

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N°...

**MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA TRANSITION
EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE AU NIVEAU HEPATIQUE : EFFETS DES
CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE Paul CEZANNE
Faculté des Sciences et Techniques

Discipline : sciences de l'environnement.
Biologie cellulaire – Toxicologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Ludovic Peyre-Teisseire

Le 6 Avril 2012

Le directeur de thèse : Dr Roger Rahmani

Ecole doctorale Sciences de l'environnement (ED251)

JURY

| | | |
|--------------------------|----------------------|-------------------|
| Bernard Salles | Professeur | président du jury |
| Pierre Savagner | Chargé de recherche | rapporteur |
| Xavier Coumoul | Professeur | rapporteur |
| Anne-Pascale Luzy | Chargée de recherche | examinatrice |
| Nathalie Zucchini-Pascal | Chargée de recherche | examinatrice |

ANNEE 2012

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N°...

**MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA TRANSITION
EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE AU NIVEAU HEPATIQUE : EFFETS DES
CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX**

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE Paul CEZANNE
Faculté des Sciences et Techniques**

Discipline : sciences de l'environnement.
Biologie cellulaire – Toxicologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Ludovic Peyre-Teisseire

Le 6 Avril 2012

Le directeur de thèse : Dr Roger Rahmani

Ecole doctorale Sciences de l'environnement (ED251)

JURY

| | | |
|--------------------------|----------------------|-------------------|
| Bernard Salles | Professeur | président du jury |
| Pierre Savagner | Chargé de recherche | rapporteur |
| Xavier Coumoul | Professeur | rapporteur |
| Anne-Pascale Luzy | Chargée de recherche | examinatrice |
| Nathalie Zucchini-Pascal | Chargée de recherche | examinatrice |

ANNEE 2012

A ma famille, mes amis, mon équipe, aux personnels INRA, TOXALIM, NEOMAH RT et GALDERMA R&D qui ont su me faire partager leur passion, me transmettre leur savoir et qui ont participé au bon déroulement de ces travaux. A tous ces gens : merci !

Et il crée le désordre par le fait même qu'il existe sans participer à l'ordre.

R. Barjavel

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATIONS | 8 |
| LISTE DES FIGURES | 14 |
| LISTE DES TABLEAUX | 16 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 17 |
| L'HEPATOCARCINOME (HCC)..... | 18 |
| <i>Description</i> | 18 |
| <i>Incidence / Données cliniques</i> | 19 |
| <i>Traitements</i> | 22 |
| <i>Avancées : implication du processus de TEM</i> | 24 |
| HISTOIRE DE LA TEM | 25 |
| MECANISMES GENERAUX | 28 |
| <i>Perte des caractères épithéliaux</i> | 30 |
| L'adhésion cellulaire | 30 |
| Les cadhérines | 32 |
| Les caténines | 34 |
| L1-CAM : molécule d'adhésion cellulaire L1 | 36 |
| La polarité | 37 |
| Arrêt du cycle cellulaire | 38 |
| La sénescence | 39 |
| La survie cellulaire / résistance à l'anoïkis | 40 |
| <i>Gain caractères mésenchymateux</i> | 44 |
| Production de facteurs de transcription..... | 44 |
| La matrice extracellulaire (MEC) | 52 |
| Interaction avec matrice extracellulaire | 53 |
| Les intégrines | 53 |
| ILK : kinase liée aux intégrines | 54 |
| Sécrétion des enzymes protéolytiques | 55 |
| Les métallo-protéases (MMPs)..... | 55 |
| Autres protéases de la MEC | 56 |
| Le cytosquelette d'actine | 56 |
| Migration | 58 |
| Invasion | 60 |
| Intravasation / Extravasation et TME | 60 |
| <i>Principales voies impliquées durant la TEM</i> | 62 |
| La voie ERK1/2 (RAS/MAPK) | 63 |
| La voie PI3K/AKT | 63 |
| La voie TGF β | 64 |
| La voie NF κ B/ Twist..... | 66 |
| La voie Wnt/ β -caténine | 66 |
| La voie EGFR..... | 68 |
| La voie Src/Fak | 68 |
| La voie Jagged/Notch | 70 |
| La voie Hedgehog (Hh) | 71 |
| Le stress oxydant et la voie PKC | 72 |

| | |
|---|------------|
| LA TEM DURANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE (TYPE 1) | 74 |
| <i>Formation de la crête neurale</i> | 74 |
| <i>Gastrulation</i> | 74 |
| <i>Développement</i> | 75 |
| LA TEM DURANT LA FIBROSE HEPATIQUE ET L'INFLAMMATION CHRONIQUE DU FOIE (TYPE2)..... | 75 |
| <i>Influence du microenvironnement stromal</i> | 76 |
| Les cellules étoilées (HSCs) | 76 |
| Fibroblastes (ou CAF pour carcinoma associated fibroblasts)..... | 77 |
| Autres cellules du stroma | 78 |
| <i>Les régulateurs de la fibrogenèse</i> | 79 |
| <i>Les marqueurs fibrotiques</i> | 79 |
| <i>La Cicatrisation</i> | 80 |
| LA TEM DURANT LE CANCER DU FOIE (TYPE3)..... | 80 |
| <i>Changements génétiques et épigénétiques</i> | 81 |
| Famille microARNs (miRNAs)..... | 81 |
| La réponse hypoxique : HIF-1 et l'angiogenèse | 83 |
| <i>Métastases</i> | 85 |
| <i>Expression des marqueurs de cellules souches</i> | 86 |
| PUBLICATIONS | 90 |
| INTRODUCTION : HCC ET PESTICIDES | 90 |
| RESULTATS | 94 |
| <i>La TEM : mécanismes hépatiques et applications</i> | 94 |
| Article 1: Crosstalk between β -catenin and Snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway | 94 |
| Article 2: effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance | 132 |
| Article 3: organochlorine pesticides induce epithelial to mesenchymal transition of human primary cultured hepatocytes | 169 |
| Article 4: atrazine represses <i>S100A4</i> gene expression and TPA-induced motility in HepG2 cells | 196 |
| <i>Impédance et TEM : des nouveaux outils en toxicologie</i> | 221 |
| Article 5: real time cellular impedance and metastasis biomarkers for the toxicological evaluation of chemicals effects on human cancer cells | 221 |
| CONCLUSIONS | 261 |
| PERSPECTIVES | 269 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 278 |
| ANNEXES | 302 |

ABREVIATIONS

| | |
|---------------|---|
| AA | Acide arachidonique |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AFP | foeto-protéine alpha |
| AJ | Jonctions adhérentes |
| AKT | Protéine kinase B |
| AMPC | Adénosine mono-phosphate cyclique |
| AP-1 | Protéine activatrice 1 |
| APC | Protéine activée C |
| ARF | Facteur d'ADP ribosylation |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARP2/3 | Protéines liées à l'actine 2/3 |
| α-SMA | Protéine actine musculaire lisse alpha |
| ATM | Protéine mutée lors de l'ataxie télangiectasie |
| ATR | Protéine liée à l'ATM |
| BAX | La Bcl-2-associated X protéine |
| BCL2 | Protéine du lymphome à cellules B |
| BMP | Protéine morphogénétique osseuse |
| BPA | Bisphénol A |
| BPO | Péroxyde de benzoyle |
| CAF | Fibroblastes associés aux carcinomes |
| CAV1 | Cavéoline 1 |
| CB | Carbamate |
| CCL | Chimiokine (C-C motif) ligand |
| CDC42 | Protéine homologue 42 contrôlant la division cellulaire |
| CD44 | Cluster de différenciation 44. Récepteur à l'acide hyaluronique |
| CDK | Protéine kinase dépendante des cyclines |
| CIRC | Centre international de recherche sur le cancer (IARC) |
| CK | Cytokératine |
| CLD | Maladie chronique du foie |
| C-met | Récepteur macrophages-stimulant. |

| | |
|--------------|--|
| CNRS | Centre national de la recherche scientifique |
| COX2 | Cyclooxygénase-2 |
| CRE | Elément de réponse à l'AMPc |
| CREB | Protéine se fixant sur le CRE |
| CSC | Cellule souche cancéreuse |
| CTC | Cellules tumorales circulantes |
| CTF-2 | Fragment C-terminal 2 de l'E-cadhérine |
| CTGF | Facteur de croissance tissulaire |
| CTM | micro-embolies tumorales circulantes |
| CXCL | Chémokines du groupe CXC |
| CYP | Cytochromes P450 |
| DAG | Diacylglycérol |
| DDT | Dichloro-diphényl-trichloroéthane |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DTC | Cellules stromales disséminées |
| EFSA | L'Autorité européenne de sécurité des aliments |
| EGF | Facteur de croissance épithéliale |
| EGFR | Récepteur aux facteurs de croissance épithéliaux |
| eNOS | Protéine synthase endothéliale de l'oxyde nitrique |
| EPCAM | Molécule d'adhésion cellulaire épithéliale |
| ER | Récepteur à l'œstrogène |
| ErbB | Récepteur de la même famille que l'EGFR |
| ERK | Kinase régulée par les signaux extracellulaires |
| ET1 | Endothéline 1 |
| FAK | Kinase d'adhésion focale |
| FGF | Facteur de croissance fibroblastique |
| FGFR | Récepteur aux facteurs de croissance fibroblastique |
| FLIP | Protéine inhibitrice FLICE-like |
| FOXC2 | Protéine de la famille des facteurs de transcription « fork head box » |
| FSP1 | Protéine fibroblastique 1 |
| FTS-1 | Site de transcription fibroblastique 1 |
| FZD | Protéine frizzled |
| GADD | Protéine « arrêt de la croissance et des dommages à d'ADN » |
| GAP | Protéines activatrices des GTPases |

| | |
|---------------------------------|---|
| GDI | Protéines inhibitrices de la dissociation de type guanine nucléotidique |
| GEF | Facteur d'échange de type guanine nucléotidique |
| GFAP | Protéine acide fibrillaire gliale |
| GLI | Protéine oncogène « zinc finger » associée aux gliomes |
| GPCR | Récepteur couplé aux protéines G |
| GRB7 | Protéine 7 liée aux récepteurs des facteurs de croissance |
| GSC | Protéine goosécoïde homeobox |
| GSK3β | Kinase glycogène synthase 3 beta |
| GST | Glutathion S transférase |
| HBV | Virus de l'hépatite B |
| HCC | Hépatocarcinome |
| HCH | Hépatocyte humain normal |
| HCV | Virus de l'hépatite C |
| HFN1β | Facteur nucléaire hépatocytaire homeobox beta |
| HGF | Facteur de croissance hépatocytaire |
| HHCP | Hépatocytes humains en culture primaire |
| HIF-1α | Facteur induit par l'hypoxie 1 α |
| HNF4α | Facteur nucléaire hépatocytaire alpha |
| HSC | cellules étoilées hépatiques |
| HSP | Protéine de choc thermique |
| ID1/2 | Facteur inhibiteur de différenciation 1/2 |
| IFN | Interféron |
| IG | Immunoglobuline |
| IGF | Facteur de croissance à l'insuline |
| IGFR | Récepteurs aux facteurs de croissance à l'insuline |
| IL | Interleukine |
| ILK | Kinase liée aux intégrines |
| ITF2 | Facteur de transcription immunoglobuline 2 |
| JNK | Protéine kinase c-Jun N-terminal |
| L1-CAM | Molécules d'adhésion cellulaire L1 |
| LAMC2 | Laminine gamma 2 |
| LAR | Protéine tyrosine phosphatase transmembranaire |
| LEF-1 | Facteur enhanceur lymphoïde 1 |

| | |
|---------------|--|
| LGL2 | Protéine létale des larves géantes 2 |
| LIMK | Protéine kinase 1 avec domaine « LIM » |
| LIV1 | Protéine transporteur régulée par l'œstrogène |
| LMR | Limite maximum de résidus autorisés |
| LOX | Protéine lysine oxydase |
| LOXL | Protéine lysine oxydase like |
| MAPK | Protéine kinase activée par mitogènes |
| MCF-7 | Fondation du Michigan pour le cancer. Cellules cancéreuses du sein |
| MCP1 | Protéine chémoattractive des monocytes |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MEK | Protéine ERK-kinase activée durant la mitose |
| MF | Myofibroblaste |
| miRNA | micro ARN |
| MMP | Métalloprotéase |
| MN | Micro noyau (test) |
| MSC | Cellule souche mésenchymateuse |
| MSK | Protéine kinase activée lors de stress et de la mitose |
| MSX2 | Protéine « msh homeobox 2 » |
| MTT | bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium |
| MUC | Mucine |
| NFκB | Facteur nucléaire kappa B |
| OC | Organochloré |
| OCT | Facteur de transcription « octamer-binding » |
| OLFM4 | Olfactoméline 4 |
| OP | Organophosphoré |
| OPN | Ostéopontine |
| P90RSK | Protéine S6 kinase ribosomique P90 |
| PAI-1 | Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 |
| PAK1 | Sérine/thréonine protéine kinase 1 |
| PCB | Polychlorobiphényle |
| PDGF | Facteur de croissance dérivé des plaquettes |
| PDGFR | Récepteur aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes |
| PK1 | Protéine kinase pyruvate déshydrogénase |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |

| | |
|--------------------------------|--|
| PI3K | Kinase 3-Phosphatidylinositol |
| PKA | Protéine kinase A |
| PKC | Protéine kinase C |
| POP | Polluant organique persistant |
| PP | Phospholipases |
| PPAR | Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes |
| PTEN | Protéine phosphatase et homologue de la tensine |
| PTP | Protéine tyrosine phosphatase |
| PXR | Le pregnane X récepteur |
| PYK2 | Protéine tyrosine kinase 2 riche en prolines |
| RAGE | Récepteur de produits de glycation avancée |
| RAS | Protéine du sarcome de rat |
| RB | Protéine du rétinoblastome |
| RCC | Cellules rénales cancéreuses |
| REACH | Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques |
| ROCK | Protéine kinase associée à Rho |
| ROS | Espèces réactives de l'oxygène |
| RTK | Récepteurs aux activités tyrosines kinases |
| RXR | Récepteur X de rétinoïdes |
| SCE | Echange de chromatines sœurs (test) |
| SCF | complexe ubiquitine ligase contenant les domaines Skp, Cullin et F-box |
| SDF1α | Facteur dérivé des cellules stromales 1 alpha |
| SMO | Smoothened. Protéine couplée aux récepteurs GPCR |
| SOX | Sry-related HMG box protein |
| SP-1 | Protéines de spécificité 1 |
| SPARC | Protéine acide sécrétée et riche en cystéines |
| SRC | Protéine tyrosine kinase proto-oncogénique (Schmidt-Ruppin A-2) |
| STAT | Transducteur du signal et activateur de la transcription |
| TAM | Macrophages associés aux tumeurs |
| TCDD | 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine |
| TCF | Facteur de transcription des cellules T |
| TEM | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| TGF-β | Facteur de croissance tumoral beta |

| | |
|---------------|--|
| TGF-βR | Récepteur aux facteurs de croissance tumoraux beta |
| THY1 | CD90. Glycoprotéine de surface |
| TIMP | Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases |
| TISC | Cellules tumorales à caractère de cellules souches |
| TJ | Jonctions serrées |
| TME | Transition mésoenchymo-épithéliale |
| TNF | Facteur de la nécrose tumorale |
| TNFR | Récepteur aux facteurs de la nécrose tumorale |
| TPA | Phorbol 12-myristate 13-acétate |
| TRE | Elément de réponse au TPA |
| UE | Union Européenne |
| uPA | Activateur urokinase du plasminogène |
| VDR | Récepteur à la vitamine D |
| VEGF | Facteur de croissance vasculaire endothéliale |
| VEGFR | Récepteur au facteur de croissance vasculaire endothéliale |
| WASP | Protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich |
| WISP1 | Protéine inductible via la voie de signalisation WNT |
| WNT | wingless-type MMTV integration site family member |
| XIAP | Protéine inhibitrice de l'apoptose |
| XRE | Elément de réponse aux xénobiotiques |
| ZEB1/2 | Facteurs de transcription au domaine de liaison en doigt de zinc E-Box |
| ZO-1/2 | Protéines des jonctions serrées de type occludines-1/2 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Evaluation du nombre de cancers en France en 2008. Données GLOBOCAN IARC. | 20 |
| Figure 2. Evaluation du nombre de cancers dans le monde en 2008. Répartition hommes-femmes. | 21 |
| Figure 3. Estimation du nombre de cancers du foie en France pour 2030. | 22 |
| Figure 4. Résumé chronologique des principales avancées concernant le processus de TEM. | 27 |
| Figure 5. Le processus de TEM, d'après H. Peinado et al., 2007. | 29 |
| Figure 6. Comparatif des principales caractéristiques entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses au cours de la TEM. | 31 |
| Figure 7. Voies de transduction impliquées dans les processus de survie (A), d'anoïkis (B) et dans la résistance à l'anoïkis (C) selon P. Chiarugi et E. Giannoni, 2008. | 43 |
| Figure 8. Régulation des gènes de la famille SNAIL par 1 A. Barrallo-Gimeno et al., 2005. | 45 |
| Figure 9. Schéma représentatif des différentes fonctions des gènes SNAIL, d'après A. Barrallo-Gimeno et M. Angela Nieto, 2005. | 46 |
| Figure 10. Organisation et fonctions du complexe des intégrines, d'après J. W. Yam et al., 2009. | 54 |
| Figure 11. Représentation schématique des marqueurs de la TEM. Les facteurs surexprimés impliqués dans les changements du cytosquelette et le phénotype mésenchymateux sont du côté vert, et des marqueurs réprimés normalement impliqués dans le maintien du phénotype épithélial sont du côté rouge. D'après O. De Wever et al., 2008. | 62 |
| Figure 12. Représentation schématique de la voie de signalisation FAK/SRC, d'après M. J. Van Nimwegen et al., 2007. | 69 |
| Figure 13. Les trois types de TEM d'après M. Zeisberg et E. G. Neilson, 2009. | 73 |
| Figure 14. Origine et rôle des myofibroblastes hépatiques, d'après M. Parola et M. Pinzani, 2010. | 78 |
| Figure 15. La connexion entre TEM, cellules souches cancéreuses et miRNA, d'après Z. Wang et al., 2010. | 83 |
| Figure 16. L'augmentation de l'activité de HIF favorise le développement de métastases via l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, d'après J. Jiang et al., 2011. | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figure 17. Représentation schématique de la TEM dans le cadre de conditions physiopathologiques, d'après A. Singh et J. Settleman, 2010. | 88 |
| Figure 18. Les cellules souches cancéreuses d'après A. Singh et J. Settleman, 2010. | 88 |
| Figure 19. Interactions entre la voie P53 et la voie du TGFβ dans le contrôle du processus de TEM et des caractères de cellule souche, d'après H. Siemens et al., 2011. | 263 |
| Figure 20. Observation des modifications phénotypiques et de la modulation des gènes <i>CDH1</i> , <i>FSP1</i> et de l' <i>albumine</i> sous l'effet du TPA. | 265 |
| Figure 21. Schéma hypothétique de l'action de l'endosulfan. | 270 |
| Figure 22. Action du TPA sur les cellules de la lignée HepG2 : zoom sur les processus apoptotiques. | 273 |
| Figure 23. Protocole de vigilance proposé pour un meilleur screening et une expertise approfondie des effets des xénobiotiques sur l'initiation et la progression tumorale <i>in vitro</i> . | 277 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1. Biomarqueurs utilisés pour le diagnostique des hépatocarcinomes. | <i>19</i> |
| Tableau 2. Incidence des cancers du foie et mortalité dans le monde en 2008. | <i>21</i> |
| Tableau 3 (modifié). Marqueurs de TEM selon M. Zeisberg et E. G. Neilson, 2009. | <i>89</i> |

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'hépatocarcinome (HCC)

Description

L'hépatocarcinome (HCC) est un cancer très virulent qui touche l'ensemble des populations mondiales pour des raisons parfois différentes en fonction de la région habitée. L'importante mortalité associée réside entre autre dans le manque d'options à ce jour à la disposition des cliniciens, et dans les diagnostics tardifs, les symptômes se déclarant souvent à un stade avancé du cancer. Les difficultés liées à cibler et à traiter le HCC réside dans le fait qu'il est à l'origine sous l'influence de deux mécanismes distincts, à savoir des mutations plus ou moins diverses et touchant différentes fonctions cellulaires, et une cirrhose liée à de nombreux dommages et associée à une régénération hépatique de ce fait permanente (*S. Whittaker et al., 2010*).

On sait donc à ce jour que la majorité des patients ayant un HCC souffraient à l'origine d'une maladie chronique du foie (CLD) telle que la cirrhose. Les facteurs de risque sont variés mais de manière générale, l'hépatite B et C ainsi que la consommation d'alcool restent les agents majoritaires dans l'incidence des pathologies hépatiques et leur évolution en hépatocarcinome. Les données récentes montrent que 80% des HCC déclarés proviennent d'une fibrose avancée due aux hépatites virales ou à l'alcool (*H. V. Malenstein et al., 2011*). Concernant l'Europe, l'Amérique et le Japon, entre 50 et 70% des HCC proviennent d'une contamination par le virus de l'hépatite C alors que l'hépatite B et l'alcool sont incriminés pour 10 à 20%. Pour l'Asie et l'Afrique, c'est l'hépatite B qui est responsable à 70% du développement des HCC contre 20% pour l'hépatite C et de manière intéressante, 10% pour l'Aflatoxine, une mycotoxine produite par des champignons et proliférant sur des graines conservées en atmosphère chaude et humide (*J. Bruix et al., 2004*).

