. 1991. «Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role». Cell, vol. 66, p. 107-19.
- WANG, Y. et B. Rose. 1995. «Clustering of Cx43 cell-to-cell channels into gap junction plaques: regulation by cAMP and microfilaments». Journal of Cell Science, vol. 108 ( Pt 11), p. 3501-8.
- WÄRNGÄRD, L., Y. Bager, Y. Kato, K. Kenne et U. G. Ahlborg. 1996. «Mechanistical Studies of the Inhibition of Intercellular Communication by Organochlorine Compouds». Archives of Toxicology. Supplement, vol. 18, 149-158.
- WHITE, T. W. 2000. «Functional analysis of human Cx26 mutations associated with deafness». Brain Research. Brain Research Reviews, vol. 32, p. 181-3.
- WHITE, T. W., R. Bruzzone, D. A. Goodenough et D. L. Paul. 1992. «Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70». Molecular Biology of the Cell, vol. 3, p. 711-20.
- WHITE, T. W., D. A. Goodenough et D. L. Paul. 1998. «Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts». Journal of Cell Biology, vol. 143, p. 815-25.
- WILGENBUS, K. K., C. J. Kirkpatrick, R. Knuechel, K. Willecke et O. Traub. 1992. «Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues». International Journal of Cancer, vol. 51, p. 522-9.
- WILLECKE, K., R. Heynkes, E. Dahl, R. Stutenkemper, H. Hennemann, S. Jungbluth, T. Suchyna et B. J. Nicholson. 1991. «Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung». Journal of Cell Biology, vol. 114, p. 1049-57.
- WILLIAMS, D. T., G. L. LeBel et E. Junkins. 1988. «Organohalogen residues in human adipose autopsy samples from six Ontario municipalities». Journal - Association of Official Analytical Chemists, vol. 71, p. 410-4.
- WILLIAMS, G. M., M. J. Iatropoulos et J. H. Weisburger. 1996. «Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology». Experimental and Toxicologic Pathology, vol. 48, p. 101-11.
- WILSON, M. R., T. W. Close et J. E. Trosko. 2000. «Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis».

Experimental Cell Research, vol. 254, p. 257-68.

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.

WITSCHI, H., D. Williamson et S. Lock. 1977. «Enhancement of urethan tumorigenesis in mouse lung by butylated hydroxytoluene». Journal of the National Cancer Institute, vol. 58, p. 301-5.

YAMAOKA, K., T. Nouchi, J. Tazawa, S. Hiranuma, F. Marumo et C. Sato. 1995. «Expression of gap junction protein connexin 32 and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma». Journal of Hepatology, vol. 22, p. 536-9.

YAMASAKI, H. 1991. «Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis». Environmental Health Perspectives, vol. 93, p. 191-7.

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 et Y. Omori. 1996. «Connexin genes and cell growth control». Archives of Toxicology. Supplement. Archiv fur Toxikologie. Supplement, vol. 18, p. 105-14.

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

YAMASAKI, H. et C. C. Naus. 1996. «Role of connexin genes in growth control». Carcinogenesis, vol. 17, p. 1199-213.

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, p. 191-198.

YANCEY, S. B., S. A. John, R. Lal, B. J. Austin et J. P. Revel. 1989. «The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains». Journal of Cell Biology, vol. 108, p. 2241-54.

YOSHIJI, H., S. R. Harris et U. P. Thorgeirsson. 1997. «Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells». Cancer Research, vol. 57, p. 3924-8.

ZAMPIGHI, G. A., D. D. Loo, M. Kreman, S. Eskandari et E. M. Wright. 1999. «Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis*

oocytes». Journal of General Physiology, vol. 113, p. 507-24.

ZHANG, J. T. et B. J. Nicholson. 1989. «Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA». Journal of Cell Biology, vol. 109, p. 3391-401.

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

ZHOU, X. W., A. Pfahnl, R. Werner, A. Hudder, A. Llanes, A. Luebke et G. Dahl. 1997. «Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels». Biophysical Journal, vol. 72, p. 1946-53.

ZIMMER, D. B., C. R. Green, W. H. Evans et N. B. Gilula. 1987. «Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures». Journal of Biological Chemistry, vol. 262, p. 7751-63.