On pense que l'apparition d'hépatocytes malins est un processus en plusieurs étapes résultant de l'accumulation d'altérations génétiques et conduisant à la mort cellulaire, à la prolifération et à la production de populations monoclonales. Ces populations entraînent le développement de nodules qui peuvent dans 30% des cas devenir malignes (*Theise et al., 2002 ; Borzio et al., 2003*). Cependant, il a été mis en évidence des facteurs génétiques pouvant prédisposer à la fibrose et à la cirrhose hépatique, telles que l'hémochromatose héréditaire ou les maladies du foie gras d'origine non alcooliques (*W. Mikulits, 2009*).

Différentes anomalies chromosomiques ont été mises en évidence sur HCC, affectant divers gènes et leur expression tels que L-myc et C-myc, CTNNB1 (codant pour la β -caténine et mutée dans 20-40% des cas), l'APC, l'AFP/Albumine/ α -FGF, M6P/IGF-IIR (récepteur à

l'insuline muté dans 18% des cas), p16INKA (6-30% des HCC) et p19ARF, PTEN (3% des HCC), WT-1, la cycline D1, l'IGF-II, Rb-1 (0-14% des HCC), AXIN1 (muté dans <10% des HCC), la E-cadhérine, SOCS-1, TP53 (> 50% des HCC), SMAD2 et SMAD4. Parmi ces molécules, certaines sont utilisées pour diagnostiquer les HCC. Celui ci se base sur différents critères (prolifération, altération chromosomique, angiogenèse...) impliqués dans les diverses étapes de la carcinogenèse. Ces nombreuses approches tendent à classifier au mieux le stade d'évolution de la maladie et à cibler le traitement le plus adapté (*voir tableau 1*).

Table1 - BIOMARQUEURS UTILISES POUR LE DIAGNOSTIQUE DES HEPATOCARCINOMES

| INSTABILITE GENOMIQUE | instabilité chromosomique | Aneuploidie | Instabilité microsatellite | morphologie noyau | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|---------|-----------|---------|----------|-------|---------|---------------------|-------|
| PROLIFERATION | PCNA | Ki-67 | Mcm-2 | MIB1 | MIA | CSE1U/CAS | nm-23 | PTEN | | | | |
| REGULATION miRNA | miR-195 | miR-221 | miR-122 | miR-101 | miR-126 | miR-96 | miR-375 | | | | | |
| PROTEINES REPARATRICES ADN | P53 | MDM2 | | | | | | | | | | |
| REGULATEURS CYCLE CELLULAIRE | Cyclins A/D/E | CDC2 | P15 | P16 (CDKN2A) | P18 | P19 | P21 | P27 | P57 | P73 | RB1 | |
| ONCOGENES & RECEPTEURS | K/HRAS | BRAF | c-myc | c-fms | HGF | c-met | erb-B | EGFR | TGF-β | TF | mTOR/AKT | |
| APOPTOSE | Fas (CD95 R) | FasL (CD95) | BCL-2 | BCL-XL | BAX | BAK | BCL-XS | SURVIVIN | COX-2 | XIAP | TRAIL | TWEAK |
| ACTIVITE TELOMERASE | TERT | | | | | | | | | | | |
| MOLECULES D'ADHESION | E-cadhérine | α/β-catenin (CTNNB1) | CD44 | AXIN1 | AFP | | | | | | | |
| DEGRADATION MEC | MMP2/9 | uPA | uPAR | PAI | | | | | | | | |
| ANGIOGENESE | VEGF | bFGF | PD-EGF | TSP | ES | MVD | HIF-1α | NOS | IL-8 | Ang-1/2 | microvessel density | c-KIT |
| INFLAMMATION | LTα/β | TWEAK | IL-6 | IFN signaling | NF-κB | TNF-α | | | | | | |

Incidence / Données cliniques

Depuis 2010, Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dispose d'un nouvel outil accessible à tous et permettant d'évaluer le nombre de cancers dans le monde. Le Globocan 2008 est une base de données utiles pour estimer le nombre de nouveaux cas de cancer et de décès par cancer et ce pour l'année 2008.

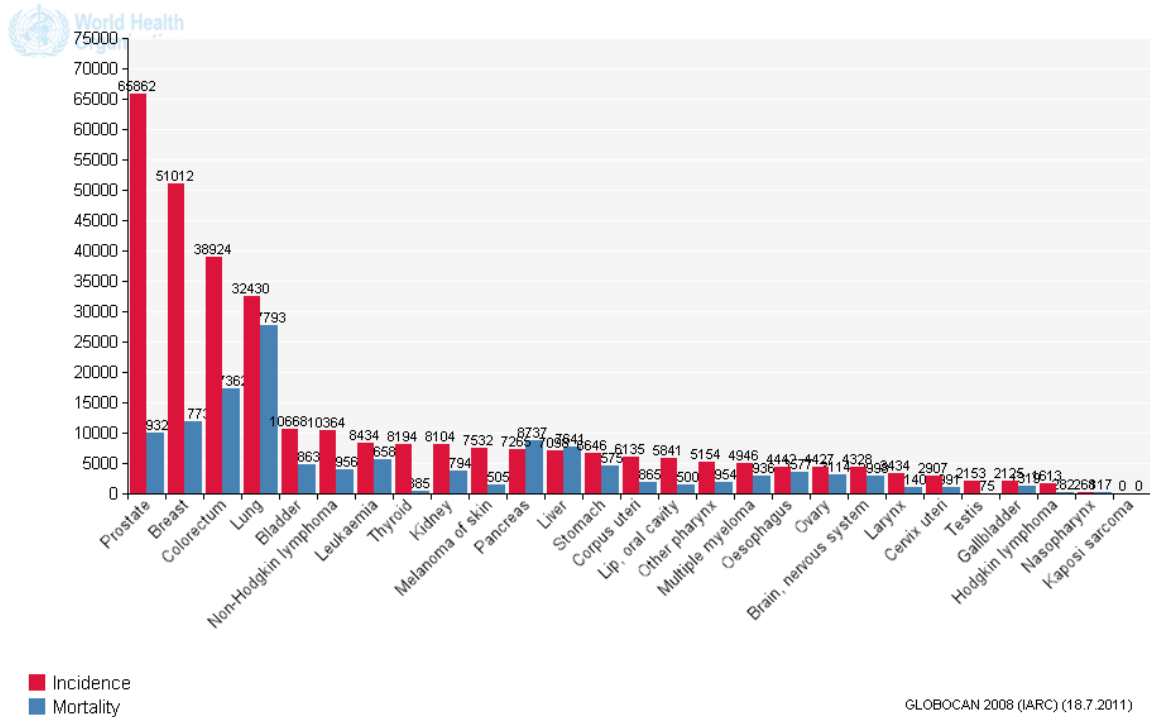


Figure 1. Evaluation du nombre de cancers en France en 2008.

D'après le site internet du Globocan, le cancer du foie représente le cinquième cancer le plus commun chez les hommes (523 000 cas, 7,9% du total des cancers) et le septième chez les femmes (226 000 cas soit 6,5% du total). Les pays en voie de développement sont les plus touchés. On y retrouve presque 85% des cas, en majorité chez les hommes (le sexe ratio global hommes-femmes est de 2,4). Les régions de forte incidence sont l'Est et le Sud-Est Asiatique, le Moyen-Orient et l'Afrique de l'Ouest, mais aussi la Mélanésie et la Micronésie / Polynésie où les hommes sont particulièrement touchés. On retrouve les plus faibles taux de cancer du foie dans les régions développées, à l'exception de l'Europe du Sud (Italie, France, Espagne, Grèce) où l'incidence chez les hommes (10,5 pour 100 000 ASR) est significativement plus élevée que dans les autres régions développées. Il a été répertorié 694 000 cas de décès par cancer du foie en 2008 (477 000 chez les hommes et 217 000 chez les femmes), et en raison de son fort taux de létalité (le taux global de mortalité par rapport à l'incidence est de 0,93), le cancer du foie est la troisième cause de décès par cancers dans le monde. La répartition géographique des taux de mortalité est similaire à celle observée pour l'incidence.

| Estimation (en milliers) | Hommes | | Femmes | | Deux sexes | |
|---|--------|-------|--------|-------|------------|-------|
| | Cas | Morts | Cas | Morts | Cas | Morts |
| Monde | 523 | 478 | 226 | 217 | 749 | 695 |
| Régions les plus développées | 82 | 75 | 40 | 39 | 122 | 114 |
| Régions les moins développées | 440 | 402 | 185 | 177 | 625 | 579 |
| WHO Région Africaine (AFRO) | 29 | 28 | 15 | 14 | 44 | 42 |
| WHO Région américaine (PAHO) | 31 | 28 | 20 | 21 | 51 | 49 |
| WHO Région de la méditerranée de l'est (EMRO) | 9 | 9 | 4 | 3 | 13 | 12 |
| WHO Région européenne (EURO) | 43 | 42 | 22 | 24 | 65 | 66 |
| WHO Région asiatique du sud-est (SEARO) | 46 | 42 | 21 | 20 | 67 | 62 |
| WHO Région pacifique ouest (WPRO) | 363 | 327 | 141 | 133 | 504 | 460 |
| Membres de l'IARC (21 pays) | 100 | 87 | 44 | 42 | 144 | 129 |
| USA | 15 | 12 | 6 | 5 | 21 | 17 |
| Chine | 292 | 266 | 109 | 105 | 401 | 371 |
| Inde | 14 | 12 | 5 | 5 | 19 | 17 |
| Union Européenne (UE-27) | 32 | 30 | 15 | 16 | 47 | 46 |

Tableau 2. Incidence des cancers du foie et mortalité dans le monde en 2008.

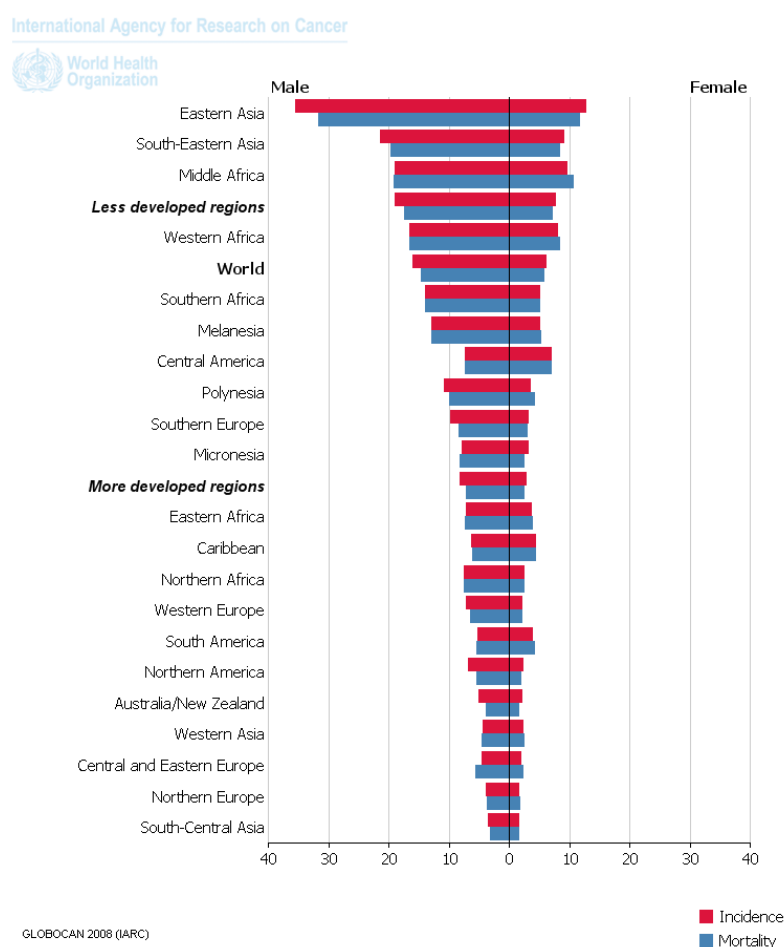


Figure 2. Evaluation du nombre de cancers dans le monde en 2008. Répartition hommes-femmes.

Concernant la France, 7098 nouveaux cas de cancer du foie ont été diagnostiqués en 2008 et on rapporte 7641 morts par ce même cancer. Les hommes sont les plus touchés (5656 décès contre 1985 pour les femmes) et en particulier les plus de 65 ans (4776 cas contre 2322 pour les moins de 65 ans). Compte tenu de l'augmentation de la démographie française, il a été estimé pour 2030 le nombre de 10 116 nouveaux cas de cancer du foie, soit une augmentation de près de 30%.

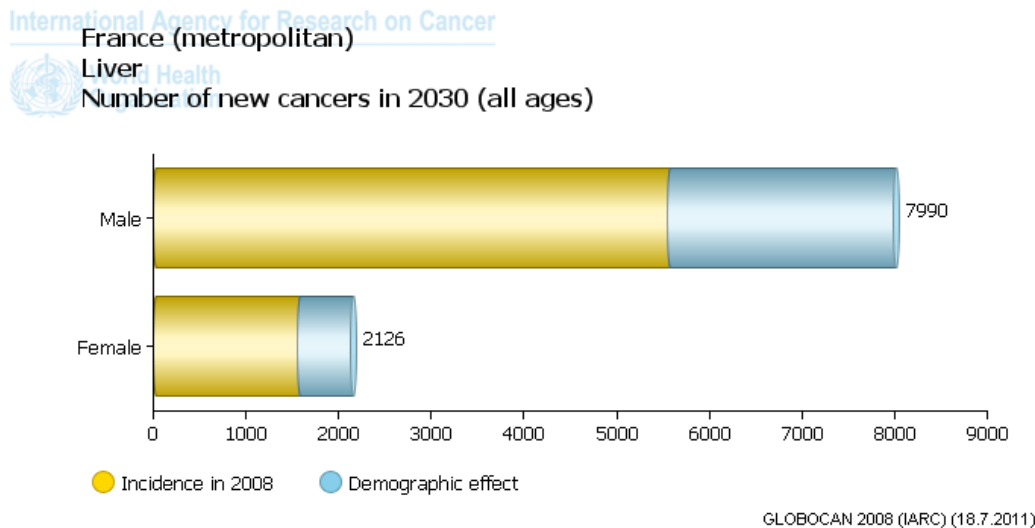


Figure 3. Estimation du nombre de cancers du foie en France pour 2030.

La majorité des décès avérés lors de cancer du foie fait suite à la progression de ce dernier en métastases.

Traitements

Le traitement clinique du HCC reste difficile en raison du haut taux de la récurrence des patients atteints et de l'aspect asymptomatique des premiers stades de la maladie (D. J. Tang et al., 2010). La cause majeure des décès par HCC est due à des métastases intra-hépatiques. Cependant, chaque hépatocarcinome peut être considéré comme unique par les cliniciens de part les dysfonctionnements moléculaires et cellulaires propres à chaque patient. En effet, bien que certaines mutations soient redondantes comme celles touchant à P53 (24 à 69% des HCC), P16, b-CATENIN, AXIN, RB1, IGF2R, ou encore PTEN, il existe une importante disparité dans les particularités des HCC des patients rendant les stratégies ciblant la pathologie difficiles à mettre en place.

En fonction du stade d'avancement de la tumeur hépatique, différentes stratégies sont préconisées :

- résection chirurgicale : c'est une ablation localisée qui préserve la fonction du foie. C'est généralement la première option envisagée.
- Transplantation hépatique : c'est une intervention chirurgicale lourde qui consiste à remplacer un foie malade par un foie sain provenant d'un autre individu en état de mort cérébrale (= allogreffe). Grâce à ses capacités régénératrices, il est également possible d'effectuer une telle transplantation à partir d'un greffon prélevé chez un donneur vivant appartenant à la famille proche du receveur.
- L'ablation percutanée : c'est une suppression des tissus à l'aide d'un courant électrique continu ou alternatif (radiofréquences) délivré par des électrodes placées à l'extrémité distale d'un cathéter.
- Thérapie palliative : elle consiste via différents traitements de type chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie, chimio embolie, injection d'alcool ou gel de la tumeur, à ralentir la croissance du cancer et à soulager les symptômes tels que la douleur, les problèmes respiratoires, la perte de poids ou encore la jaunisse.

En moyenne, on dénombre 15% des patients malades comme étant potentiellement éligibles pour une résection tumorale ou une transplantation du foie. Cependant, 50% d'entre eux récidiveront dans les 3 ans après la thérapie (*J. Chan et al., 2011*).

Les cibles thérapeutiques du HCC visent principalement la voie VEGF/VEGFR avec l'utilisation par exemple du Cétiranib ou du Linifanib, la voie EGF/EGFR avec l'Erlotinib, le Cetuximab ou encore le Gifitinib, et enfin un large spectre de protéines kinases avec l'utilisation des inhibiteurs multi kinases tels que le Sorafenib ou le Sunitinib (*S. Whittaker et al., 2006*). Mais les thérapies préconisées pour lutter contre la progression du HCC dépendent du stade et du niveau de différenciation. En effet, l'Erlotinib, un inhibiteur du récepteur à l'EGF, n'aurait des effets avérés que sur les seules cellules de patients exprimant la E-cadhérine, impliquant alors le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (*K. Suda et al., 2011*). De manière complémentaire, de récents travaux *in vitro* ont montré que l'utilisation combinée de deux anti-cancéreux (le sorafenib et la doxorubicine) pouvait à la fois diminuer la viabilité des populations épithéliales et la viabilité des populations mésenchymateuses toutes deux issues de la même tumeur hépatique. Les cellules mésenchymateuses sont généralement moins sensibles aux thérapies et sont suspectées d'être à l'origine des récidives. Cette inefficacité aux différents traitements est principalement due à la résistance développée par les cellules au phénomène d'apoptose (*I. Fabregat et al., 2007*). De plus, la combinaison

de ces deux médicaments permet de diminuer leur concentration administrée et donc, de limiter les effets secondaires sur les patients (*F. Van Zijl et al., 2011*).

Avancées : implication du processus de TEM

D'intéressants travaux sur HCC ont permis de relier l'activation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) avec la TEM, en mettant en évidence le rôle du récepteur sur la sensibilité des cellules à différents traitements anticancéreux (*B. C. Fuchs et al., 2008*). Pour cela, les auteurs ont utilisé des marqueurs de cellules épithéliales (E-cadhérine, AFP) et des marqueurs de cellules mésenchymateuses (Vimentine, CD44) pour discriminer et caractériser les différents types cellulaires issus des HCC. A partir de là, ils ont montré que les cellules mésenchymateuses étaient moins sensibles aux traitements à l'Erlotinib, à la Gécitinib et au Cétuximab, trois inhibiteurs de l'EGFR. Cela est dû à l'expression et à l'activation élevée de ILK (Integrin Linked kinase) qui relie le signal entre la voie AKT et STAT3, et l'EGFR durant la TEM. Ces travaux ont permis de comprendre pourquoi les thérapies visant l'inhibition de l'EGFR chez les patients diagnostiqués à un stade avancé (tumeurs non épithéliales) ne devaient pas être préconisées.

C'est donc dans la continuité de ces travaux que nous nous sommes focalisés sur le processus de TEM. En plus de rendre compte des problèmes liés à la résistance aux chimio thérapies sur HCC, la TEM est impliquée dans divers stades d'initiation et de progression tumorale, constituant ainsi une cible future pour les traitements du cancer hépatique. Les découvertes liées à ce processus ont en parallèle permis de comprendre comment s'organisaient et s'articulaient les connexions entre les différentes populations au sein d'une tumeur. Nous nous sommes intéressés pour notre part aux biomarqueurs de TEM et nous avons tenté de relier les effets des contaminants environnementaux à ce phénomène récemment décrit. L'objectif fut de rapprocher le domaine de la toxicologie à celui de l'oncologie dans un souci d'améliorer les techniques *in vitro*. En effet, le développement des biomarqueurs n'est pas nouveau et constitue encore aujourd'hui une base solide dans l'expertise toxicologique. Or l'avènement des biomarqueurs de TEM a ouvert une voie importante dans la compréhension et l'observation des effets des xénobiotiques environnementaux sur la santé humaine.

Histoire de la TEM

Longtemps la TEM fut assimilée à différents phénomènes cellulaires tels que la transformation, la diffusion, et la transdifférenciation consistant en un changement de cellules différenciées en d'autres cellules différenciées. Les exemples de cette confusion ne manquent pas et on retiendra la conversion des hépatocytes en cellules du canalicule pancréatique ou encore celle des cellules endothéliales en cellules musculaires lisses vasculaires. La terminologie était approximative et parfois incorrecte car le processus en lui-même était mal compris. Pourtant, le domaine de l'embryogenèse et de manière générale de la biologie du développement s'y intéresse depuis maintenant plus d'un siècle. Le phénomène date de 1908, année durant laquelle le zoologiste Franck Rattray Lillie publia l'une de ses premières éditions sur le développement embryonnaire du poulet. Indépendamment de cette découverte, Théodor Boveri identifia en 1914 la perte d'adhésion intercellulaire comme un processus essentiel au cours de la cancérogenèse. Pourtant, il faudra attendre plus d'un demi siècle pour avoir une description détaillée de la transition épithélio-mésenchymateuse. Elle fut tout d'abord observée et définie par Elizabeth Hay à la fin des années 1960 à Harvard et justement associée aux stades précoces du développement embryonnaire. Mais il faudra attendre les années 80 (*G. Greenburg and E. D. Hay, 1982*) pour avoir un portrait exact du phénomène. Alors étudiant dans le laboratoire d'Elizabeth Hay, Gary Greenburg déposa des cellules épithéliales provenant d'un embryon de poulet sur un tapis de collagène dans le simple but d'avoir un contrôle pour ses expériences en cours. De manière étonnante, il remarqua que ces cellules adoptèrent un phénotype mésenchymateux. A partir de ce jour, que ce soit dans le domaine de la biologie cellulaire ou de la biologie moléculaire, on a longtemps préféré parler de « plasticité » de manière prudente pour évoquer la transition et ses conséquences au niveau pathologique (cancer,...). Mais depuis maintenant une décennie, le terme de TEM s'est largement répandu, le processus est mieux compris et le domaine d'étude a évolué de manière exponentielle que se soit sur modèles *in vivo*, *in vitro* et en clinique. Déjà en 1980, le docteur Jean-Paul Thiery du CNRS trouva que les cellules issues d'un carcinome de la vessie chez le rat pouvaient en culture se transformer en cellules tumorales invasives mésenchymateuses puis revenir à leur état initial. Cependant personne ne comprenait le phénomène, mais ce fut les premières données associées au cancer concernant la TEM. Puis dans les années 90, le processus fut plus clairement associé aux mécanismes de développement, de progression tumorale (*P. Savagner et al., 1994*) et aux problèmes de métastases (*P. Ruiz, 1996*). Dès lors le rapport fut trouvé entre la succession d'évènements conduisant à la mise en place des

feuillet embryonnaire et à la formation des organes durant le développement, et les processus de migration cellulaire conduisant aux cancers métastatiques. S'en suivirent une course à la publication dans le domaine. La majorité des laboratoires travaillant sur le cancer sont à ce jour concernés par le processus de TEM et apportent leurs pierres à l'édifice. En 2002, l'équipe d'Eric Neilson de l'université de Vanderbilt à Nashville fut la première à faire le lien entre fibrose et TEM. Ils remarquèrent que les cellules épithéliales issues de reins de rats pouvaient basculer en un phénotype mésenchymateux et être à l'origine de troubles d'origine fibrotique. D'autres avancées majeures ont concerné l'importance de certains facteurs de transcription lors du phénomène. En 2002 toujours, Angela Nieto du Cajal Institute de Madrid montra que Snail était déterminant pour la TEM. En 2004, ce fut au tour de l'équipe de Weinberg de montrer qu'un autre facteur, Twist, était crucial lors du processus sur les cellules tumorales (K. Garber, 2008). Bien que des données *in vitro* soient présentes depuis plus de deux décennies donc, il fallut attendre 2003 et les travaux de l'équipe de Neilson pour avoir les premières confirmations *in vivo*. Ils montrèrent que des cellules FSP1 positives (protéine utilisée comme marqueur de TEM) extraites de tumeurs de souris transgéniques provoquaient une fois injectées sur d'autres souris des métastases, et ce de manière plus significative que s'ils avaient injecté des cellules FSP1 négatives. Le blocage de cette protéine étant suffisant pour inhiber le développement de métastases, ils conclurent à la possibilité du phénomène de TEM *in vivo*. Depuis les interrogations restent nombreuses et la course est lancée pour recueillir le maximum de preuves *in vivo* afin de réconcilier les pathologistes avec les biologistes moléculaires. Les observations sur les tumeurs humaines et sur les modèles animaux s'accumulent et ont fourni pour l'instant des preuves convaincantes quant à la pertinence du phénomène que ce soit au niveau de l'embryogenèse que de la carcinogenèse (K. Polyak et A. Weinberg, 2009). Néanmoins, les laboratoires pharmaceutiques, déjà convaincus, développent depuis peu des thérapies ciblant les cellules mésenchymateuses cancéreuses issues de la TEM, avec des résultats positifs encourageants, ce qui en soit peut être considéré comme une preuve supplémentaire de la pertinence du phénomène *in vivo*.

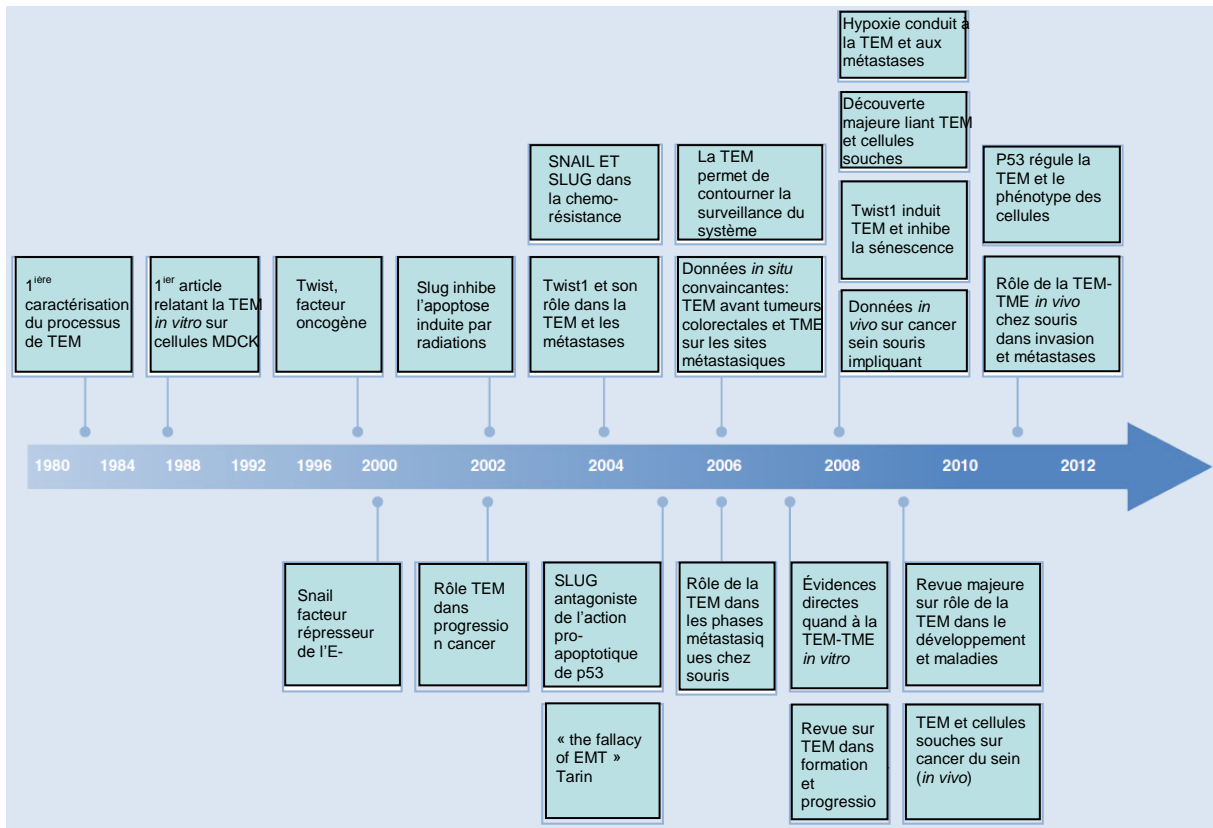


Figure 4. Résumé chronologique des principales avancées concernant le processus de TEM.

Mécanismes généraux

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus complexe comprenant une succession d'évènements plus ou moins étroitement liés mais dont la perturbation centrale et aussi la plus précoce réside en la perte des caractères épithéliaux, en particulier avec la dissociation des jonctions serrées et la dégradation des jonctions adhérentes et des desmosomes. Les origines de cette rupture de l'adhérence cellulaire sont diverses et variées, conduisant à la perte de la polarité baso-latérale spécifique des cellules épithéliales. En parallèle, on observe des changements métaboliques majeurs tels que l'augmentation de la glycolyse aérobie et l'activation d'un programme de survie. Ce dernier nécessite l'intervention de gènes anti-oxydants et de voies de survie (PI3K/AKT, NFkB, RAS/ERK, TWIST). L'acquisition de caractères mésenchymateux qui s'en suit est étroitement corrélée à une réorganisation du cytosquelette (formation de fibrilles de stress et réarrangement des adhésions focales), à des interactions nouvelles entre les cellules et le micro-environnement (tissus et matrice extra-cellulaire) et au gain d'un potentiel migratoire et invasif. Elle est consécutive à différents types de stimuli. On compte parmi eux les dommages cellulaires suite à des expositions à des agents infectieux, toxiques et/ou métaboliques, l'inflammation, l'augmentation de la concentration en facteurs de croissance et cytokines (VEGF, EGF, TGF β , Wnt, PGE $_2$...), mais aussi les changements en termes quantitatif et qualitatif de la composition de la matrice extracellulaire. Enfin le phénomène hypoxique et le stress oxydant peuvent également être des initiateurs de la TEM (*M. Pinzani et al., 2011*). Parmi les diverses singularités de ce processus, on dénombre la présence d'une séquence spécifique contenue au sein de la région promotrice de gènes impliqués dans la TEM (S100a4, Twist, Snail, E-cadhérine, β -caténine, vimentine, ZO-1, Collagène (I) α -1 et α -SMA). Ce domaine est appelé le FTS-1 pour Fibroblast Transcription Site-1 (*M. Zeisberg et al., 2009*). D'autres sites promoteurs sont reconnus être impliqués dans le processus de TEM telles que les séquences CarG, E-Box et LEF-1 (*C. D. Venkov et al., 2007*). La TEM est de plus facilitée par l'expression et la sécrétion locale de facteurs de croissance tels que le TGF β , l'EGF, l'IGF ou encore le FGF (*R. Kalluri et al., 2003*). Elle nécessite le maintien continu de l'action de facteurs de transcription pour l'expression de gènes cibles impliqués dans ce phénomène, sans lesquels les cellules épithéliales qui amorcent la transition reviennent à leur état initial. C'est un processus individuel dans le sens ponctuel car il ne touche pas toutes les cellules d'un tissu au même moment ce qui *in vivo* peut poser un problème quant à l'identification des cellules

qui sont en transition. *In vitro*, sur l'ensemble des cellules du foie, seuls les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules hépatiques étoilées (HSC) peuvent amorcer une TEM. Il est important de concevoir la TEM comme un processus dichotomique qui agit à la fois sur les stades précoces de cancérisation et sur les stades tardifs permettant la progression tumorale vers un état métastatique. Ce dernier point est crucial car il permet de comprendre la résistance des cellules mésenchymateuses aux différents traitements chimio- et radiothérapeutiques. Enfin, la TEM est un processus réversible. Les cellules mésenchymateuses possèderaient des caractéristiques proches des cellules souches pluripotentes. Ce rapprochement entre TEM et cellules souches a pour mérite de mettre en évidence la plasticité des cellules initiant ce phénomène (P. Savagner, 2010). Cette spécificité leur permet de s'installer et d'intégrer les tissus néo-colonisés lors de leur dissémination afin de proliférer à nouveau durant la phase métastatique.

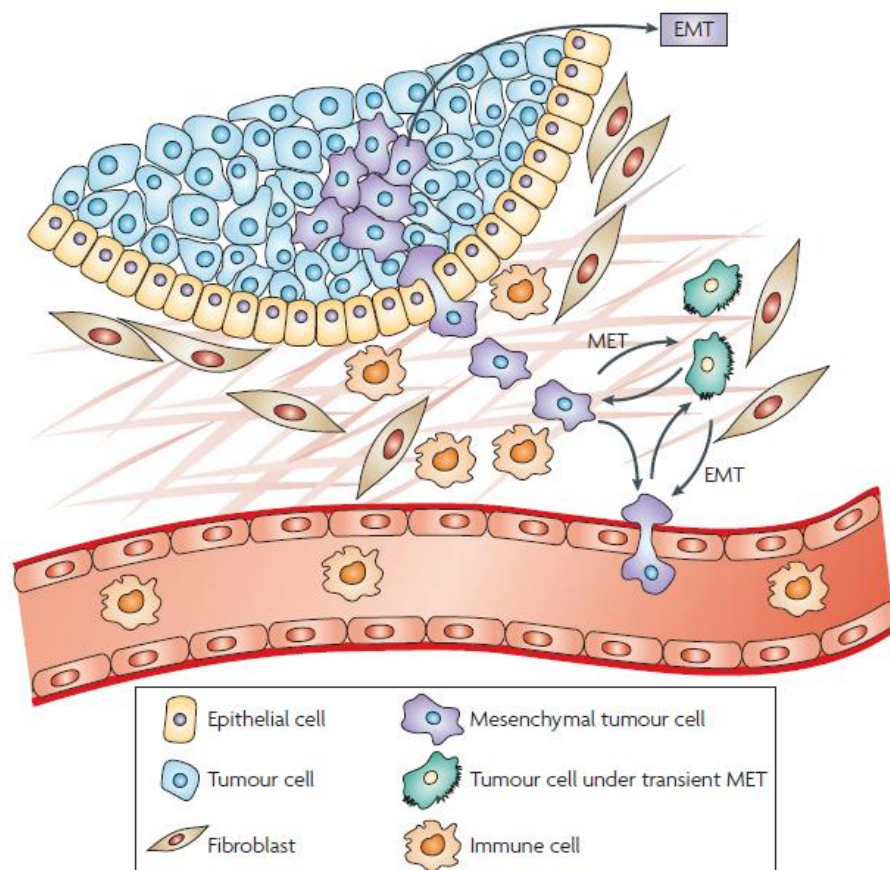


Figure 5. Le processus de TEM, d'après H. Peinado et al., 2007

Perte des caractères épithéliaux

Lors de la TEM, les cellules épithéliales perdent graduellement l'expression de protéines clef jouant un rôle dans les interactions entre cellules, ainsi qu'entre les cellules et les composants de la MEC. C'est la première étape de la TEM, inférant la diminution des forces adhésives et facilitant la dispersion des cellules normales ou cancéreuses à partir de la tumeur primaire.

L'adhésion cellulaire

La perte des adhésions est clairement corrélée à l'invasion des cellules et à leur dissémination (*J. J. Christiansen et al., 2006*). Durant la TEM, on observe la diminution d'un grand nombre de protéines adhésives, que ce soit la E-cadhérine des jonctions adhérentes (AJ pour Adherents Junctions), les Claudines et les Occludines des jonctions serrées, les « Gap junctions » (G) ou jonctions lacunaires responsables de la communication et des échanges entre les cellules, et les desmosomes (D) :

- Les jonctions adhérentes sont responsables de la stabilité des contacts entre les cellules épithéliales. En plus de l'E-cadhérine comme composant majeur, les AJ sont composées de protéines intracellulaires qui relient le cytosquelette d'actine aux jonctions : les α - et β -caténines et la P120-caténine.

- Les jonctions serrées sont localisées dans la partie apico-latérale des cellules épithéliales et jouent un rôle dans la polarité cellulaire. Elles sont composées principalement de protéines transmembranaires telles que les Claudines au nombre de 23 chez l'humain, les Occludines, les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM-A, -B et -C) et les protéines adaptatrices intracellulaires.

- Les Gap Junctions sont des canaux composés de deux connexons qui relient l'espace intercellulaire et qui permettent de réguler de manière sélective le trafic des petites molécules (<1 kDa) entre les cellules adjacentes. Chaque connexon est un pore à travers la membrane cellulaire, lui-même formé par un anneau de six protéines de type connexine.

- Les desmosomes forment des points d'attache entre les bords latéraux des cellules épithéliales adjacentes à l'aide de molécules de type cadhérine telles que la Desmoglérine et la Desmocolline. Elles se lient avec les fibres de cytokératine grâce à des protéines intermédiaires telles que la Desmoplakine et la γ -caténine formant la plaque desmosomale.

Chez les mammifères, les glucocorticoïdes sont connus pour faciliter le maintien des contacts entre les cellules au sein des épithéliums. Ils induisent la formation de jonctions serrées et adhérentes. C'est le cas de la Dexaméthasone, un stéroïde inhibant la dégradation de cadhérines et de caténines des cellules épithéliales (N. Carayol et al., 2002).

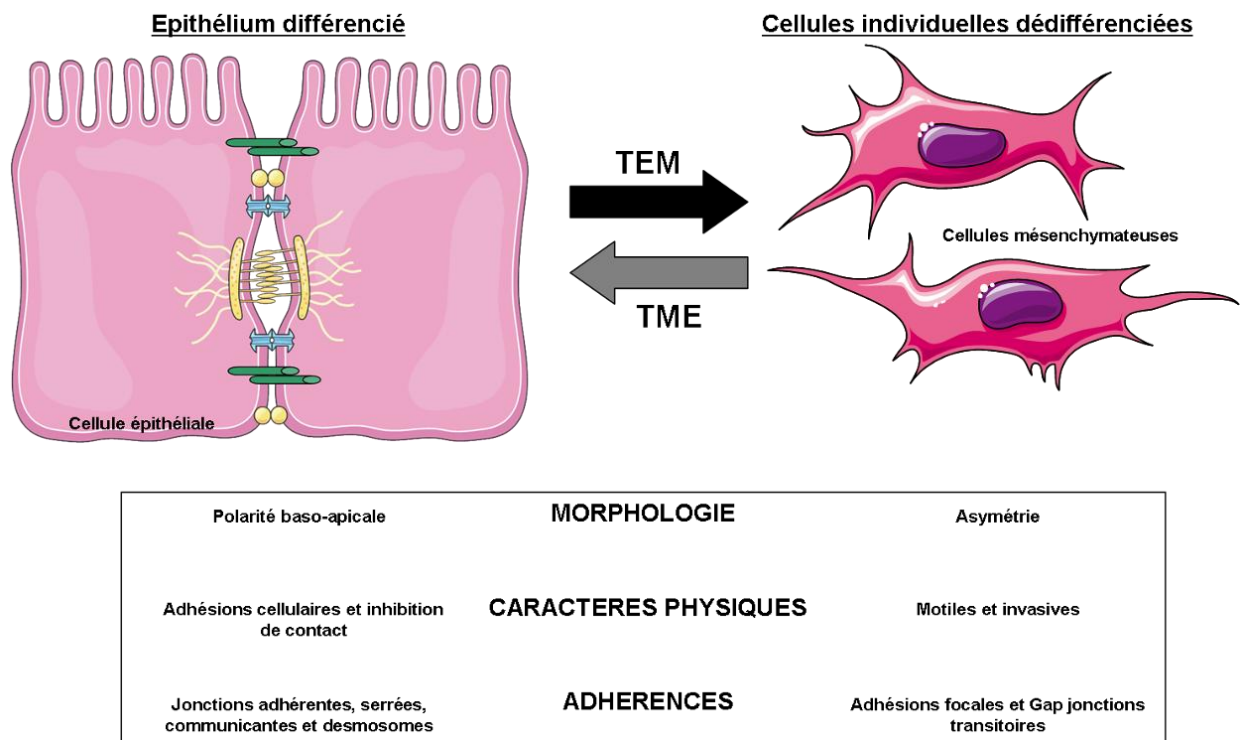


Figure 6. Comparatif des principales caractéristiques entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses au cours de la TEM

Les cadhérines

L'E-cadhérine est parmi l'ensemble des cadhérines la protéine référence lorsqu'on parle de TEM car c'est le marqueur moléculaire le plus exprimé et le mieux caractérisé dans les cellules épithéliales. Sur la séquence promotrice du gène CDH1 codant pour l'E-cadhérine se trouve une séquence consensus CANNTG appelées E-box. Il en existe 2 en amont du site d'initiation de la transcription et 1 sur l'exon sur lesquelles les facteurs de transcription Snail1, Slug, Zeb1 et Zeb2 viennent se fixer pour réprimer son expression génique. L'E-cadhérine est une protéine transmembranaire, localisée au niveau des jonctions adhérentes et au niveau de la membrane plasmique baso-latérale. Les interactions homotypiques entre les domaines extracellulaires sont calcium dépendants, alors que le domaine intracellulaire est lié aux caténines qui font office d'intermédiaire entre les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine (*J. J. Christiansen et al., 2006*). On notera que l'interaction de la partie cytoplasmique C-terminale de l'E-cadhérine avec la β -, la γ -, l' α -caténine et les filaments d'actine est dynamique. La E-cadhérine interagit physiquement avec certains récepteurs tyrosines kinases (RTKs) inducteurs de TEM (EGFR, C-Met, IGF-1R et FGFR), non RTK (c-Src), ou de prolifération (ErbB) qui lors de leurs activations peuvent participer à la dissociation des jonctions adhérentes via phosphorylation de la E-cadhérine ou des caténines associées (*S. Barr et al., 2008 ; J. P. Thiery et al., 2005*). Son clivage protéolytique se fait via la γ -Sécrétase. Les fragments cytoplasmiques ainsi obtenus (CTF-2) jouent un rôle dans la signalisation cellulaire en transloquant dans le noyau et en modulant l'expression transcriptionnelle de gènes en partenariat avec le répresseur Kaiso. Ils jouent également un rôle dans la formation des dimères nécessaires à la construction des adhésions (*R. B. Troyanovsky et al., 2007*). Durant la TEM, l'inactivation de l'E-cadhérine peut être causée par la répression transcriptionnelle de son promoteur, par son clivage (caspases, métalloprotéases...) ou par des mutations somatiques et des délétions chromosomiques touchant le gène CDH1 codant pour la protéine (*B. G. Hollier et al., 2009*). De manière générale, on retrouve une expression anormale d'E-cadhérine lors de cancers. Dans de nombreux cas dont le HCC, la perte de l'E-cadhérine peut être également liée à un « silencing » transcriptionnel du promoteur via hyperméthylation de régions appelées « CpG islands » ou via dé-acétylation de l'histone H3 (*S. J. Nass et al., 2000 ; A. Wells et al., 2008*). Comme l'ensemble des cadhérines, la E-cadhérine régule la morphologie des cellules épithéliales, la ségrégation, la migration, la prolifération et la différenciation (*N. A. Gloushankova, 2008*). Elle est considérée comme un suppresseur de tumeur en raison de son rôle contre les carcinomes liés

au processus de TEM au sein des sites primaires. De ce fait, les cibles thérapeutiques ciblant l'E-cadhérines doivent prendre en compte la dynamique d'expression de cette protéine au sein des tumeurs, car la ré-expression suite au processus de MET constitue à la fois une résistance aux chimiothérapies et une latence qui jouerait un rôle dans la rechute de la maladie (A. Wells et al., 2008). Des études ont montré que la progression tumorale est corrélée *in vitro* et *in vivo* à la perte de son expression, à un dysfonctionnement ou à la perte de sa localisation normale au niveau des contacts cellules-cellules (A. Jeanes et al., 2008). En conclusion, la perte de l'E-cadhérine, que ce soit par régulation épigénétique (hyperméthylation), par régulation transcriptionnelle (surexpression de facteurs répresseurs) ou par activation de récepteurs conduisant à sa dégradation, constituerait donc un avantage sélectif pour l'évolution métastatique. Cette cadhérine est donc considérée comme le « golden marker » de la TEM, toujours utilisé lors des études y compris cliniques, incluant le HCC (T. Nagai et al., 2011 ; J. Wu et al., 2011).