## ANNEXE

### INTERACTION ENTRE LES JONCTIONS LACUNAIRES, LES JONCTIONS ADHÉRENTES ET LES JONCTIONS SERRÉES

#### **Introduction**

Il existe différents types de jonctions entre les cellules. Outre les jonctions lacunaires, les hépatocytes forment aussi deux autres types de jonctions: les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Il a été démontré dans plusieurs études que ces deux autres types de jonctions ont aussi un rôle très important lors de la cancérogenèse (Frixen et al., 1991 ; Mareel et al., 1994). Une dysfonction des protéines formant les jonctions serrées ou adhérentes est souvent associée avec la formation de tumeurs (Jeng et al., 2000 ; Efstathiou et al., 1999 ; Genda et al., 2000). De plus, plusieurs recherches démontrent que ces trois types de jonctions sont inter-reliées (Li et Mrsny, 2000). Dans le but de mieux comprendre les interactions entre les différentes protéines composant les jonctions lacunaires, serrées et adhérentes et leur importance lors de la cancérogenèse hépatique, quelques expériences préliminaires ont été réalisées en utilisant les groupes de rats femelles intactes, ovariectomisées et ovariectomisées avec des niveaux physiologiques d'estradiol (implant) décrits dans la section Matériel et méthode de l'article présenté précédemment. Cette annexe présentera, tout d'abord, une courte revue de la littérature sur les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, incluant leurs interactions avec les jonctions lacunaires. Suivra une brève description des méthodes utilisées (seuls les protocoles qui diffèrent des méthodes décrites précédemment seront présentés) et des résultats obtenus. Finalement, quelques conclusions seront tirées de ces résultats préliminaires. Ces résultats ont été obtenus dans le cadre du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire, mais ne sont pas inclus dans l'article.

#### **Revue de la littérature**

##### **1. Les jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes sont présentes à la membrane de pratiquement tous les types cellulaires. Elles permettent aux cellules de se rapprocher afin de communiquer

entre elles, soit par la formation de jonctions lacunaires ou serrées, soit directement par des interactions protéiques menant à une transduction de signaux au noyau (Behrens, 1995 ; Hirohashi, 1998 ; De La Coste et al., 1998).

Les cadhérines sont des protéines majeures de la jonction adhérente. Ce sont des glycoprotéines intégrales membranaires contenant un seul domaine transmembranaire. Les cadhérines sont des molécules d'adhésion dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est une famille de plus de cinquante membres qui se lie à des cadhérines de cellules adjacentes de façon homotypique. Leur domaine extra-cellulaire contient cinq régions répétées comprenant cent-dix acides aminés, chacun d'eux comprenant deux à cinq domaines de liaison aux  $\text{Ca}^{2+}$ , domaines important pour les interactions avec le calcium, mais aussi pour les interactions protéine-protéine (résumé dans Hirohashi, 1998). Les cadhérines de deux cellules pourront se lier, grâce à ces domaines, et former des liens solides afin de maintenir les cellules étroitement liées l'une à l'autre, étant connectées avec les filaments d'actine du cytosquelette via plusieurs types de protéines. Les cadhérines, formant le complexe d'adhésion cellulaire, sont reliées à des protéines cytoplasmiques, dont les caténines et/ou la caténine P120, qui elles sont reliées à la  $\alpha$ -caténine. Cette dernière se lie aux filaments d'actine (résumé dans Beavon, 2000). La cadhérine épithéliale (E-cad) est une des cadhérines majeures des cellules épithéliales, dont le foie.

La perte d'adhésion cellulaire a été associée au caractère métastatique des tumeurs (Frixen et al., 1991 ; Beavon, 2000 ; Genda et al., 2000 ; Hazan et al., 2000). En effet, pour que les cellules tumorales puissent migrer vers un nouveau lieu et développer de nouvelles tumeurs, elles doivent se séparer des cellules saines et tumorales environnantes. La perte des protéines composant les jonctions adhérentes, dont E-cad, a été associée à cette capacité à métastaser. Il est donc possible que lors de l'hépatocarcinogénèse chimique, il y ait des changements au niveau des jonctions adhérentes.