La N-cadhérine est retrouvée généralement dans les cellules neuronales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes, dans le mésothélium, les myocytes, les oocytes, les cellules de Sertoli, les spermatides et dans le cartilage des membres. Les contacts cellules-cellules sont plus faibles que chez celles où domine l'E-cadhérine. Comme la N-cadhérine est impliquée dans l'invasion et les métastases, le switch E-cadhérine/N-cadhérine est considéré comme un marqueur de TEM (J. Y. Chai et al., 2010). Elle semblerait interagir avec le récepteur FGF et permettrait l'activation de la voie MAPK et la modulation de l'expression des métallo-protéases (K. Suyama et al., 2002). Cependant, contrairement à l'E-cadhérine, la N-cadhérine ne co-localiserait pas avec l'EGF-R et n'inhiberait donc pas la capacité de réponse de la cellule à la stimulation par l'EGF (A. Jeanes et al., 2008).

D'autres cadhérines sont rencontrées principalement chez les cellules mésenchymateuses et peuvent être utilisées comme des biomarqueurs de TEM mais les données restent pour le moment rares. On notera cependant l'utilisation de la cadhérine-11 que l'on retrouve généralement dans le cerveau mais qui est associée à la TEM sur carcinosarcome de l'endomètre et sur carcinome épidermoïque de la langue (M. A. Castilla et al., 2011; M. Vered et al., 2010). Les autres cadhérines (N, P, R, OB, VE...) sont elles exprimées dans les autres tissus.

Les caténines

Elles sont étroitement liées à l'activité des cadhérines et sont considérées comme des adaptateurs pour les protéines cytoplasmiques. Le complexe E-cadhérine - β caténine est formé dans le réticulum endoplasmique puis transporté au niveau de la membrane plasmique. **La β caténine**, en plus de son rôle dans la stabilisation des jonctions adhérentes, joue un rôle dans la voie Wnt. En condition basale, son niveau cytosolique est bas, phénomène essentiellement dû à sa rapide dégradation via le complexe Axin/APC/GSK3 β dont elle fait partie. Dès la perte de fonction de l'E-cadhérine, la β -caténine peut être libérée et phosphorylée par GSK3 β permettant ainsi son association avec le complexe de dégradation et conduisant à sa prise en charge par le protéasome (A. Jeanes *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré qu'une protéine anti-apoptotique, la cFLIP-L, jouant un rôle dans la survie des HCC, empêchait la fonction d'ubiquitination du protéasome, permettant ainsi l'accumulation de protéines de courte durée de vie dont la β -caténine fait partie (T. Ishioka *et al.*, 2007). Une autre étude rapporte dans le même sens que le clivage de cFLIP-L conduit à l'activation des voies ERK et NF- κ B, conduisant ainsi à celle de la voie WNT/ β -caténine suite à la diminution de son ubiquitination (J. M. Schattenberg *et al.*, 2011). Mais la perte de l'E-cadhérine ne suffit pas à elle seule pour augmenter la stabilisation et le signal de transduction lié à la β -caténine lorsque la voie de dégradation est intacte. Cependant, dans les cellules cancéreuses, la β -caténine peut se trouver mutée empêchant toute phosphorylation par GSK3 β et donc limitant sa dégradation. Il en va de même pour l'APC qui est rarement fonctionnelle car également souvent mutée. Dans les deux cas, cela a pour conséquence l'hyper-activation de la voie WNT. En parallèle, AKT/PI3K inhibe l'action régulatrice de GSK3 β , induisant l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme puis sa translocation nucléaire. A travers sa dimérisation au complexe TCF/LEF, elle régule ainsi des gènes cibles de la TEM tels que c-Myc, les Cyclines D1 et D2, la Fibronectine, CD44, MMP7, S100a4, Id2, Axin-2, TCF-1, et L1-CAM (M. Yilmaz *et al.*, 2010). Elle est donc impliquée dans la migration cellulaire et l'invasion, processus inhérents à la TEM. Elle possède différents sites de phosphorylation lui permettant de jouer un rôle autre que celui de facteur de transcription. En effet, lorsqu'elle phosphorylée sur ses résidus tyrosine, elle participe à la dissociation des complexes cadhérine – caténine. Cette phosphorylation est induite dans de nombreux cancers via la surexpression ou l'activation constitutive de c-Src, c-Met, EGF et par l'inhibition de différentes phosphatases telles que PTEN ou encore PTP (K. Giehl *et al.*, 2008). Enfin, la voie Wnt/ β -

caténine peut s'activer via la sécrétion paracrine de la protéine Wnt par les cellules stromales, qui peut conduire lorsqu'elle est couplée à la sécrétion de cytokines, à l'amplification du signal de transduction (*K. Oguma et al., 2008*).

L'alpha-caténine (α -caténine) lie les cadhérines des jonctions adhérentes via la β -caténine aux protéines constituant les filaments d'actine du cytosquelette (F-Actine, α -Actinine) et à d'autres intermédiaires (Vinculine, ZO-1). Lorsqu'elle ne se trouve pas complexée avec la β -caténine, elle se dimérise et joue un rôle dans la régulation de l'assemblage des filaments d'actine par compétition possible avec Arp2/3. Il a été démontré qu'une isoforme de l' α -caténine (l' α N-caténine) était une cible de Snail2 (Slug) et que sa répression conduisait à l'inhibition de la migration des cellules de la crête neurale embryonnaire (*S. Jhingory et al., 2010*). Cependant, le rôle de cette caténine n'est pas clairement établi à ce jour en ce qui concerne la TEM. On sait cependant que la perte de cette caténine perturbe les jonctions adhérentes et provoque une hyperprolifération des cellules épidermiques (*Z. Lu et al., 2003*). Malgré le peu de données existantes, certains auteurs s'emploient à l'utilisation de l' α -caténine comme bio marqueur, y compris sur HCC, associant sa translocation nucléaire et sa disparition au niveau de la membrane plasmique au processus de TEM (*Y. Li et al., 2010 ; Z. Y. Yi et al., 2011*).

La P120-caténine (P120ctn) est une protéine associée aux cadhérines qui interagit avec le domaine conservé intracellulaire de l'E-cadhérine. La perte de fonction de la E-cadhérine entraîne la libération de la P120-caténine, processus permettant la suppression de l'activité de RhoA et l'activation de Rac et Cdc42, trois RhoGTPases importantes du cytosquelette, permettant ainsi la migration cellulaire (*M. Yanagisawa et al., 2008*). La régulation des RhoGTPases se fait également au niveau génique, car P120ctn régule le facteur de transcription Kaiso qui contrôle l'expression de Rac1 et Cdc42. La migration et l'invasion cellulaire dépendent en fait de l'isoforme majoritairement exprimée. Il en existe 4 mais l'isoforme 1 de la p120 caténine serait la plus exprimée dans les cellules mésenchymateuses alors que les cellules épithéliales expriment préférentiellement les isoformes 3 et 4. Elles n'ont pas la même affinité pour les RhoGTPases prenant donc la fonction tantôt de suppresseurs de tumeurs (isoformes 3 et 4), tantôt de promoteurs de tumeurs (isoforme 1) et ce grâce à la partie N-terminale différenciant les unes des autres. La P120-caténine participe également au clustering des cadhérines, à l'endocytose et à leur dégradation. Elle stabilise les complexes d'adhésion en régulant donc le turnover des cadhérines (*N. A. Gloushankova, 2008*). Elle interagit avec le système de microfilaments et régule l'acheminement de l'E-

cadhérine le long des microtubules et ce jusqu'à la membrane plasmique. Elle est le médiateur des changements de l'adhésion entre cellules via sa phosphorylation. Les facteurs de croissance HGF, EGF et PDGF induisent sa phosphorylation via Src et conduisent à la déstabilisation des complexes cadhérines/caténines, phénomène lié à la perte des jonctions adhérentes durant la TEM.

L1-CAM : molécule d'adhésion cellulaire L1

Comme les Nr-CAM, les L1-CAM (appelées également CD171) font parties de la super famille des récepteurs de type immunoglobuline (Ig) jouant un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire. Ce sont des glycoprotéines qui, il y a encore quelques années de ça, n'avaient été trouvées que dans le cerveau. Elles sont en effet connues pour être impliquées dans les troubles et les maladies neurologiques. Plus récemment, elles ont été retrouvées dans les cellules sanguines, les reins et surexprimées dans de nombreux cancers, et leur rôle dans la TEM n'est que nouvellement suspecté. La présence de L1-CAM est en effet corrélée avec la progression des tumeurs neuroendocrines (mélanomes, gliomes, schwannomes...) et avec un mauvais pronostic vital, l'invasion et le processus de métastases chez tumeurs épithéliales (cancer du colon, des reins, des ovaires et du sein). L1-CAM inhiberait par exemple la formation des cadhérines, faciliterait l'activation de la voie WNT/ β -caténine et induirait l'augmentation de la motilité des cellules cancéreuses MCF7 (*M. Shtutman et al., 2006*). De manière plus détaillée, les L1-CAM sont des molécules transmembranaires, dont la partie extracellulaire est composée de 6 domaines de type Ig et de 5 régions répétées spécifiques à la Fibronectine (domaine de type 3). Elles offrent ainsi des interactions possibles avec de nombreux ligands. Elles sont clivées sous le contrôle de la voie PI3K par des métalloprotéases (MMPs) telles qu'ADAM10, libérant alors une forme soluble de L1-CAM. Cette forme soluble joue un rôle dans la migration, la prolifération, l'angiogenèse et la résistance aux chimiothérapies chez les cellules cancéreuses, en se fixant sur les intégrines et en activant les protéines kinases de transduction en aval. Sur cellules cancéreuses rénales (RCC), la diminution de l'expression de l'ADAM10 aurait pour conséquence la diminution de la prolifération et l'induction du processus de TEM entraînant l'augmentation de la migration cellulaire (*K. Doberstein et al., 2011*). Des données contradictoires montrent qu'au niveau du cancer colorectal, l'inhibition de l'expression de L1-CAM diminue la prolifération des cellules souches colorectales ainsi que leurs capacités métastatiques sans pour autant modifier l'organisation ou l'expression des marqueurs de TEM (*N. Gavert et al., 2011*).

La polarité

Bien que l'ensemble des jonctions intercellulaires façonnent la polarité des cellules épithéliales, celle-ci est clairement dépendante de la présence des jonctions serrées (TJs pour Tight Junctions) et de leurs répartitions asymétriques au sein des cellules. Elles sont essentielles pour les fonctions biologiques de la cellule telles l'endocytose, l'exocytose et le transport des vésicules. Lors de la perte de ces TJs, les cellules nouvellement mésenchymateuses ne possèdent donc plus de polarité apicale et baso-latérale. Deux acteurs importants de cette polarité sont la Claudine (famille de 24 protéines) et l'Occludine. Dans le foie humain, l'occludine, JAM-A, ZO-1, ZO-2, les claudines-1, -2, -3, -7, -8, -12, -14, et la Tricelluline ont été détectées ensemble comme formant la structure des jonctions serrées. La polarisation des hépatocytes implique la formation de régions membranaires plasmiques distinctes séparées par des TJs entre les canicules biliaires (partie apicale) et la zone sinusoïdale (partie basolatérale). Il existe de plus un gradient croissant de Claudine-2 des hépatocytes périportaux lobulaires jusqu'au hépatocytes péricentraux de la même manière que dans le foie de rat et de souris. La Claudine-1 quand à elle est exprimée dans le lobule hépatique entier (*T. Kojima et N. Sawada, 2011*). Il a été démontré que l'Occludine formait un complexe avec le récepteur au TGF β et avec la protéine Par6. Or l'activation par le TGF β entraîne la perte des jonctions serrées, une étape initiale de la TEM (*J. P. Thiery et al., 2005*). La phosphorylation de Par6 sur la sérine 345 par le TGF β RII activé (après recrutement du complexe TGF β RI/Occludine/Par6) entraîne la ligation de Par6 avec la ligase Smurf1, conduisant à l'ubiquitination de RhoA et la dissolution des jonctions serrées. Cela fait de Par6 un effecteur central de la TEM, tout comme Par3 qui co-localise avec Par6 et aPKC, formant un complexe qui régule la formation des TJs via le contrôle de l'activité de Rac (*X. Wang et al., 2008*). Il existe deux autres groupes qui sont également déterminants dans la polarité cellulaire : ce sont les complexes Scribble–Discs large–Lethal (Scrib/Dlg/Lgl) qu'on retrouve au niveau des membranes latérales et Crumbs–Stardust–Dlt qui jouent un rôle important dans la biogenèse des membranes apicales (*A. Jeanes et al., 2008 ; I. G. Macara et al., 2004 ; Nagai-Tamai et al., 2002*). Sur hépatocytes de rat en culture primaire, une équipe a montré que le TGF- β induisait la TEM en régulant négativement l'expression de la Claudine 1, processus clairement associé à la perte de la polarité, et ce via P38, PI3K et PKC (*T. Kojima et al., 2008*).

Arrêt du cycle cellulaire

La perturbation de la régulation de la croissance cellulaire, en particulier celle touchant aux hépatocytes, est associée à un grand nombre de maladies du foie telles que la fibrose ou encore le cancer. Il y a plusieurs éléments qui s'accordent sur le rôle de certaines protéines jouant un rôle clef dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier lors de dommage à l'ADN, et ayant une influence sur l'initiation du processus de TEM. Tout d'abord, il a été mis en évidence le rôle de la protéine du rétinoblastome (Rb) qui d'ordinaire agit comme un inhibiteur de la prolifération cellulaire. Or sa déplétion via ARN-interférence induit une TEM sous l'influence de l'activation des facteurs SLUG et ZEB1 chez les cellules MCF10A (*S. Ansieau et al., 2011*). Comme pour Rb, il a été démontré que l'inactivation de P53 pouvait provoquer une TEM cependant partielle. Rb et P53 sont souvent retrouvés mutés lors de cancers. De plus, il a démontré que Rb était un inhibiteur de l'inducteur de TEM : le facteur ZEB1. Ensemble, ces données supposent que l'absence de ces deux contrôleurs majeurs du cycle cellulaire peut contribuer à la dédifférenciation, conduisant à la reprogrammation des cellules somatiques en cellules indifférenciées avec des caractéristiques de cellules souches (*Y. Liu et D. C. Dean, 2010*). Cette étape serait selon *S. Ansieau* nécessaire à l'initiation tumorale.

Durant la TEM, la croissance cellulaire ralentit. Sur cellules d'hépatocarcinome HepG2, il a été démontré que le TPA, un phorbol d'ester et ligand spécifique activateur des protéines PKCs, pouvait provoquer un arrêt du cycle cellulaire via l'activation de la voie MAPK et l'expression de p15/p16, deux inhibiteurs de la croissance cellulaire (*W. Wen-Sheng, 2006 et 2003 ; W. S. Wu et al., 2001*). De manière intéressante, le TPA provoque une TEM chez ces HepG2 à la même concentration utilisée pour les études précédentes (*C. T. Hu et al., 2008*). De manière complémentaire, des travaux ont montré que les cellules invasives d'adénocarcinomes colorectaux avaient un haut taux de β -caténine nucléaire, sur exprimaient P16^{INK4A} mais exprimaient peu le marqueur de prolifération qu'est la protéine Ki-67, normalement fortement induite au sein de la tumeur primaire, suggérant que les cellules métastatiques qui se sont dédifférenciées sont non proliférantes (*T. Brabletz et al., 2001 ; A. Jung et al., 2001*). C'est donc un point important en faveur des traitements inappropriés (ciblant la prolifération seulement) pour combattre ce type de cellules chez les patients malades et pouvant expliquer les problèmes de récidives.

De la même manière que sur HepG2, il a été démontré que SLUG surexprimé chez les cellules MDCK avait pour effet l'induction du processus de TEM et l'arrêt du cycle cellulaire en phases G1/S et G2/M, via l'augmentation de l'expression des protéines P21, P27 et Wee1 (*M. Maeyama et al., 2008*). Au total, les travaux portant sur l'implication de Snail1 sur HepG2 et Slug sur MDCK témoignent de l'implication de ces facteurs de transcription dans l'induction de la TEM et dans l'arrêt du cycle cellulaire. Un travail similaire sur hépatocytes humains et murins a montré que Snail1 inhibait l'apoptose et la croissance cellulaire induite par le TGF- β , et conduisait à l'induction du processus de TEM (*D. L. Franco et al., 2010*).

Il existe cependant à ce jour des arguments en défaveur d'un lien entre arrêt du cycle cellulaire et TEM. L'un d'entre eux consiste à penser que les voies responsables de l'arrêt du cycle n'ont pas de lien avec l'initiation du processus de TEM. Une équipe a en effet montré que le TGF- β induisait une TEM chez des hépatocytes P53^{-/-}, P21^{-/-} et Rb^{-/-}, mutations indépendantes ou combinées, de la même manière que sur hépatocytes normaux (*S. Sheahan et al., 2008*). De manière globale, la majorité des articles relatant du processus de TEM et de l'arrêt du cycle cellulaire se réfèrent au TGF- β et au facteur Snail. Ce dernier semblerait être le parfait candidat pour relier les deux phénomènes. Il est en effet reconnu depuis de nombreuses années maintenant, en dehors de son rôle régulateur de la TEM, comme pouvant bloquer la mort et le cycle cellulaire dans le foie (*I. Fabregat et al., 2007 ; S. Vega et al., 2004*).

La sénescence

Lors de la perte des contacts cellulaires, d'une dysfonction touchant aux télomères, d'un stress de type oncogénique, oxydatif ou encore génotoxique, la cellule peut répondre par différentes stratégies. Elle peut soit engager un processus apoptotique, soit induire un arrêt de croissance transitoire, ou entrer en sénescence. La sénescence n'est autre qu'un arrêt de la croissance cellulaire accompagné de nombreux changements métaboliques et d'une incapacité des cellules à proliférer malgré la présence d'agents mitogènes et de nutriments. Elle se traduit par une augmentation du volume cellulaire et par d'autres modifications morphologiques touchant au cytoplasme et au noyau. Ce processus est considéré comme un mécanisme suppresseur de tumeur qui engage les voies de transduction ATM/ATR, P14/ARF, P16^{INK4a}/Rb, et P21 (*I. Ben-Porath et R.A. Weinberg, 2004*). Cependant, il peut être associé à des événements facilitant les processus de progression tumorale conduisant à l'état métastatique. En effet,

durant la TEM, le processus de sénescence est abrogé. Ce phénomène semblerait être lié en partie à la surexpression des protéines TWIST1 et TWIST2 que l'on retrouve dans de nombreux cancers, dont les HCC (*S. Ansieau et al., 2008*). Ces facteurs de transcription participeraient à l'inhibition des voies impliquant P53, P21 et P16^{INK4a}/Rb, processus conduisant à l'initiation de la TEM. Il existe donc un lien fondé entre sénescence et métastases. De plus, alors que la sénescence prévient la croissance cellulaire et la dissémination des cellules invasives, sa répression n'est donc plus une barrière à l'acquisition de propriétés de cellules souches par les cellules cancéreuses (*G. I. Evan et F. d'Adda di Fagagna, 2009*). On sait également que la sénescence jouerait un rôle important en modulant les interactions entre les cellules du microenvironnement stromal. L'augmentation de la sénescence chez les cellules fibroblastiques localisées au sein des tumeurs auraient pour conséquence le gain de capacités pro-inflammatoires. Ces cellules dites « senescence-associated secretory phenotype » (SASP) libèrent des interleukines ciblant les cellules épithéliales voisines conduisant à la progression tumorale via l'induction du processus de TEM (*R. M. Laberge et al., 2011*).

On dénombre également ZEB1 et Id1, deux autres facteurs de transcription impliqués dans la TEM et jouant un rôle durant la sénescence cellulaire (*Y. Liu et al., 2008 ; A. Swarbrick et al., 2008*). Enfin, il existerait un lien entre polarité et induction de la sénescence. En effet, la perte des contacts cellule-cellule entraînerait l'augmentation de la protéine P27^{KIP1} inhibitrice des protéines kinases cycline-dépendantes, phénomène qui laisse à penser que polarité et sénescence sont liés (*P. K. Majumder et al., 2008*).

La survie cellulaire / résistance à l'anoïkis.

La survie cellulaire (A) est un processus important dans lequel sont impliquées un bon nombre de cellules, en particulier les cellules des tissus épithéliaux. Elle est nécessaire à leur homéostasie. Elle nécessite une double interaction entre la cellule et la MEC et cette même cellule et ses voisines. Cela se fait donc via l'engagement des intégrines d'une part, et des cadhérines de l'autre. Le contact cellule/MEC permet l'activation des voies ERK, JNK et AKT sous le contrôle de Fak, Src et ILK. Elles régulent respectivement l'activation de c-Fos, c-Jun, et de NFkB, tous trois modulateurs de l'expression de gènes anti-apoptotiques. De plus, Ras/MEK contrôle l'expression de Flip, un inhibiteur de FADD, tout comme AKT contrôle l'expression et l'activation de protéines anti et pro-apoptotiques. Enfin, l'interaction entre cellules via l'E-cadhérine et la b-caténine permet la promotion de la transduction du signal de

survie grâce à PI3K/AKT. Sur HCC, il a été démontré que la régulation des voies Ras/Raf/Mek/Erk, PI3K/Akt/mTor et TGF/SMAD impliquées dans la survie hépatocytaire étaient perturbées, pouvant ainsi causer la dérégulation du processus apoptotique (*I. Fabregat et al., 2007*).

L'anoïkis (B) : durant la TEM, les cellules épithéliales perdent leurs adhésions cellulaires. Ce qui de manière normale devrait conduire à l'apoptose puisqu'on l'a vu, la perte des interactions entre les cellules et entre les cellules et la MEC conduit à l'inactivation des voies de survie. En effet, dans le cas de signaux inappropriés à la migration provenant de la MEC, les cellules ayant perdu cette faculté d'homéostasie tissulaire suite à la dégradation de leurs jonctions rentrent en apoptose (*A. P. Gilmore 2005*). Ce phénomène est appelé Anoïkis. Il s'agit d'un processus physiologique permettant le contrôle des cellules et également le renouvellement naturel de l'épithélium intestinal, dont les cellules ont tendance avec le temps à perdre leurs facultés d'adhésions (*C. Hofmann et al., 2007*). De même que pour l'apoptose, il se caractérise par l'activation des caspases et des endonucléases, la fragmentation de l'ADN, la modulation de la balance Bcl-2/Bcl-x1 ou Bax/Bcl-x1, et l'activation de signaux intrinsèques (perméabilisation mitochondriale via Bcl-2 induisant le relargage du cytochrome C) et extrinsèques (activation du FasL, TNF-R, clivage de Fak, p130cas et Paxilline). L'E-cadhérine est formellement impliquée dans ce processus d'anoïkis probablement via la voie PI3K/Akt. La perte de cette cadhérine cause la mort des cultures primaires d'hépatocytes de rat indépendamment de l'activation des caspases (*J. L. Luebke-Wheeler et al., 2009*). Les cellules détachées sont dans un stade apoptotique avancé contrairement aux cellules du tissu, processus qui n'apparaît donc qu'après la perte de l'adhésion et qui justifie la chronologie suivante durant l'anoïkis: d'abord la perte des interactions cellules-cellules et cellules-MEC, puis l'apoptose (*F. N. Smets et al., 2002*). Dans le cas de transplantations hépatiques et lors de l'isolement d'hépatocytes frais en primo-culture, l'anoïkis est un phénomène récurrent et problématique. Ces mêmes auteurs ont suggéré que le laps de temps entre le détachement et la transplantation était suffisant pour induire des signaux pro-apoptotiques en réponse à la perte des adhésions avec la MEC, justifiant l'anoïkis dans ce cas. D'autres protéines ont une importance dans ce phénomène de mort cellulaire. Le suppresseur de tumeur p16^{INK4a}, inhibiteur de la cycline dépendante kinase Cdk4 et via cette dernière du cycle cellulaire en phase G1/S, a été démontré comme jouant un rôle clef dans l'induction de l'anoïkis via l'expression du récepteur à fibronectine, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (*T. Plath et al., 2000*). Les intégrines jouent donc un rôle important dans la régulation de l'anoïkis (*P. H. Vachon, 2011*).

La perte des adhésions cellulaires avec la MEC via les intégrines entraîne l'inhibition des signaux de survie (cf : schéma *P. Chiarugi et E. Giannoni, 2008*).

Résistance à l'anoïkis (C) : les cellules qui ont initié une TEM au sein d'une tumeur sont reconnues comme étant particulièrement résistantes aux différents traitements (chimiothérapies, radiothérapies et thérapies-ciblées). Or, de façon complémentaire, il a été avancé que plus une cellule était résistante à l'apoptose, plus son potentiel métastatique était important (*Y. H. Shi et al., 2008*). Il existe donc un lien étroit entre TEM, apoptose et métastase et ce lien, c'est la résistance à l'anoïkis. Principalement régulée par la voie PI3K/AKT, mais aussi via l'activation des voies RAS/ERK et NFκB, les cellules normales et cancéreuses qui sont entrées en phase de TEM ont été démontrées comme étant clairement résistantes à l'apoptose (anoïkis). Au cœur du processus, Akt régule l'activité de nombreux substrats clefs en amont. En phosphorylant les protéines pro-apoptotiques Bad, Bax, Bcl-10, Bim, ASK1, HtrA2, GSK3, Fox04, Fox03a et Fox01a, il inhibe leur activité et permet la survie cellulaire. De plus, via la phosphorylation du facteur CREB sur la sérine 133, il permet l'augmentation de l'expression de gènes de survie (*X. Y. Li et al., 2011*). Akt régule enfin positivement l'activité des protéines p21waf1, YAP1, PAWR et la Zyxine, toutes 4 impliquées dans des processus anti-apoptotiques. De manière intéressante, la Zyxine serait également impliquée dans la migration cellulaire durant la TEM, en jouant le rôle d'intermédiaire entre le cytosquelette d'actine et les jonctions adhérentes (*R. B. Sperry et al., 2009*) ce qui implique un lien étroit entre résistance à l'apoptose et migration cellulaire. Il existe d'autres marqueurs bien connus qui permettent de corréliser cette résistance avec un devenir métastatique. Ce sont les protéines XIAP, inhibiteurs des caspases 3/7/9 et la Survivine qui sont surexprimées lors du processus métastatique sur hépatocarcinome (*I. Fabregat et al., 2009*). Sur HCC, la résistance à l'apoptose est corrélée à l'activation de la voie NFκB conférant aux hépatocytes dits préneoplastiques une protection contre la mort cellulaire. Sur le même modèle, Bax et Bcl-2 ont été démontrées comme étant des protéines apoptotiques majeures. Il existerait de plus un mécanisme de co-transcription ou une activation mutuelle entre les deux (*X. X. Duan et al., 2005*). La résistance à l'anoïkis nécessite donc un double signal. Le premier provient de la MEC nouvellement constituée suite à la néosynthèse de constituants par les cellules en TEM. Grâce aux complexes intégrines/Fak/Src, les voies Akt et Ras/MAPK/ERK sont activées. Le second signal provient du contact cellule/cellule via la N-cadhérine nouvellement synthétisée et remplaçant l'E-cadhérine majoritaire. Il conduit de nouveau à l'activation d'Akt puis à l'augmentation de l'expression des facteurs de survie.

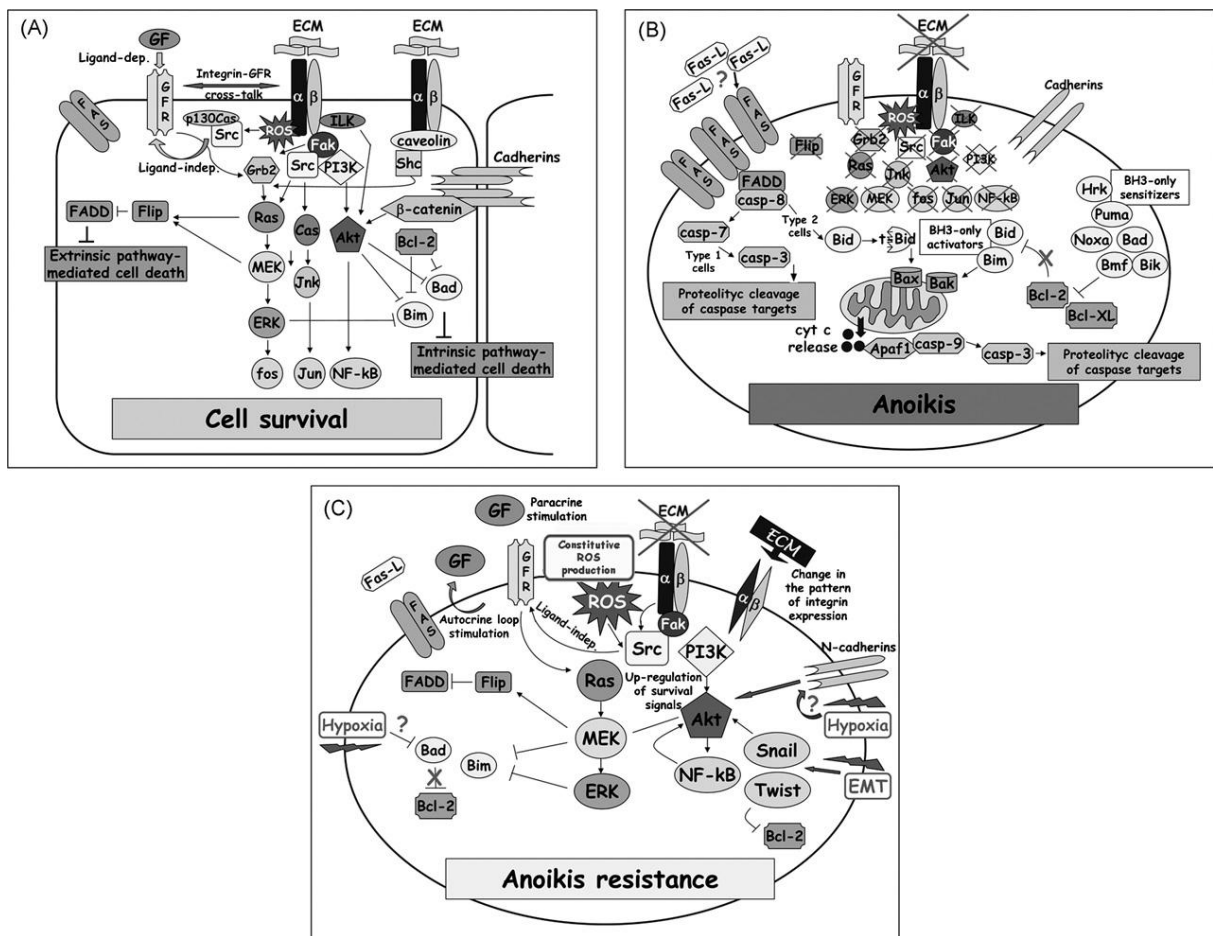


Figure 7. Voies de transduction impliquées dans les processus de survie (A), d'anoikis (B) et dans la résistance à l'anoikis (C) selon P. Chiarugi et E. Giannoni, 2008

Gain caractères mésenchymateux

Les cellules mésenchymateuses sont des cellules non polarisées capables de se déplacer individuellement grâce à l'absence de connections intercellulaires et à la sécrétion d'enzymes spécifiques pouvant dégrader la MEC. Elles sont donc peu organisées et rarement en contact avec une membrane basale. Elles ont une forme caractéristique, proche des fibroblastes. Contrairement au cytosquelette des cellules épithéliales riche en cytokératines et formant les filaments intermédiaires, celui des cellules mésenchymateuses est organisé différemment, avec une prédominance pour la Vimentine, un constituant des fibres de stress.

Production de facteurs de transcription

Il existe une multitude de facteurs de transcription connus pour leur implication dans les processus d'embryogenèse, et depuis moins d'une décennie décrits comme étant également d'importants régulateurs de la TEM. Parmi eux, on retrouve principalement les facteurs Twist1/2, Zeb1/2 et Snail1/2, mais en fonction du type cellulaire, leurs rôles respectifs sont plus ou moins déterminants quand à la modulation du phénomène. Les niveaux de régulation sont très nombreux et l'hypométhylation des gènes codant pour les facteurs de transcription fait partie de ces processus décrit comme induisant leur expression et permettant la TEM (*K. Polyak et R. A. Weinberg, 2009*). On sait aussi qu'une multitude de voies convergent vers les gènes Snails et les contrôlent (*cf. schéma 1 A. Barrallo-Gimeno et al., 2005*). Enfin, il existe également une régulation post-transcriptionnelle qui peut être gouvernée par GSK3, LIV1 et PAK1, protéines contrôlant son activation et son transport nucléaire.

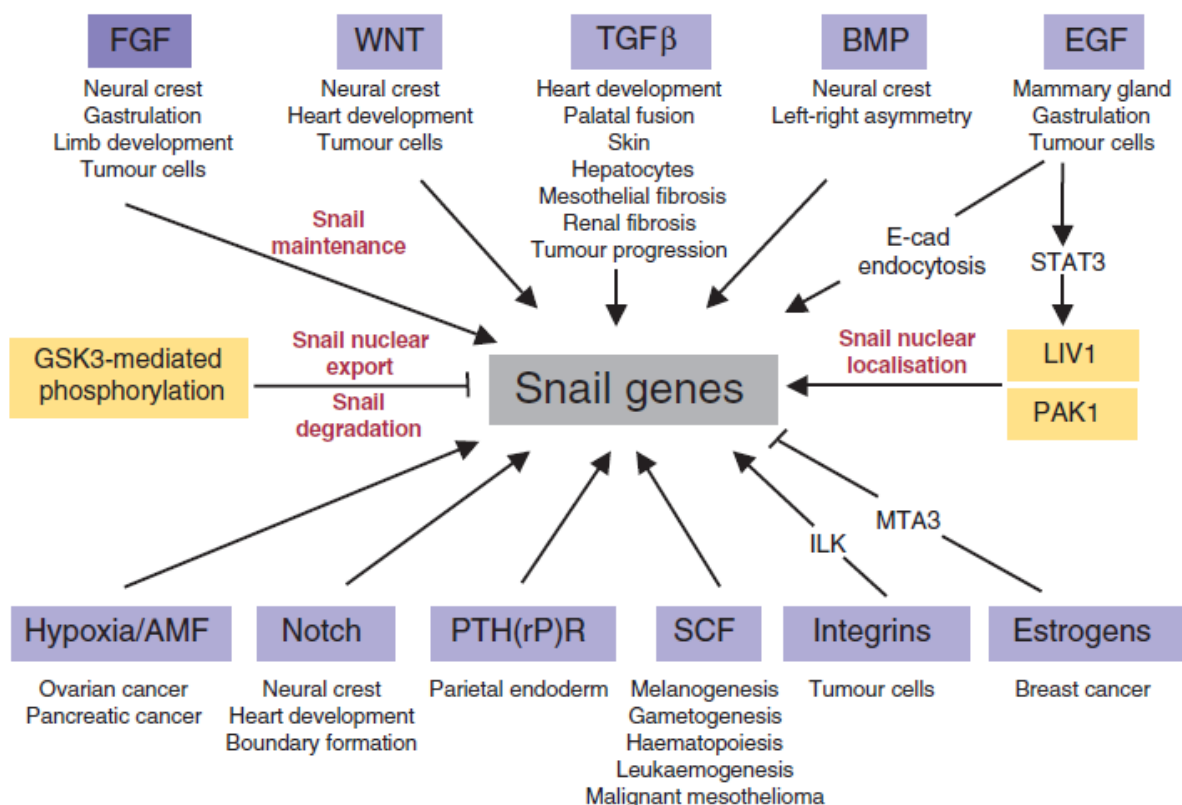


Figure 8. Régulation des gènes de la famille *SNAIL* par 1 A. Barrallo-Gimeno et al., 2005

SNAIL : Ce facteur possède une activité dite pléiotropique. Il est ainsi capable de réguler de manière post-transcriptionnelle l'expression de Claudine-1, protéine importante des jonctions serrées, mais également de réguler la répression transcriptionnelle directe de l'E-cadhérine ou encore de l'Occludine (T. Ohkubo et M. Ozawa, 2004). Il est lui-même régulé par la voie ubiquitine du protéasome et par la protéine GSK-3 β . Cette dernière est capable de phosphoryler Snail sur deux motifs consensus du facteur, conduisant à la modulation de sa localisation subcellulaire puis à sa dégradation (B. P. Zhou et al., 2004). Sur HepG2, il a été mis en évidence le rôle de Snail1 dans la répression de la E-cadhérine mais également dans l'augmentation de l'expression des MMPs et de la protéine inhibitrice des cyclines dépendantes kinase, la P21 (Chi-Tan Hu et al., 2008). Cette observation a été également décrite in vivo. En effet, il a été fait la corrélation entre l'expression de Snail1 et l'augmentation de la capacité d'invasion via l'augmentation de l'expression des MMPs sur hépatocarcinomes (A. Miyoshi et al., 2005). De manière générale, les facteurs de transcription Snail1 et Snail2 (Slug) sont connus pour réguler la TEM à différents niveaux (cf. schéma ci dessous). Par exemple Snail1 interagit directement avec CK17/18, VDR, HNF4 α , SNAIL1,

occludine, HFN1 β , claudine-1/-3/-4/-7, collagène 2 α 1, MUC1 et ZEB1. Or ces gènes sont tous impliqués dans la TEM (H. Peinado et al., 2007). De manière intéressante, il a récemment été observé l'augmentation de Snail1 dans la région centrale des tumeurs sphéroïdes multicellulaires. Ceci serait corrélé à une réponse au stress métabolique *in situ* tel que l'hypoxie ou la déplétion en glucose. Il a été suggéré que dans de tels cas l'expression de Snail1 serait conduite par l'activation de HIF-1 α et du TGF- β . L'hypoxie peut enfin également permettre la translocation de Snail1 dans le noyau grâce à l'inhibition de Gsk3- β ROS-dépendante (C. H. Kim, H. M. Jeon et al., 2011).

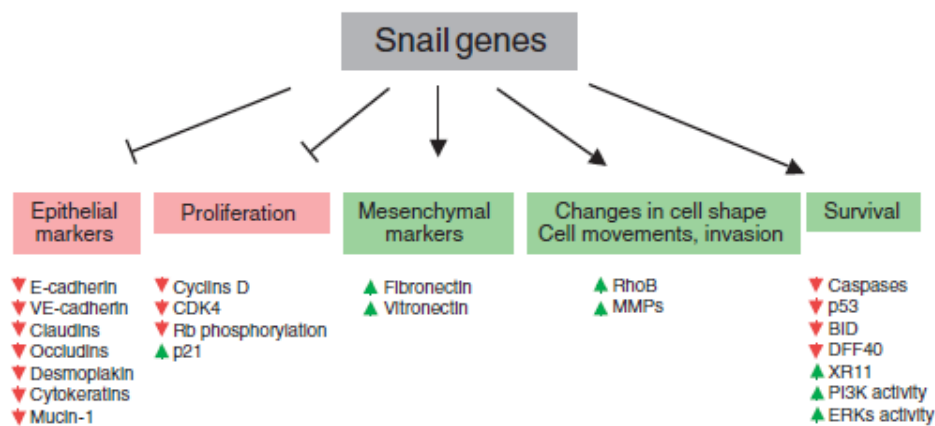


Figure 9. Schéma représentatif des différentes fonctions des gènes SNAIL, d'après A. Barrallo-Gimeno et M. Angela Nieto, 2005

SLUG (Snail2): Il est reconnu comme l'un des facteurs de transcription majeur de la répression de l'E-cadhérine. Comme pour Snail1, il est capable de se fixer sur la séquence E-pal du promoteur du gène CDH1 et ainsi de réguler sa transcription. Mais il interagit également directement avec certains gènes associés au processus de TEM tels que les séquences codant pour l'Occludine, la Claudine 1, l'Intégrine α 3, le Collagène 2 α 1, SLUG et les Cytokératines CK8 et CK19 (H. Peinado et al., 2007). Cependant, contrairement à Snail1, l'importance de Slug n'est que partiellement reconnue *in vivo* sur HCC. Seule une étude a montré son implication dans la cascade TGF β -AKT-GSK3 β -Snail1-Slug-CD147 (J. Wu et al., 2011). A ce jour, il semble que Slug joue un rôle important sur le mélanome, sur les cancers ovariens, du sein et du colon, sur carcinomes des cellules squameuses et sur adénocarcinome des poumons.