## **2. Les jonctions serrées**

Les jonctions serrées jouent un rôle central dans la formation de barrière entre un tissu et le milieu intercellulaire. Ce type de barrière est présent dans plusieurs autres tissus. Par exemple, la barrière hémato-encéphalique (Kniesel et Wolburg, 2000), les

barrières du système reproducteur mâle, soit la barrière hémato-testiculaire (Dym et Fawcett, 1970) et la barrière hémato-épididymaire (Gregory et al., 2001 ; Cyr et al., 1999) et la barrière intestinale (Hollander, 1999) comportent de nombreuses jonctions serrées. Au niveau du foie, les jonctions serrées scellent le lumen des canaux et servent de barrière paracellulaire entre la bile et le sang, et polarisent la cellule (Fallon et al., 1995). Elles participent également au contrôle de l'homéostasie en permettant le passage de certaines molécules par deux voies différentes. La première, très bien connue, est le passage transcellulaire par les pompes ATPasiques, les canaux ioniques et les transporteurs. La deuxième voie, beaucoup moins documentée, est le passage à travers les jonctions serrées elles-mêmes de certaines protéines. Ces deux voies permettent de conserver l'intégrité du tissu (Tsukita et Furuse, 2000).

Tout comme les jonctions adhérentes, les jonctions serrées sont formées de protéines transmembranaires, les occludines et les claudines, et de protéines cytoplasmiques, notamment ZO-1, ZO-2 et ZO-3, et elles aussi sont reliées aux cytosquelette d'actine (Cereijido et al., 2000). De plus, elles aussi sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie et leur absence peut entraîner des déficiences aux niveaux cellulaire et tissulaire.

### **3. Interaction entre les différentes jonctions**

Dans les hépatocytes, les trois types de jonctions (serrées, adhérentes et lacunaires) sont présentes. Plusieurs études ont démontré des interactions entre les protéines des jonctions. Par exemple, Kojima et al. (1999) ont transfecté des hépatocytes de souris CHST8 (ne possèdent pas de Cx26 ni de Cx32) avec la Cx32 et ont observé une co-localisation de la protéine avec la protéine des jonctions serrées occludine et une augmentation de l'expression des claudine-1 (Cl-1) et -2, également associées aux jonctions serrées. L'association entre la Cx32 et l'occludine a été, par la suite, démontrée par immunoprécipitation. Des résultats semblables ont été obtenus à l'aide d'hépatocytes de rat en culture (Kojima et al., 2001). Il a été démontré par immunoprécipitation que la Cx32, mais pas la Cx26, est associée avec occludine, Cl-1 et ZO-1. Fujimoto et al. (1997) quant à eux, ont démontré une co-localisation entre la E-cad et la Cx26 ainsi qu'entre la  $\alpha$ -caténine et la Cx26 dans le foie de rat. Finalement, Jongen et al. (1991) ont

démontré que la E-cad joue un rôle dans la régulation de la Cx43 dans une lignée cellulaire de kératinocytes de souris.

Ces différentes études démontrent bien l'existence d'une interaction entre les différents types de jonctions. Ces interactions pourraient être le reflet d'un contrôle similaire de l'expression de ces protéines. Il est possible que les modulations des connexines dues à l'ovariectomie et à l'estradiol observée lors des travaux expérimentaux (Figure 4 de l'article) soient aussi présentes aux niveaux des protéines des jonctions serrées et adhérentes. L'objectif de ces expériences était donc de vérifier si deux protéines, la E-cad et la Cl-1, composantes majeures des jonctions adhérentes et serrées, étaient régulées de façon similaire aux connexines dans le foie de rats femelles.

## **Matériel et méthodes**

### *Analyse Northern*

La régulation de E-cad et de Cl-1 a été étudiée à l'aide d'analyses de type Northern (pour description de la méthode, voir la section matériel et méthode du chapitre 2).

### *RT-PCR*

Les sondes pour la E-cad et pour l'occludine (Occ) ont été préparées tel que décrit précédemment (Dufresne et Cyr, 1999). Il est à noter qu'aucune analyse Northern n'a été réalisée avec la sonde d'Occ. Des amorces ont été synthétisées selon les séquences décrites par Johnson et al. (2000) pour E-cad et par Saitou et al. (1998) pour l'Occ:

#### **E-cad**

amorce sens : TGCCCCAGTATCGTCCCCGT ;

amorce anti-sens : CGGTTGCCCCATTCGTTTCAGATAA.