TWIST : les protéines Twist font partie des facteurs de transcription bHLH pour « basic helix-loop-helix » à la structure hautement conservée et au nombre de deux copies chez les mammifères : Twist 1 et Twist 2. Elles présentent une grande homologie de structure et jouent un rôle clef durant l'embryogenèse. Twist 1 se trouve être surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides incluant des carcinomes, des sarcomes, des gliomes, des neuroblastomes et des mélanomes (*S. Ansieau et al., 2008*). Elle est également un facteur de transcription clef durant la TEM qui régule l'expression génique de l'E-cadhérine. La surexpression de Twist est corrélée aux mécanismes de migration/invasion et plus globalement au processus métastatiques sur HCC (*T. K. Lee et al., 2006*). Cependant, il n'est peu ou pas détectable sur les cellules HepG2. Une étude a cependant montré que sur cette lignée, le fait même de transfecter Twist pour le surexprimer avait pour conséquence de diminuer à la fois les adhésions focales via la diminution de l'expression de la Vinculine, et d'augmenter l'expression des marqueurs mésenchymateux que sont la Vimentine et la N-cadhérine (*N. Matsuo et al., 2009*). On attribue également à TWIST le rôle d'inhibiteur de voies oncosuppressives. En effet, il a été démontré que l'inducteur de TEM pouvait réprimer l'activité de la voie Myc/ARF/P53, phénomène pouvant conduire à la plasticité cellulaire (*S. Ansieau et al., 2011*). Couplée à la surexpression d'ErbB2 (le récepteur au facteur de croissance épithélial EGFR), Twist induirait une TEM en conférant aux cellules des propriétés de cellules souches, dont l'expression de CD44 (*A. Puisieux, 2009*). De plus, il semblerait que l'expression de TWIST puisse être induite en réponse aux cytokines produites par les cellules du stroma et par les cellules hématopoïétiques infiltrées, élément en faveur d'une coopération entre l'ensemble des populations cellulaires au sein des tumeurs (*M. V. Blogosklonny et al., 2005*). Twist présente donc globalement une importance plus ciblée que par exemple le facteur Snail1, concernant les processus d'invasion.

ZEB1/ZEB2 (EF1/Sip1) : Ce sont des « zinc-finger E-box binding homeobox 1 », autrement dit, ils se fixent sur les mêmes séquences consensus E-box que Snail. Ils sont principalement exprimés chez les progéniteurs des cellules mésenchymateuses proliférantes et neuronales (*Y. Liu et al., 2008*). Comme pour les facteurs Snail1 et Twist, la famille des ZEBs est principalement régulée par l'activation des voies TGF- β /Smads, Ras/MAPK, NF κ B et Wnt/ β -caténine. En effet, Zeb1 et Zeb2 (Sip1) contiendraient un domaine facilitant l'interaction avec les protéines SMADs. Ce sont des répresseurs directs connus de la E-cadhérine, participant donc à la dérégulation des jonctions adhérentes durant la TEM (*N. Gavert et al., 2008*). Zeb1 est connu pour également supprimer l'expression des membres de la famille miR-200 (miR-

141, -200a,b,c et -429) permettant le maintien des propriétés des cellules souches (*S. Brabletz et al., 2011*), et pour moduler l'expression de facteurs de polarité inhibant ainsi la différenciation baso-latérale (*K. Giehl et al., 2008*). De plus, il active l'expression des collagènes, des SMA, de la Vimentine et des gènes codant pour la voie de signalisation de la vitamine D. Une mutation de Zeb1 entraîne la diminution de la prolifération, l'activation de la sénescence et le processus inverse de la TEM qu'est la TME (*Y. Liu et al., 2008*). Alors que l'intérêt de ZEB2 a été démontré sur tumeurs gastriques, pancréatiques, sur carcinome des cellules squameuses et sur le cancer ovarien, ZEB1 lui est associé à un mauvais pronostic sur carcinome utérin et à la régulation négative de la E-cadhérine sur le cancer du colon (*H. peinado et al., 2007*). Enfin, comme pour Snail1 et Twist, Zeb2 est un inhibiteur de voies oncosuppressives, bloquant en particulier la voie ATM responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN lors de dommages, favorisant ainsi la survie cellulaire (*S. Ansieau et al., 2011*). Dernièrement, Il a été montré que Zeb2 activé permettrait l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ et de la Vimentine. Cette action régulatrice est directe, indépendante de la régulation de l'expression de l'E-cadhérine, et elle conduirait à l'invasion (*E. H. Nam et al., 2012*).

S100a4 est une protéine calcium dépendante, utilisée comme marqueur clinique fibrotique et métastatique. Son augmentation est fortement corrélée avec un phénotype malin agressif mais également à de nombreuses pathologies d'origine inflammatoire. Elle possède un grand nombre de partenaires avec lesquels elle interagit par hétérodimérisation tels que des protéines du cytosquelette (NMMHC, Actine, Tropomyosine) ou d'autres protéines (S100a1, P53, Septines, CCN3, Liprine $\beta 1$, MetAP2, P37). Elle joue un rôle dans la motilité en interagissant directement avec la myosine IIA, permettant la régulation de son assemblage via son activité inhibitrice. En effet, S100a4 participe au démantèlement des filaments de myosine à l'extrémité des protusions cytoplasmiques. Cela entraîne un enrichissement local en monomères de myosine nécessaires à la néo formation des protusions durant la migration (*U. Sack et U. Stein, 2009*). S100a4 est également connu pour affecter la fonction des protéines tyrosine phosphatase transmembranaires (LAR) en se liant à la Liprine $\beta 1$, modulant ainsi l'adhésion cellulaire et conduisant à la mise en place d'un phénotype migratoire. Elle joue également un rôle dans l'invasion en régulant positivement les MMPs et négativement les TIMPs ce qui implique le remodelage de la MEC. Enfin, son troisième rôle avéré consiste en la régulation de l'apoptose via P53 qui module l'expression de gènes tels que P21^{Waf1} et

Bax (*D.M. Helfman et al., 2005 ; S. C. Garrett et al., 2006*). S100a4 peut inhiber l'activation par phosphorylation de P53 par l'intermédiaire de PKC. Mais il peut également interagir physiquement avec P53 et ainsi moduler son activité régulatrice au niveau de l'ADN (*M. Grigorian et al., 2001*). De manière intéressante, il a été démontré que des souris knockout S100a4^{-/-} développent des tumeurs spontanées non métastatiques dont des hépatocarcinomes (*C. El Naaman et al., 2004*). L'explication proposée se base sur le fait que les tumeurs des tissus S100a4^{-/-} sont P53 positives, mais que ce dernier a sa fonction altérée, suggérant que les cellules endommagées par un stress génotoxique ne sont plus éliminées par apoptose, permettant ainsi une sélection des cellules avec mutations et conduisant à la formation de cancer. Sur cellules cancéreuses, la répression de S100a4 peut cependant conduire à l'arrêt de la croissance cellulaire (*B. Grum-Schwensen et al., 2005*) voire à l'initiation du phénomène d'anoïkis (*W. Shen et al., 2011*). S100a4 peut également jouer le rôle de facteur extracellulaire paracrine participant ainsi à l'invasion et à l'angiogenèse. Elle possède une affinité pour différents récepteurs non identifiés pour la plupart, dont le récepteur RAGE. Une fois lié à ce dernier, le complexe entraîne l'activation des voies NFκB et MAPK, conduisant à la régulation de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse et la progression tumorale (*K. Boye et al., 2010*). L'expression de S100a4 peut être induite par l'activation de la voie du TGFβ lors de la TEM et par le FGF-2, et son niveau de transcription peut être contrôlé par le complexe β-caténine/TCF (*M. Schneider et al., 2008*). Enfin, son rôle en tant que marqueur précoce de la cirrhose biliaire primitive est encore débattu.

E12/E47 (TCF3): comme pour TWIST, ils font partie des protéines « basic helix-loop-helix » (bHLH). Ces facteurs sont connus pour recruter de nombreux co-répresseurs. Les complexes formés sont capables de se fixer sur la séquence consensus E-box du gène CDH1 codant pour l'E-cadhérine, et ainsi réprimer sa transcription génique.

Lgl2: Ce facteur a été classé comme un suppresseur de tumeur car sa perte entraîne le développement de tumeurs métastatiques. Son rôle premier concerne la polarité cellulaire. Il participe en effet au maintien du phénotype épithélial. Or sur de nombreux cancers (colorectal et sein) son expression semble déjà nettement diminuée. Snail1, Slug et ZEB1 régulerait l'expression de Lgl2 en réprimant directement sa transcription génique, ce qui permis de l'associer au processus de TEM (*S. Spaderna et al. 2008*).

MSX2: ce facteur de transcription est un régulateur important des voies impliquées dans le développement de différents organes durant l'embryogenèse, tels que les structures cranio-faciales, les membres, le tube neural et la glande mammaire (*M. G. Di Bari et al., 2009*). Msx2 est un membre des gènes HomeoBox, également exprimé sur différentes lignées épithéliales cancéreuses. Une corrélation existe entre son expression et la tumorigénicité chez les carcinomes mammaires (*K. Satoh et al., 2008*). Il est régulé par la voie Smad et se trouve être une cible de l'activation de la voie Ras (*S. Hamada et al., 2007*). Cependant, son rôle lors de la TEM ne fait office que de rares publications à ce jour.

Id-1: l'inhibiteur de différenciation 1 est un facteur qui une fois hétérodimérisé avec d'autres facteurs de transcription de type HLH « hélice-boucle-hélice » impliqués dans la différenciation cellulaire, peut empêcher leur liaison à l'ADN. Il a récemment été proposé comme un régulateur clé dans la progression tumorale, fournissant des indices en faveur de l'invasion tissulaire, l'angiogenèse, la survie des cellules tumorales et les métastases (*M. Jordà et al., 2007*). En effet, on retrouve une surexpression de cette protéine dans de nombreux cancers, surexpression corrélée à une forte agressivité dans le cas du cancer de la prostate et du sein. Quelques études récentes décrivent le rôle d'Id-1 dans le switch cadhérine/caténine et dans la régulation des protéines du cytosquelette (Rac, RhoA) durant le processus de TEM (*P. Y. Cheung et al., 2011*). Il serait de plus un effecteur connu du TGF- β . *PY Cheung* suggère que le niveau d'Id-1 pourrait être l'élément déterminant lors de la commutation de la fonction du TGF- β en tant que suppresseur de tumeur sur cellules normales (inhibition de la croissance) pour une fonction de promoteur tumoral sur cellules cancéreuses (améliorant la motilité cellulaire par EMT). Enfin, une déplétion d'Id1 via ARN interférence par exemple conduit les cellules cancéreuses à la sénescence, ce qui suggère un rôle d'Id1 dans le maintien de la progression tumorale (*A. Swarbrick et al., 2008*).

Smad2/Smad4/Lef-1 : les protéines Smads ont la propriété de se fixer et d'activer LEF1 en plus de l'activation traditionnelle liée à la β -caténine. Le rôle de ce complexe reste obscur car peu décrit lors de la TEM, cependant il a été montré qu'il pouvait directement interagir avec le promoteur de l'E-cadhérine et ainsi réprimer sa transcription, conduisant à la TEM sur cellules embryonnaires murines (*A. Nawshad et al., 2007*).

Goosecoïde (GSC) : il est normalement fortement exprimé chez « l'organisateur de Spemann » (une région de forte activité cellulaire) durant le développement embryonnaire où il induit la TEM. On le retrouve surexprimé dans la plupart des cancers du sein où il est associé à un phénotype métastatique (*K. A. Hartwell et al., 2006 ; J. H. Taube et al., 2010*). Il serait modulé par le TGF- β chez les cellules épithéliales mammaires (*L. E. Lindley et K. J. Briegleb, 2010*).

FOXC2 : c'est un facteur clef durant le développement embryonnaire. Il induit la TEM et participe ainsi à la différenciation et à l'avenir du mésoderme. Parallèlement, son expression est augmentée dans le cas du cancer du sein. Comme pour Goosecoïde, FOXC2 est régulé par le TGF- β et régule l'expression de gènes impliqués dans la TEM (*J. Fuxe et al., 2010*).

Œstrogène Récepteur (ER) : se sont les cancers du sein qui se trouvent être majoritairement ER⁺. MTA1, un composant régulateur de l'ER, réprime sa fonction de trans-activation et conduit à la progression tumorale, alors que MTA3, un composant du co-répresseur Mi-2/nuRd de l'ER, est induit par l'œstrogène et réprime Snail1 (*Y. Toh et G. L. Nicolson, 2009*). L'ER réprime également Slug, conduisant à l'abrogation de la TEM. Cependant, les études sont contradictoires et certaines supportent que l'activation du récepteur conduit à la TEM via la régulation positive de Snail1 et Snail2 (*H. J. Hugo et al., 2011*). L'ER α une fois activé par l'Œstradiol va d'une part interagir avec PI3K et d'autre part se dimériser et se fixer sur les éléments de réponse aux Œstrogènes (EREs), réprimant ensemble l'expression de Slug (*Y. Ye et al., 2010*).

CBF-A/KAP-1/FTS-1 complexe : ce complexe a été récemment mis en évidence par plusieurs équipes de l'école de médecine de l'université Vanderbilt à Nashville, Tennessee. Ils ont identifié deux protéines qui sont le « CARG box-binding factor-A » (CBF-A) et la « KRAB-associated protein 1 » (KAP-1) qui forment un complexe ternaire avec la séquence FTS-1 et qui conduisent à la transcription du gène FSP1 (S100a4) nécessaire à la formation des fibroblastes en pouvant induire la TEM. Cette formation s'effectue sous l'effet de différents signaux tels que l'activation des voies Wnt, TGF- β , FGF-2 et ILK. Elle peut conduire à la régulation de la transcription de gènes autres que FSP1, impliqués eux aussi dans les phénomènes de TEM tels que Snail, Twist, LEF-1 ou encore Ets-1 (*C. D. Venkov et al., 2007*).

Ets-1 : des données rapportent qu'Ets-1 jouerait un rôle dans la migration et l'invasion cellulaire. En effet, durant le développement embryonnaire, Ets-1 est exprimé dans certains tissus spécialement exposés aux mouvements cellulaires et à la dissémination. Par ailleurs, il dote les cellules de la capacité de migration à travers les membranes basales pour envahir l'espace interstitiel lors de l'angiogenèse embryonnaire et l'angiogenèse liée à la cicatrisation (*E. Théveneau et al., 2007*). Comme AP-1, NFκB et Sp-1, Ets-1 est sous le contrôle de la voie MAPK et serait impliqué dans l'expression de nombreux composants de la MEC dont les MMP-9 (*M. Jordà et al., 2005*). De manière complémentaire, d'autres données rapportent que l'activation d'Ets-1 et sa translocation nucléaire est sous le contrôle de Snail1 (*N. Dave et al., 2011*), également activé par la voie des MAPK. Ets-1 et les membres de la famille ETS ont également été liés à la progression tumorale et aux métastases. Enfin, les ETS sont également connus pour réguler les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire telles que p16 INK4a, p21WAF1/CIP1 et la cycline D1 (*E. Théveneau et al., 2007*).

La matrice extracellulaire (MEC)

Durant la TEM, la synthèse des protéines de la MEC va littéralement changer passant de protéines, constituants de la lame basale, à des protéines de type interstitiel telles que le collagène de type 1, la fibronectine, la protéine acide sécrétée et riche en cystéine SPARC, et la tenascine C (*O. De Wever et al., 2008*). Certaines protéines de la MEC sont à la fois considérées comme marqueur de la progression tumorale chez le HCC et inducteur de TEM. C'est le cas par exemple de l'Ostéopontine (OPN), un médiateur clef du comportement métastatique et un promoteur de tumeur qui lorsqu'il est inhibé par un agent thérapeutique tel que les RNA-APT empêche l'induction de la TEM, la croissance tumorale et la migration *in vivo* (*S. D. Bhattacharya et al., 2012*). L'AMPc est à ce jour suspectée d'être un inhibiteur de la MEC. Durant la fibrose induite par l'action d'agents pro-fibrotiques tels que le TGFβ ou l'Angiotensine II, il a été montré qu'Epac, un effecteur de l'AMPc, était diminué, permettant ainsi le dépôt excessif de protéines de la MEC. Cette relation indirecte du rôle de l'AMPc est de plus appuyée par le fait que l'augmentation de l'AMPc bloque le processus de TEM (*P. A. Insel et al., 2012*).

Interaction avec matrice extracellulaire

Les intégrines

Elles appartiennent à la famille des récepteurs hétérodimériques. Elles sont composées d'une sous-unité α et d'une β , reliant de manière transmembranaire les protéines de la MEC aux protéines du cytosquelette. Elles jouent donc un rôle dans la migration cellulaire et sont responsables de la transduction du signal entre les cellules et leur environnement physique (*J. W. Yam et al., 2009*). L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, dont l'expression est régulée par le TNF- α et le TGF- β , joue un rôle clef dans le processus de TEM car son augmentation ainsi que l'expression de ses ligands extracellulaires que sont la Fibronectine et la Vitronectine est corrélée à l'initiation du processus de migration cellulaire (*A. Bianchi et al., 2010*). De manière concomitante, il a été démontré que l'intégrine $\beta 5$ était nécessaire à l'induction de la TEM induite par le TGF- β sur cellules cancéreuses (*A. Bianchi et al., 2010*). L'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ a été démontrée comme nécessaire pour la phosphorylation de FAK et l'activation de la voie des MAPK lors de l'initiation de la migration chez les cellules issues d'HCC (*V. Carloni et al., 2001*). De manière globale, les intégrines forment un grand complexe au niveau de la membrane cytoplasmique avec les protéines ILK, Src, Paxilline, Vinculine, Grb7, Taline, Pyk2, Tensine, Cav1, DLC1/2, Parvine, PINCH, ILKAP et FAK, l'ensemble interagissant avec le cytosquelette d'actine et jouant un rôle dans l'adhésion, la migration, l'invasion, la prolifération, l'apoptose et la TEM à travers l'activation des voies AKT, ERK/MAPK et Rho/ROCK/MLC.

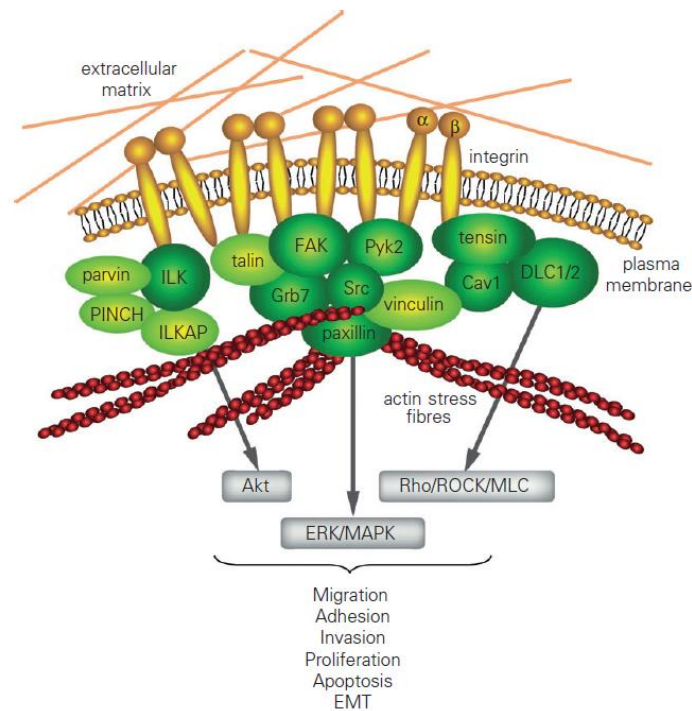


Figure 10. Organisation et fonctions du complexe des intégrines, d'après J. W. Yam et al., 2009.

ILK : kinase liée aux intégrines

Cette protéine est localisée au niveau des adhésions focales. Elle est activée après stimulation des récepteurs de type intégrine via leurs interactions avec les constituants de la MEC. Les ILK activées sont capables de phosphoryler Akt et Gsk3 β , jouant donc un rôle important dans le processus de TEM à travers cette voie. En effet, Akt interagit avec PAK1 et RhoA impliquées dans le phénomène de réorganisation du cytosquelette d'actine et de migration cellulaire. Or PAK1 et RhoA sont retrouvées augmentées dans respectivement 75 et 69% des HCC. Afin de comprendre l'importance des ILK dans les processus cancéreux, des études ont montré que l'inactivation de cette kinase induisait une diminution de la croissance cellulaire, de la migration et de l'invasion via l'inhibition de l'activation de la voie PI3K/AKT. Son implication s'accompagne dans de nombreux cancers (HCC, colon, prostate, ovaires...), d'une surexpression qui, au niveau hépatique, est souvent corrélée à un stade de cirrhose (*J. Chan et al., 2011*).

Sécrétion des enzymes protéolitiques

Les métallo-protéases (MMPs)

Elles forment un groupe de 23 protéases qui peuvent être soit sécrétées (17), soit associées à la membrane cellulaire (6). De manière collective, elles sont capables de dégrader l'ensemble des composants de la MEC et la remodeler. Elles ont pour la plupart été nommées en fonction de leur affinité pour certains constituants de la MEC qu'elles dégradent : collagénases pour les MMP-1,-8 et -13, gélatinases pour les MMP-2 et -9, stromélysines (dégradent un large spectre de constituants) pour MMP-3,-10 et -11 et matrilysines pour la MMP-7. Elles sont produites sous forme de pro-enzymes latentes et possèdent des inhibiteurs spécifiques appelés TIMPs (*E. S. Radisky et al., 2010*). Elles sont impliquées dans les processus d'embryogenèse, facilitent la prolifération, la migration, l'angiogenèse et l'apoptose et sont globalement essentielles lors du cancer métastatique (*L. S. Orlichenko et D. C. Radisky, 2008*). Les cellules mésenchymateuses sécrètent beaucoup plus de MMPs que les cellules épithéliales, ce qui leur confère le rôle de biomarqueurs de TEM (*J. Y. Chai et al., 2010*). Les MMP2 (gélatinase A) et MMP9 (gélatinase B) sont les plus couramment utilisées en tant que biomarqueurs pour la détection des cancers métastatiques, mais on dénombre également les MMP1-3-7 et 14 fréquemment augmentées lors de la TEM. Sur HCC, l'invasion a été corrélée à une augmentation des MMPs et de la Fascine-1, une protéine du cytosquelette (*K. Kessenbrock et al., 2010*). L'augmentation de l'activité des MMPs lors de la progression tumorale a été démontrée comme étant dépendante du facteur TWIST1, et ce sur HCC (*X. L. Zhao et al., 2011*). D'autres études montrent que les MMPs, en particulier la MMP-3 pourrait induire le processus de TEM via Rac1b et l'induction de ROS, permettant ainsi l'activation de Snail (*L. S. Orlichenko et D. C. Radisky, 2008*). Sur HCC, il a été montré que ce sont les MMP-2/7/9 qui dégradent majoritairement les filaments de collagène IV. Sur le même modèle, les MMP-9 ont une expression graduelle au sein des tissus hépatiques qui serait corrélée au processus d'invasion via la veine porte. Cette observation a également été corrélée au type le plus agressif d'hépatocarcinomes que sont les tumeurs indifférenciées, conférant donc à MMP-9 la place de marqueur de choix dans la progression tumorale (*D. Nart et al., 2010*).