#### **Occ**

amorce sens : TTGGGACAGAGGCTATGG ;

amorce anti-sens : ACCCACTCTTCAACATTGGG.

Les ARNm du foie de rat ont d'abord été isolés par la méthode guanidinium isothiocyanate (Chomczynski et Sacchi, 1987). Une réaction de transcription inverse de ces ARNm a ensuite été réalisée selon le protocole suggéré par le manufacturier

(Pharmacia-Amersham Biotech, Baie d'Urfe, QC), afin d'obtenir des ADNc spécifiques aux gènes exprimés dans le foie. Par la suite, les ADNc spécifiques pour la E-cad ou l'Occ ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) selon un cycle de 94°C (30 sec), 60°C (30 sec) et 72°C (30 sec) pour E-cad et de 95°C (30 sec), 52°C (1 min) et 72°C (1 min) pour Occ à l'aide des amorces spécifiques. Les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% et visualisés à l'aide du bromure d'éthidium. Un fragment de 223 paires de base, correspondant à la E-cad et un fragment de 630 paires de base, correspondant à l'Occ, (**Figure 9**), ont ainsi pu être isolés. Par la suite, ces fragments furent incorporés dans des plasmides et transfectés à l'intérieur de bactéries. Des clones ayant incorporés les fragments au bon endroit dans le plasmide (sélectionné à partir d'une résistance à l'ampicilline provenant du plasmide et de l'incapacité de métaboliser le X-gal) ont été mis en culture afin d'obtenir des lignées de cellules possédant un plasmide qui contient soit le fragment pour E-cad ou le fragment pour Occ. Finalement, les plasmides de plusieurs cellules ont été isolés par mini-prep et séquencés afin de vérifier que les fragments incorporés dans les plasmides correspondaient bien à la E-cad et à l'Occ.

## **Résultats**

### *Régulation de l'expression de claudine-1*

Chez les femelles ovariectomisées, les niveaux d'ARNm codant pour Cl-1 n'étaient pas significativement différents des niveaux des femelles intactes. Cependant, chez les femelles ovariectomisées ayant reçu un implant de façon à garder un niveau physiologique d'estradiol circulant, il y a une rétro-inhibition d'environ 80% des niveaux d'ARNm par rapport aux femelles ovariectomisées et d'environ 70% par rapport aux femelles intactes (**Figure 10**).

### *Régulation de l'expression de E-cadhérine*

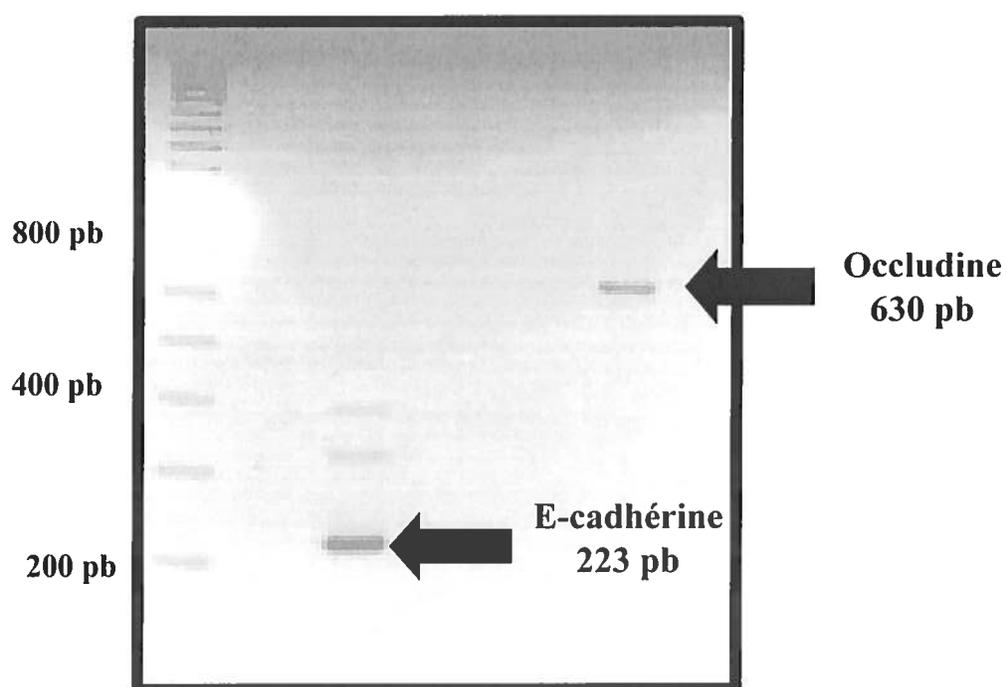
Chez les femelles ovariectomisées et chez les femelles ovariectomisées ayant reçu un implant de façon à garder un niveau physiologique d'estradiol circulant, les niveaux d'ARNm codant pour E-cad n'étaient pas significativement différents des niveaux des femelles intactes (**Figure 11**).

## Discussion

Les résultats expérimentaux ont permis de démontrer que l'expression de Cl-1 est modulée par l'estradiol en absence de facteurs ovariens. En effet, chez les femelles ovariectomisées et maintenues à des niveaux physiologiques d'estradiol, il y a une baisse significative de plus de 80% par rapport aux femelles ovariectomisées. Ces résultats démontrent que l'estradiol a un rôle de rétro-inhibition sur l'expression de la Cl-1. Cependant, l'ovariectomie ne module pas l'expression de Cl-1, puisqu'il n'y avait aucune différence significative entre les niveaux d'ARNm codant pour la Cl-1 entre les groupes de femelles ovariectomisées et intactes. Les résultats suggèrent donc qu'il y aurait deux (ou plus) facteurs ovariens responsables de l'expression de Cl-1, un ou des facteur(s) rétro-inhibant(s), dont l'estradiol, et un ou des facteur(s) augmentant l'expression de Cl-1. En absence des ovaires, les niveaux demeurent stables et sont probablement régulés par des facteurs non-ovariens. Cependant, lorsque les ovaires sont absents, mais en présence de l'estradiol, seul l'effet de rétro-inhibition de l'estradiol est visible. Il est difficile de spéculer sur le ou les autres facteurs ovariens responsables de la stimulation de l'expression de la Cl-1. Toutefois, comme la progestérone est impliquée dans la régulation d'autres protéines de jonctions (Grümmer et al., 1994 et 1999 ; Farookhi et al., 1997), son implication dans la régulation de Cl-1 ne peut pas être exclue.

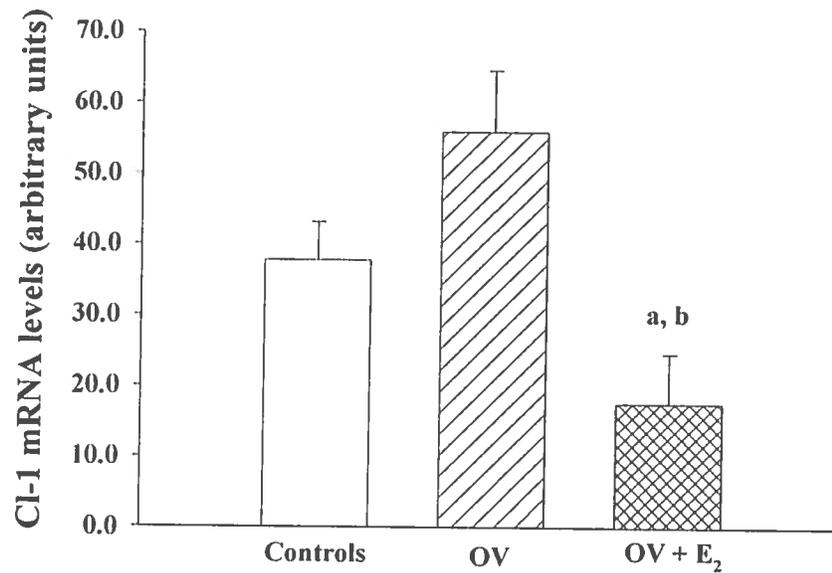
En ce qui concerne la E-cad, ni l'ovariectomie, ni l'estradiol ne régulent son expression. En effet, il n'y avait aucune différence significative entre ces deux groupes et les femelles intactes. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de différentes expériences démontrant un effet régulateur de l'estradiol sur l'expression de E-cad. Blaschuk et Farookhi (1989) ont démontré un stimulation de l'expression de E-cad dans les cellules de la granulosa de rat. MacCalman et al. (1994 et 1995) ont démontré une augmentation rapide de l'expression de N-cad et de E-cad dans l'ovaire de souris suite à une injection de  $17\beta$ -Estradiol. Par contre, contrairement aux résultats présentés par notre laboratoire, la majorité des données des autres groupes ont été obtenues suite à une exposition à des doses supra-physiologiques d'estradiol ou dans des tissus des systèmes reproducteurs mâle et femelles. Aucune donnée concernant la régulation de E-cad et de Cl-1 dans le foie n'est disponible.