Autres protéases de la MEC

La sérine-protéase de type urokinase du plasminogène activateur (uPA) est une seconde classe de protéases de la MEC intervenant durant la TEM. Elle convertit le plasminogène en une protéinase sérine de type trypsine appelée plasmine, qui à son tour peut dégrader différents composants de la MEC. L'uPA est régulée par PAI-1. Sa liaison au récepteur uPAR initie une cascade de dégradation et régule ainsi la migration et l'invasion (*N. Tobar et al., 2010 ; V. Villar et al., 2010*).

D'autres enzymes de la MEC se sont avérées augmenter le potentiel invasif, angiogénique et métastatique de certains cancers sans pour autant qu'un lien avec la TEM ait pu être démontré. C'est le cas de l'Héparanase lors du cancer du pancréas (*I. Vlodaysky et al., 2011*) ou du HCC (*Y. Zhang et al., 2007*).

Le cytosquelette d'actine

La dynamique du cytosquelette d'actine va clairement résulter de l'activation des **Rho GTPases**, protéines entre autre dépendantes de la matrice extracellulaire et de protéines de type GEFs, GADs et GDIs qui modulent son activité. RAC1 joue un rôle dans la formation des lamellipodes et participe ainsi au mouvement de la cellule en activant les protéines PAKs et les Myosines. CDC42 est quand à elle impliquée dans la formation des filipodes et dans le maintien de la polarité cellulaire via les protéines PAKs, WASP, N-WASP et mDia2, alors que RHOA joue un rôle dans les forces contractiles, la formation de fibrilles de stress, et est responsable de l'adhésion au substrat durant le mouvement de la cellule via ROCK1/2 et mDia1/2 (*M. Yilmaz et G. Christofori, 2010*). De manière plus détaillée, il a été clairement établi que les activations de PAK1 via CDC42 et de ROCK via RHOA contribuaient au contrôle de la motilité cellulaire (*H. Zhou et al., 2005*). Une fois Cdc42 et Rac activées, elles stimulent le complexe Arp2/3 grâce à WASP/WAVE pour induire la polymérisation de l'actine en filaments. Le couple Cdc42/Rac a également comme cible PAK qui peut phosphoryler et activer en aval la kinase LIMK inhibitrice de la protéine à la fonction dépolymérisante qu'est la Cofilin. L'activation des Rho GTPases permet donc l'augmentation de la motilité cellulaire grâce à la régulation du turnover de l'actine et grâce à leur rôle dans la formation des adhésions focales (*C. K. Sun et al., 2011*). D'autres données montrent que les cycles d'activations et d'inactivations de RhoA nécessitent le recrutement des RhoGEFs et des p190-RhoGAPs, processus dépendant de la P120-caténine. Or c'est le pool cytoplasmique

de la P120-caténine qui agit sur RhoA et qui la réprime, suite à l'initiation du processus de TEM qui a conduit son relargage de la membrane plasmique au cytoplasme durant la perte de l'E-cadhérine. Un autre pool de la P120-caténine reste néanmoins complexé aux cadhérines mésenchymateuses et permet l'augmentation de l'activité de Rac1 conduisant à la formation de lamellipodes (*M. Yilmaz et G. Christofori, 2010*).

Sur HepG2, il a été distinctement établi que l'activation du TGF β induisait l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de RHO-B. La voie SMAD est en fait impliquée dans la formation de fibrilles de stress et dans la polymérisation du cytosquelette d'actine en activant RHOA/B. Il s'en suit la cascade d'activation suivante : la protéine kinase ROCK vient activer par phosphorylation LIMK qui elle-même activera par le mécanisme identique la COFILINE responsable de l'organisation du cytosquelette (*L. Vardouli et al., 2008*).

L'expression de la **Vimentine**, une protéine de type III appartenant aux filaments intermédiaires, est induite lors de la TEM chez des cellules épithéliales exprimant normalement des kératines. Cette protéine est à l'origine induite sur les cellules mésodermes durant le développement embryonnaire et sur différents types de précurseurs dont ceux des cellules pancréatiques, neuronales, de Sertoli, des tubules rénaux, des macrophages, etc... Mais l'augmentation de son expression a été corrélée à de nombreux cancers (prostate, système nerveux, foie...). En plus de ses interactions connues avec des protéines du cytosquelette telle que la Filamine et la Plactine, du noyau tel que la Lamine B, et bien d'autres (Rab9, Desmoplakine, hsc70...), elle est à ce jour un marqueur canonique couramment employé lors d'études sur le processus de TEM. Elle est souvent associée à un phénotype invasif et à un mauvais pronostic vital prononcé en faveur des patients atteints de cancer (*A. Satelli et S. Li, 2011*). Sur HCC, la Vimentine est utilisée comme marqueur du sérum pour discriminer les petites tumeurs (*S. Sun et al., 2010*) et les stades avancés métastatiques (*L. Hu et al., 2004*). On lui connaît aussi d'autres fonctions, cependant, celle de la Vimentine excrétée est encore mal comprise. De manière intéressante, la Vimentine joue de multiples rôles dans la transduction du signal. Il a par exemple été mis en évidence son action de protection contre la déphosphorylation de la protéine ERK1/2 ce qui lui donnera un rôle supplémentaire potentiel dans le maintien du processus de TEM via la conservation de l'activation de la voie ERK (*E. Perlson et al., 2006*). De plus, il a été observé que Scrib, une protéine impliquée dans la migration cellulaire, serait protégée de la dégradation par le protéasome grâce à son interaction avec la Vimentine, suggérant que l'augmentation de la transcription de la Vimentine durant la TEM conduit à la stabilisation de Scrib, favorisant ainsi la migration cellulaire et augmentant la capacité d'invasion des cellules (*D. C. Phua et*

al., 2009). Toujours concernant la migration durant la TEM, d'autres études rapportent que la Vimentine aurait une action régulatrice sur le récepteur tyrosine kinase Axl, sur Slug et sur la voie Ras mutée lors du cancer du sein (*K. Vuoriluoto et al.*, 2011). Enfin, l'expression de la Vimentine serait entre autre régulée par NFκB, AP-1, β-caténine/TCF et TGF-β1.

La Myosine V est une protéine importante du cytosquelette. Elle participe activement à la migration des cellules mésenchymateuses en étant à l'origine de la force locomotrice cellulaire. Il existe 3 isoformes de Myosine V, tous à « double tête » (domaines moteurs) et régulés par le calcium et la Calmoduline intracellulaire. Elle est également impliquée dans le transport des vésicules et des organelles. L'isoforme Myosine Va joue un rôle dans la migration des cellules cancéreuses et dans la formation des métastases via le processus de TEM. Son expression est en effet sous le contrôle de Snail (*Lan L. et al.*, 2010).

D'autres protéines du cytosquelette voient leur expression augmenter durant la TEM telles que l'α-SMA, la γ-actine, les β-filaments et la Taline, facilitant la formation de pseudopodes et le remodelage du cytosquelette (*J.J Christiansen et al.*, 2006).

Migration

Un évènement majeur de la TEM est la migration. Plusieurs compartiments cellulaires sont impliqués à savoir les récepteurs de surface, les éléments de signalisation et le cytosquelette. L'ensemble forme le « migrosome cellulaire ». La migration est globalement un processus en trois étapes qui nécessite premièrement la perception d'un stimulus les récepteurs cellulaires (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance...). Il s'en suit la transduction de ce message par les voies intracellulaires qui dans un troisième temps va permettre l'orientation et le mouvement de la cellule dans la bonne direction (*F. Entschladen et al.*, 2011). Ce dernier point nécessite une importante activité de la machinerie cellulaire durant les phases cycliques de formations de protusions cytoplasmiques (dépendantes des protéines PAK), d'adhésions focales et de contractions. Cette dynamique dépend en amont de la contribution des récepteurs GPCR (Récepteur couplé aux protéines G) et RTK (récepteurs aux tyrosines kinases), des protéines RhoGTPases (Cdc42, Rac et Rho) contrôlant la polymérisation de l'actine/myosine et l'assemblage des filaments, et de la protéine ROCK qui régule l'orientation de la migration (cf. partie cytosquelette d'actine plus haut). Cette orientation est fonction d'un gradient chimiotactique qui provoque une certaine polarisation (direction). Rac est décrit pour contrôler la direction des cellules en mouvement, alors que HOXA4 et NOTCH3 orchestrent les voies responsables de l'induction de la motilité. Parmi elles, on notera deux axes très

importants. Le premier dépend de l'activation des récepteurs GPCR par leurs ligands spécifiques, entraînant les activations successives des voies PI3K et Src/Fak. L'activation de Fak permet la phosphorylation de PKC conduisant à l'activation des RhoGTPases en aval. A noter également que Fak est au cœur de la médiation du signal dépendant du recrutement des intégrines et l'augmentation de l'affinité de ces dernières pour les composants de la MEC. Le second axe dépend des cytokines qui vont activer la voie JAK/STAT. La phosphorylation de JAK permet l'activation des voies PI3K et MAPK, alors que celle de STAT conduit à sa multimérisation. Le complexe ainsi formé est connu pour se rendre dans le noyau et moduler l'expression de nouvelles cytokines (*J. Ratke et K. Lang, 2010*). D'autres voies semblent être impliquées telles que le TGF- β . La migration est également facilitée par l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine qui interagit avec les récepteurs au PDGF et au FGF, activant la voie MAPK. De plus, ce processus nécessite l'augmentation du recyclage des intégrines, événement facilitant le déplacement cellulaire. Enfin, on observe l'arrêt du programme de mort cellulaire. Les cellules deviennent entre autre à ce stade résistante à l'anoïkis (*M. Pinzani, 2011*).

Durant la TEM, la migration intervient donc après la perte des adhésions cellules-cellules suite à la répression de l'E-cadhérine, et après le switch des cadhérines en particulier sous le contrôle de Twist, un répresseur à l'origine de l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine. Cependant, on dénombre plusieurs types de migrations chez les cellules métastatiques. Parmi celles-ci on retiendra la migration individuelle (amiboïde ou mésenchymateuse) de la migration collective. Les différences se jouent principalement dans les activités des protéases extracellulaires, dans le type d'adhésions cellules-MEC liées aux intégrines, dans les cadhérines et leur rôle dans l'adhésion cellule-cellule, dans la polarité et les acteurs du cytosquelette impliqués dans son réarrangement. La migration collective fait par exemple intervenir les Intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. Contrairement à la migration individuelle, on n'observe pas de cycles de rétraction du « tail » mais plutôt des forces de poussées dirigées contre les cellules voisines. On a observé ce type de migration sur quelques types seulement de cancers dont le carcinome spino-cellulaire (*M. Yilmaz et G. Christofori, 2010*).

Invasion

En adoptant un phénotype mésenchymateux, les cellules cancéreuses peuvent de manière individuelle ou en groupe quitter la tumeur primaire et infiltrer les tissus sous jacents pour les coloniser. L'invasion est la première étape d'une cascade d'évènements qui conduisent au développement métastatique. Au niveau hépatique, il semblerait que la voie Hedgehog serait majoritairement impliquée dans la chimiorésistance et l'invasion (*X. Chen et al., 2011*).

Le facteur VEGF et la métallo-protéase MMP-2 seraient largement impliqués et essentiels à l'invasion sur hépatocarcinome murin (*T. Li et al., 2011*). Sur HCC, une équipe a montré que la Laminine-5, une protéine de la MEC, et son récepteur l'intégrine $\alpha 3$ étaient indispensables pour une TEM complète à condition que la voie du TGF- β soit engagée (*G. Giannelli et al., 2005*), sans quoi l'invasion serait impossible.

Intravasion / Extravasion et TME

Les cellules invasives doivent traverser les barrières endothéliales pour rejoindre la circulation sanguine et lymphatique afin de recoloniser de nouveaux tissus (extravasion) durant la progression tumorale. Cette étape où les cellules rejoignent les vaisseaux est appelée intravasion. Elle nécessite une migration chimiotactique induite par des facteurs sécrétés via les macrophages associés à la tumeur. Elle est également dépendante d'une interaction étroite avec les cellules endothéliales et d'une plasticité de la part des cellules concernées, deux points également valables pour le processus inverse qu'est l'extravasion (*A. Puisieux, 2009*). A eux deux, ces processus sont probablement les moins étudiés de la TEM. Mais depuis quelques années, les éléments en faveur de l'idée que les cellules métastatiques disséminées seraient issues de la TEM, deviennent probants. En effet, on retrouve dans la circulation sanguine mais aussi dans la moelle osseuse des cellules tumorales circulantes (CTC) au stade métastatique de la maladie. Depuis peu, on utilise les marqueurs de TEM pour qualifier l'avancement de la pathologie chez les patients. Cette expérience a été réalisée sur des patients atteints de cancer du sein (*G. Kallergi et al., 2011*). Ils ont pu montrer que les personnes atteintes du cancer à un stade métastatique avancé ont des cellules circulantes qui expriment la Vimentine et Twist de manière significativement plus importante que chez les stades métastatiques plus précoces, observation appuyant donc la thèse de la TEM pour l'intravasion. De la même manière, une autre équipe (*J. M. Hou et al., 2011*) a pu mettre en évidence, mais cette fois sur le cancer du poumon, que les CTCs prélevées dans le sang des

patients atteints exprimaient des marqueurs de TEM de manière plus significative lorsqu'ils sont agglomérés à d'autres cellules circulantes, les micro-embolies tumorales circulantes (CTMs), que lorsqu'ils sont seuls. Ces complexes sont de plus résistants à l'apoptose suggérant que la TEM au sein des cellules ne se fait pas de manière homogène et qu'il existe un phénomène d'invasion collective durant le processus métastatique. Cependant, ces clusters expriment souvent l'E-cadhérine dans le sang des patients au stade métastatique, suggérant que le transport sanguin serait facilité par des caractéristiques épithéliales après réversion par TME lors de l'intravasation. On pense également qu'il existe une coopération possible entre les cellules métastatiques mésenchymateuses trouvées dans le sang et les cellules invasives épithéliales (A. Voulgari et A. Pintzas, 2009).

Durant l'extravasation, les cellules disséminées vont interagir de la même manière que durant l'intravasation. Il existe d'une part une interaction nécessaire et indispensable avec les cellules endothéliales et d'autre part, ces cellules invasives devront faire preuve d'une plasticité cellulaire pour quitter la circulation sanguine. Elles vont s'installer alors dans l'organe ou le tissu néo colonisé, et en absence de signaux maintenant le processus de TEM provenant des cellules stromales environnantes (comme c'est le cas dans la tumeur primaire), il y a une nouvelle conversion en cellules épithéliales, processus que l'on appelle transition mésenchymale-épithéliale (TME) avec comme particularité l'augmentation de l'expression de l'E-cadhérine (K. Polyak et R. A. Weinberg, 2009).

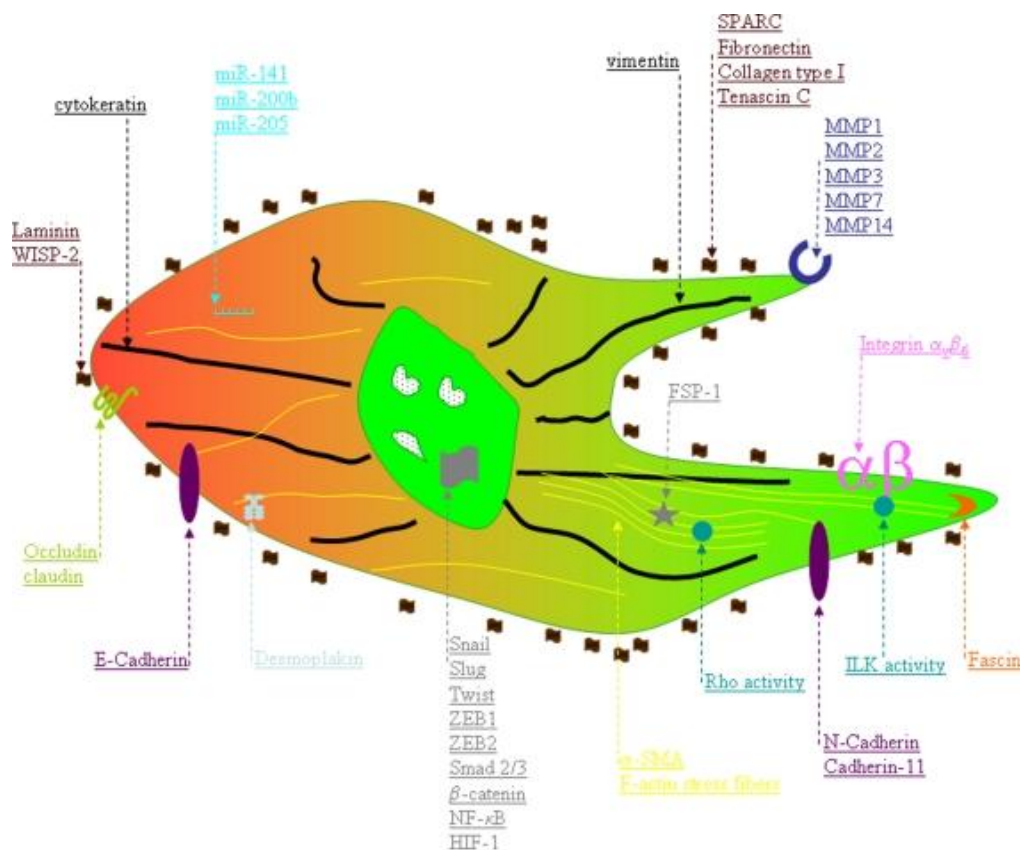


Figure 11. Représentation schématique des marqueurs de TEM. Les facteurs surexprimés impliqués dans les changements du cytosquelette et le phénotype mésenchymateux sont du côté vert, et des marqueurs réprimés normalement impliqués dans le maintien du phénotype épithélial sont du côté rouge. D'après O. De Wever et al., 2008.

Principales voies impliquées durant la TEM

Il existe deux types de signaux pouvant rendre compte d'une activation de la TEM. On distingue les stimuli extrinsèques dépendant des variations du micro-environnement, et les stimuli intrinsèques correspondant à des mutations des molécules de transduction. En effet, l'interaction des cellules tumorales ou normales avec la MEC locale peut provoquer la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de nouvelles protéines de la MEC pouvant conduire à la TEM (EGF, FGF, TGF- β). De plus, l'accumulation de mutations sur certains gènes particuliers peut maintenir le processus de TEM. Cela peut affecter certains récepteurs (TGF- β R...) et certaines protéines des voies impliquées (H-ras, PI3K...).

La voie ERK1/2 (RAS/MAPK)

La voie ERK1/2 est une importante cascade d'activation comprenant un grand nombre de kinases dont RAS, RAF, MEK, ERK, MSK et P90RSK. ERK et P90RSK contrôlent une multitude de facteurs de transcription en aval qui régule l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la différenciation. Dans de nombreux cancers, cette voie a été observée comme constitutivement active (*K. L. Dunn et al., 2005*). Environ 30% des cancers possèderaient une mutation sur l'un des gènes Ras (Ha-ras, N-ras, Ki-ras...) faisant de la voie Ras-MAPK une voie clef dans le développement et le traitement du cancer. Concernant la TEM, ERK régulerait via l'activation du facteur Ets l'expression de protéases de la MEC telles que la COLLAGENASE, l'UROKINASE et l'HEPARANASE, jouant ainsi un rôle dans le processus d'invasion. La voie ERK/MAPK est également connue pour activer les facteurs Snail1 et Slug (*M. Pinzani, 2011*). Au début de la cascade d'activation, RAS est activé par la fixation de différentes cytokines et hormones de croissance sur le récepteur à tyrosine kinase (RTK) tels que l'EGF, l'HGF, l'IGF, le FGF ou encore le TNF- α . Sur lignée HepG2, la stimulation par le HGF entraîne la phosphorylation de Met conduisant à l'activation de la voie MAPK et à l'initiation du processus de TEM. Cependant, bien que l'équipe japonaise à l'origine de cet article ait montré que Snail1 coordonnait le phénomène (*T. Nagai et al., 2011*), leurs conclusions restent à revoir concernant l'importance de ce facteur sur le phénotype et la capacité migratrice de la lignée HepG2 en réponse au HGF (voir publication 1). L'activation d'ERK1/2 et sa translocation nucléaire est concomitante avec l'expression d'« immediate early-gene » qui consiste en un rôle précoce dans la modulation génique lors de processus tels que la différenciation. La protéine P90RSK directement en aval de ERK1/2 a été démontrée comme étant un point convergeant entre la voie ERK et la voie PI3K.