Les résultats expérimentaux ont démontré que la E-cad n'est pas régulée ni par les ovaires, ni par l'estradiol dans le foie. L'expression de la Cl-1, par contre, est rétro-inhibée par l'estradiol en absence d'ovaires. Dans les deux cas, l'expression de ces protéines ne semble pas être reliée à celle des connexines.

**Figures**

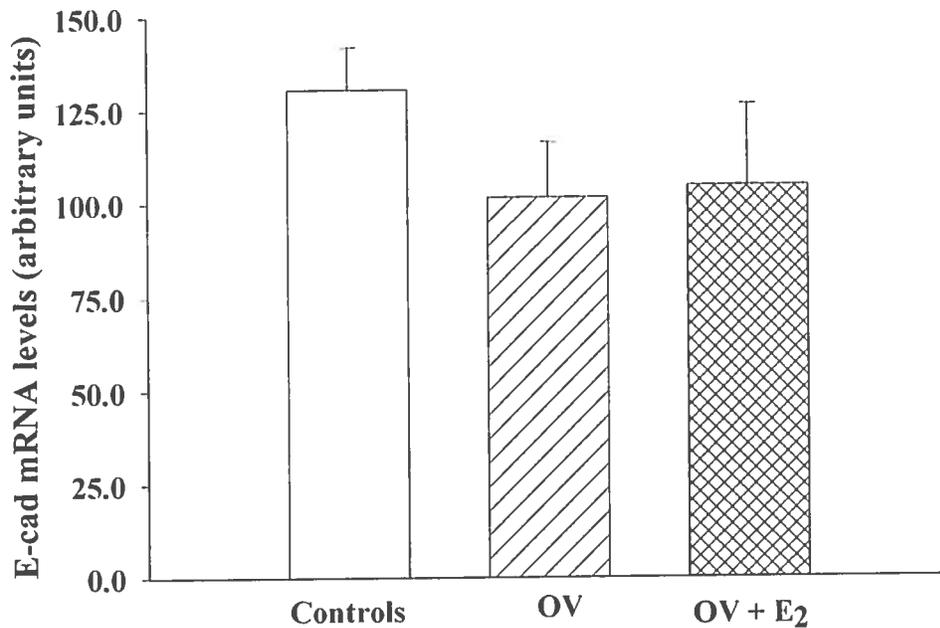
**Figure 9 : Isolation des sondes d'ADNc de E-cadhérine et d'occludine.**

Une réaction de RT a d'abord été réalisée sur des ARNm de foie de rat. Une réaction de PCR a ensuite été effectuée selon les conditions décrites dans la section matériel et méthode. Les sondes ont par la suite été isolées par électrophorèse sur gel d'agarose.



**Figure 10 : Analyses Northern de l'expression de Claudine-1 dans le foie de rat femelle.**

L'ARNm a été isolé selon la méthode guanidinium isothiocyanate et 10  $\mu$ g de chaque échantillon ont été migrés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane de nylon. Les membranes ont par la suite été hybridées avec la sonde d'ADNc de l'Occ marquée au P<sup>32</sup>. Le graphique représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M.) des niveaux d'ARNm codant pour la E-cad dans le foie des rats femelles pour chaque groupe (n=10), standardisée à l'aide du 18S.



**Figure 11 : Analyses Northern de l'expression de la E-cadhérine dans le foie de rat femelle.**

L'ARNm a été isolé selon la méthode guanidinium isothiocyanate et 10  $\mu$ g de chaque échantillon ont été migrés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane de nylon. Les membranes ont par la suite été hybridées avec la sonde d'ADNc de la E-cad marquée au P<sup>32</sup>. Le graphique représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M.) des niveaux d'ARNm codant pour la E-cad dans le foie des rats femelles pour chaque groupe (n=10), standardisée à l'aide du 18S.