La voie PI3K/AKT

Il a été observé que la voie PI3k/AKT était fréquemment activée dans les cancers épithéliaux (*L. Larue et A. Bellacosa, 2005*). Elle est impliquée dans la morphologie, la survie cellulaire, la migration et l'invasion durant la TEM. Comme pour la voie RAS/MAPK, la PI3K est activée après ligation de différents facteurs de croissance tels que le FGF, l'IGF, le HGF, l'EGF ou encore le CFC sur les récepteurs tyrosine kinase (RTKs). Elle active ensuite AKT par phosphorylation par l'intermédiaire de PDK1 et/ou mTOR, eux-mêmes régulés par PIP3

(Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). D'autre part, l'« Integrin Linked Kinase » (ILK) est capable de phosphoryler AKT mais cette activation dépend elle directement des intégrines et de leurs interactions avec les protéines de la MEC telles que la FIBRONECTINE ou le COLLAGENE (B.C. Fuchs *et al.*, 2008). Enfin, la voie PI3K/AKT est capable d'activer Snail en inhibant la kinase GSK3 β par phosphorylation sur sérine 9, phosphorylation nécessaire à la diminution de son activité (S. Frame *et al.*, 2001) et donc à l'inhibition du contrôle négatif sur l'activité de Snail1. En fait, GSK3 β se trouve être une kinase jouant un rôle central dans la TEM puisqu'elle contrôle également l'activité de la β -CATENINE (L. Larue *et A. Bellacosa*, 2005). A noter que la voie PI3K/AKT interagit avec la voie NF κ B lors de la TEM. Akt possède de nombreux substrats qu'il active ou réprime via phosphorylation, lui permettant de jouer un rôle crucial lors de la progression cancéreuse. Parmi eux on notera les oncogènes Tpl2 dont la phosphorylation sur la sérine 400 entraîne la transcription de NF κ B (L. P. Kane *et al.*, 2002), β -caténine dont la phosphorylation sur la sérine 552 entraîne la translocation nucléaire et l'activation de la voie Wnt (X. C. He *et al.*, 2007), EDG1 dont la phosphorylation sur thréonine 236 entraîne la migration cellulaire (M. J. Lee *et al.*, 2001), eNOS dont la phosphorylation sur sérine 1176 facilite l'angiogenèse et la perméabilité cellulaire, ER α dont la phosphorylation sur sérine 167 permet la prolifération, ainsi que PLCy1, PAK1 et la Girdine dont l'augmentation de l'activité via leur phosphorylation par Akt induit la migration cellulaire.

La voie TGF β

De manière générale, cette voie est décrite pour jouer un rôle central dans l'homéostasie, la morphogenèse tissulaire et la différenciation via l'induction des processus apoptotiques et la prolifération. Plus récemment, elle a été démontrée comme étant une voie clef dans l'induction de la TEM sur différents types de cultures cellulaires épithéliales et plus particulièrement dans la fibrose car elle est directement impliquée dans la production des protéines de la MEC tel que l'expression de collagène. Elle est donc en ce qui concerne les étapes tardives de la maladie une voie dite pro-tumorale, régulateur positif de la TEM et conduisant à la mobilité cellulaire, alors qu'elle est considérée comme anti-tumorale lors des stades précoces de carcinogenèse de part son effet inducteur d'apoptose (J. L. Leight *et al.*, 2012). *In vitro*, le TGF β est capable d'induire la TEM sur hépatocytes fraîchement isolés de souris (Y. L. Chen *et al.*, 2011 ; A. Kaimori *et al.*, 2007) via l'induction du facteur de

transcription Snail1 contrôlant l'expression de la E-cadhérine. Cependant, il existe une différence de taille dans l'action du TGF β sur cellules cancéreuses versus cellules normales, bien que dans les deux cas, il initie la TEM. Sur ces dernières, il est considéré comme un suppresseur de tumeur car il favorise les adhésions focales et inhibe la migration et l'invasion alors que sur les cellules cancéreuses, il est lié à la promotion de l'invasion et du processus métastatique. Un double rôle donc pour la voie du TGF β dont tous les aspects sont encore aujourd'hui mal compris. Cette voie est gouvernée par différents facteurs de la famille du TGF β possédant un récepteur à sérine-thréonine kinase spécifique appelé TGF β -R. Ce dernier active les protéines SMADs qui sont les principales initiatrices de l'activation de cette voie. Leur activation s'effectue via phosphorylation, leur conférant la capacité de translocation nucléaire. Smad4 a un rôle central en étant capable d'activer les Smads1/2/3/5/8. Sur modèle murin, le TGF β activerait RHOA, la voie Ras/MAPK, Jagged/Notch et Src/FAK (C. Cicchini *et al.*, 2008) conduisant à la TEM. Sur modèle humain, il activerait en plus de la voie SMAD et de RHOA, les voies ERK, JNK, P38, PI3K et l'intégrine β 1. Le TGF β a également un rôle clef dans la régulation du processus de TEM via son action autocrine. Elle permet en outre la sécrétion du PDGF qui est capable à son tour d'activer les voies PI3K et MAPK via Ras et Src plus en amont après ligation avec son récepteur le PDGF-R. Le TGF β contrôle de manière générale le turnover des filaments du cytosquelette (fibrilles de stress) nécessaires à la migration via son activité sur les tropomyosines, sur Cdc42, sur les RhoGTPases et sur Rac (A. V. Bakin *et al.*, 2004). Un autre rôle connu du TGF β dans la régulation de la TEM est l'activation de Par6, un inhibiteur de RhoA par l'intermédiaire de Smurf1 avec laquelle elle se lie (B. Ozdamar *et al.* 2007). Il joue ainsi un rôle clef dans la régulation de la polarité. Le TGF β interagirait avec la voie Notch via l'activation de Delta/Jagged en conséquence directe de l'activation du TGF β -R, et avec la voie Wnt. Cette dernière relation est indirecte car c'est une conséquence de son action sur l'induction de facteurs répresseurs de l'E-cadhérine que sont Slug, Snail1, SIP-1, Twist, E12/E47 et δ EF-1. Enfin, l'activation de la voie du TGF β régulerait l'expression de métallo-protéases responsables de la dégradation de la MEC, ainsi que certains gènes codant pour des protéines de la MEC telles que la Fibronectine ou encore le collagène I (A. Leask *et D. J. Abraham*, 2004). De manière complémentaire, il a été démontré que l'interaction entre le TGF β et RAS durant la TEM servait à maintenir le processus grâce à l'induction autocrine de ces cytokines et que ces dernières potentialisaient l'invasion (B.C. Willis *et al.*, 2007). De plus, une étude très récente a montré qu'un changement de la composition (rigidité) de la MEC conduisait à une réponse différente sous

l'induction du TGF β , à savoir qu'en condition rigide, on observait l'initiation du processus de TEM plutôt que l'apoptose noté en condition moins rigide (*J. L. Leight et al., 2012*). A noter enfin qu'il existe un régulateur négatif de la TEM : la BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7) s'oppose à l'action promotrice des membres de la famille du TGF β sur la TEM.

La voie NF κ B/Twist

Le facteur NF κ B est considéré comme un régulateur majeur de l'inflammation. Son activation est reliée à différents types de cancers dont le cancer du foie via l'induction de cytokines pro-inflammatoires et l'inhibition de l'apoptose (*K. Garber, 2009*). Comme pour l'inflammation, son intérêt est récent en ce qui concerne son implication dans la TEM. Présent sous sa forme inactive dans le cytoplasme et complexé aux protéines I κ B, l'activation de NF κ B permet la modulation de l'expression de certaines cytokines telles que l'IL-6, mais aussi la modulation de gènes codant pour des molécules d'adhésion et d'autres codant pour la transcription des protéines Snail, Bcl-2 et Twist (un facteur de répression de la E-cadhérine). Elle permet également le contrôle de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine. L'activation de NF κ B se fait sous le contrôle de la voie PI3K/AKT mais également sous le contrôle de l'activation du récepteur au TGF β et au TNF- α . On connaît également d'autres cibles de la voie NF κ B telles que les protéines anti-apoptotiques Bcl-xl et XIAP. L'axe NF κ B/Bcl-xl/XIAP neutraliserait l'apoptose induite par le TGF- β (*I. Fabregat et al., 2007*). Bien que cette activation soit présente chez 82% des patients atteints d'un myélome par exemple, aucun essai clinique n'a encore vu le jour quant à l'utilisation d'inhibiteurs ciblant cette voie.

La voie Wnt/ β -caténine

Elle a pour cibles les gènes de croissance et du cycle cellulaire (c-MYC, CCND1, c-jun, WISP-1, ITF-2, Gastrin et fra-1), certains gènes impliqués dans la survie (Id2, MDR1, COX2) et d'autres jouant un rôle lors de l'invasion et la dissémination (MMP7, LAMC2, VEGF). D'autres cibles ont été ainsi mises en évidence lors de l'activation de cette voie telles que BPAG1 qui est un composant des héli-desmosomes augmentés durant les phénomènes invasifs, TPR qui se trouve être un oncogène connu et surexprimé dans ce cadre ou encore FUT8 qui est augmenté sur HCC et lié à l'invasion et aux métastases (*H. S. Lee et al., 2007*).

Vu l'ensemble des processus qu'elle touche, cette voie est essentielle pour la fonction des cellules souches et durant les étapes précoces du développement embryonnaire (*M. A. Hubert et al., 2005*). Cependant, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine seule ne suffit pas à induire le processus de TEM (*K. Polyak et R. A. Weinberg, 2009*). Elle comprend un ligand, le Wnt, molécule effectrice qui une fois complexée à son récepteur le Frizzled, va activer en chaîne la protéine Dsh qui elle-même va inhiber GSK3 β , protéine qui régule négativement le complexe β -caténine/Axin/APC. L'activation de cette voie est étroitement liée lors de la TEM au devenir des jonctions adhérentes. En effet, durant ce processus, on observe d'une part la répression génique de l'E-cadhérine, et d'autre part la déstabilisation des complexes cadhérines/caténines au sein des cellules épithéliales. Cela conduit entre autre à l'augmentation du pool de β -Caténine dans le cytoplasme, phénomène que l'on retrouve dans les HCC et qui est liée à l'augmentation des récepteurs à l'EGF et à l'augmentation de la survie cellulaire (*I. Fabregat et al., 2007*). La β -Caténine étant stabilisée grâce à l'inactivation par phosphorylation de la protéine régulatrice GSK3 β , elle est activée et migre dans le noyau. Elle se complexe ainsi à d'autres facteurs de transcription tels que TCF-1/LEF-1 α (T cell factor/lymphocyte enhancer factor) et TCF-4. S'en suit la régulation de l'expression de gènes cibles de la TEM tel que le répresseur génique de la E-cadhérine, le facteur Snail1 (*Medici et al., 2008*) et d'autres oncogènes (S100a4, Myc, MMP7, CD44...). Globalement, WNT-1, IGF-II, RAS et ILK stabilisent tous le pool de β -caténine dans le cytoplasme grâce à l'intervention de GSK3 β , facilitant ainsi la TEM. Enfin, cette voie est connue pour interagir avec la voie TGF β /SMAD durant la TEM (*A. Nawshad et al., 2005*).

A ce jour, beaucoup de recherches thérapeutiques s'affèrent autour de la voie Wnt mais aucun traitement n'a réellement abouti dans le but de lutter contre ce type de cancer alors que par exemple 80% des cancers colorectaux sont induits par des mutations sur des effecteurs de la voie, le plus souvent concernant APC ce qui empêche la dégradation du complexe β -caténine/Axin/APC. Le problème résulte en la dangerosité même d'inhiber cette voie alors qu'elle participe en plus de la prolifération à la différenciation des cellules souches indispensables à la régénération des tissus de l'organisme (*K. Garber, 2009*). Cependant, de nombreuses stratégies sont à ce jour étudiées pour inhiber cette voie. Parmi celles-ci, on retiendra le blocage de l'initiation du complexe WNT/FZD/LRP-5/-6 via siRNA ou anticorps, l'inhibition de la transduction du signal en aval en inhibant Dvl, la stimulation du complexe de dégradation grâce à l'utilisation de la Calcimycine ou l'induction de la stabilisation de l'Axin, la perturbation du complexe β -caténine/TCF grâce aux anti-inflammatoires non

stéroïdiens (NSAID), ou encore l'activation naturelle d'antagonistes de Wnt tels que PLA2G2A, WIF-1 et MTI (*U. Sack et U. Stein, 2009*).

La voie EGFR

L'activation du récepteur aux facteurs de croissance épidermiques est connue comme étant associée au développement néoplasique et sa surexpression est liée à un mauvais pronostic en termes de survie (*S. Barr et al., 2008*). En effet, EGFR a un rôle autocrine promouvant la motilité, l'invasion, le développement de métastases, la survie et la prolifération cellulaire (*C. C. Yates et al., 2007*). L'activité de cette voie perturbe également les complexes cadhérines/caténines, entraînant la déstabilisation et la dégradation de l'E-cadhérine. Elle entrainerait dans un premier temps l'inhibition de la fonction de la Cavéoline, un constituant majeur des cavéoles (zones des membranes plasmiques) jouant un rôle dans l'endocytose et la transduction du signal. L'EGFR, le PDGFR, le Neu/ErbB2, Ha-ras, c-Src, eNOS et PI3K sont localisés au niveau de ces cavéoles et sont régulés négativement par la Cavéoline. Or dans les tumeurs on retrouve une diminution de cette protéine. Cela conduit ensuite à la perte de l'E-cadhérine, à l'augmentation de la transcription de la β -caténine et à l'induction du processus invasif chez les cellules cancéreuses (*Z. Lu et al., 2003*). De manière complémentaire, les cellules épithéliales sont plus sensibles aux inhibiteurs dirigés contre cette voie que les cellules mésenchymateuses issues de la TEM. Cette sensibilité est dépendante de l'implication des voies PI3K/AKT et/ou MAPK/ERK. Afin d'illustrer le lien qui existe entre la voie de l'EGFR et la TEM, plusieurs études ont montré qu'un inhibiteur de cette voie, l'erlotinib, avait des effets sur des cellules épithéliales E-cadhérine/ γ -caténine positives alors qu'il était insensible pour les cellules morphologiquement fibroblastiques positives pour la Vimentine, la Fibronectine et Zeb-1. De ce fait, les biomarqueurs de TEM sont des indicateurs potentiels de la sensibilité des cellules cancéreuses aux inhibiteurs de l'EGFR (*S. Barr et al., 2008*).

La voie Src/Fak

Cette voie est impliquée dans la survie, la prolifération et dans l'adhésion/migration cellulaire. Elle est donc fortement requise et essentielle durant la TEM. Fak est une protéine adhésive kinase de 125 kDa qui joue un rôle central en coopérant physiquement avec les récepteurs à croissance cellulaire et les intégrines au niveau de leur partie intracellulaire. Avec Src, Grb2,

P130cas, la Taline, la Paxilline et la Vinculine, elle forme un complexe protéique en lien direct avec le cytosquelette d'actine. Elle est régulée positivement par l'activation de la voie NFκB et négativement par P53. Or elle est également capable d'inactiver le suppresseur de tumeur p53 ce qui lui permet d'être en première ligne quand à la transduction du signal de survie entre la MEC et la cellule (M. J. Van Nimwegen et al., 2007). L'activation de Src et Fak peut conduire à l'activation des voies MAPKs (M. Guarino et al., 2007) mais également à l'activation de JNK et AKT.

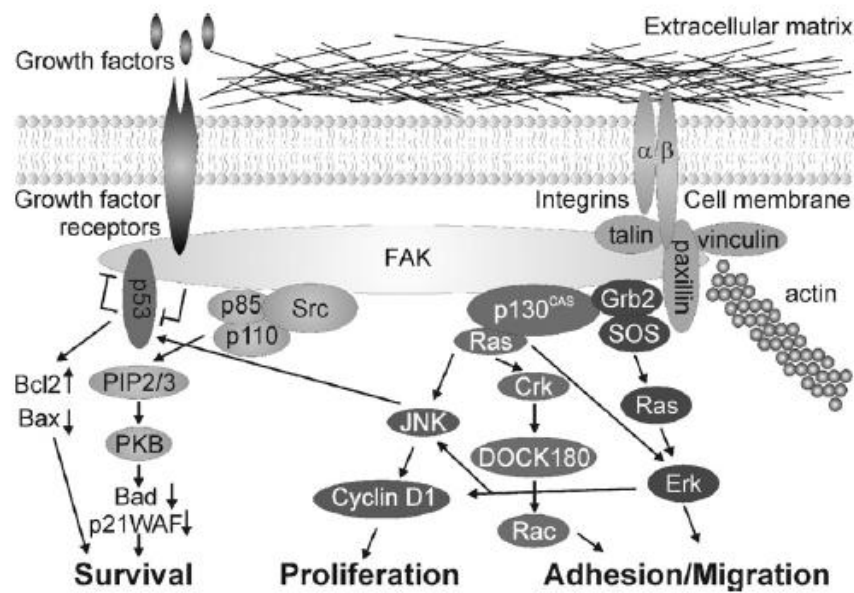


Figure 12. Représentation schématique de la voie de signalisation FAK/SRC, d'après M. J. Van Nimwegen et al., 2007

L'augmentation de la protéine FAK est corrélée avec l'augmentation de l'agressivité et de la malignité des cellules (Chatzizacharias NA et al., 2008). Autrement dit, elle jouerait un rôle non négligeable lors de la formation tumorale et durant la phase métastatique (M.J. Van Nimwegen et al., 2007). Elle régule en effet le processus de migration via le signal FAK/SRC/P130CAS-CRK/RAC, l'invasion via FAK/GRB2/MAPK/MMPs, la prolifération et la survie. Concernant ce dernier point, FAK protégerait de l'anoïkis (Cary et Guan, 1999). Elle est également capable de réguler l'expression de la Cycline D1 via son implication dans l'adhésion cellulaire. Au niveau des HCC, FAK est régulée par de nombreux signaux (cf : schéma de J.W.P. Yam et al., 2009).

Le signaling Src-Fak permet aussi l'internalisation de l'E-cadhérine, facilitant ainsi la TEM. Il consiste en l'induction d'un « switch » du type d'adhésion prédominant telle que l'adhésion

de type cadhérine en type intégrine, rendant le phénotype plus mobile (*Avizienyte et al., 2005*). SRC aurait différentes cibles en aval telles que la P120-caténine et la β -caténine, lui permettant ainsi de réguler l'adhésion cellule-cellule. Par exemple, sous l'effet de facteurs de croissance conduisant à l'activation par phosphorylation de SRC, cette dernière peut phosphoryler la P120-caténine induisant une déstabilisation du complexe E-cadhérine/Caténine. Elle peut également phosphoryler la tyrosine 654 de la β -caténine impliquant la destruction du complexe E-cadhérine/ β -caténine (*N.A. Gloushankova et al., 2008*).

Pyk2 est une tyrosine kinase (protéine non-récepteur) de la famille des kinases d'adhésion focale (FAK). Elle se trouve être surexprimée chez les HCC et est associée à un mauvais pronostic vital pour le patient. Elle joue un rôle dans la prolifération, la migration et l'invasion via l'activation des voies c-Src et ERK/MAPK. Elle phosphoryle Hic-5 et permet sa localisation au niveau des adhésions focales, facilitant ainsi le processus de TEM (*C. K. Sun et al., 2011*).

La voie Jagged/Notch

Notch joue un rôle à la fois durant le développement embryonnaire et le développement néoplasique. Dans de nombreux cancers, Notch permet en effet la croissance tumorale, sous le contrôle de Sécritases (γ , α et β) qui clivent le récepteur et permettent au brin intracellulaire (le NICD) de se complexer au facteur CSL et aux coactivateurs Maml1-2-3 afin d'œuvrer comme facteur de transcription en modulant l'expression de gènes (*K. Garber, 2007 ; U. Koch et F. Radtke, 2007*). Mais comme pour le TGF- β , elle possède une dualité qui dépend du contexte cellulaire, en agissant soit comme une voie pro-tumorale, soit comme une voie anti-tumorale (*M. A. Huber et al., 2005*). En effet, le blocage de son activation par voie thérapeutique entraîne l'arrêt de la croissance tumorale mais également, en effet secondaire, l'arrêt de la différenciation des cellules souches ce qui accroît leurs survie et leurs dangerosité pour l'organisme. Par exemple, sur kératinocytes, Notch peut être activé via P53 après dommages cellulaires conduisant à l'inhibition de la voie WNT et à l'arrêt de la différenciation (*G. P. Dotto, 2008*). Concernant plus directement le processus de TEM, Notch est une protéine transmembranaire pouvant être activée par les ligands Jagged (Jag1 et Jag2) et entraînant sa translocation nucléaire et la régulation de gènes cibles tels que Hes, Hey1 ou Snail, induisant la répression de la E-cadhérine et finalement l'initiation de la TEM. Cette

voie est également connue pour interagir avec la voie du TGF β et a récemment été démontrée comme pouvant être contrôlée par la boucle ZEB1/miR200 chez les cellules cancéreuses (*S. Brabletz et al., 2011*). Enfin, Notch contrôlerait également la voie NF κ B, processus conduisant à l'initiation de la TEM (*K. Polyak et R. A. Weinberg, 2009*).

La voie Hedgehog (Hh)

Comme pour les voies Notch et Wnt, la voie Hedgehog est une voie qui est devenue une cible thérapeutique contre la progression tumorale. Elle est à la base une voie importante chez les cellules souches et donc impliquée dans le développement. Elle a été cependant démontrée comme mutée dans de nombreux cancers, en premier lieu chez les carcinomes basocellulaires et les médulloblastomes. Puis dès 2002, elle a été démontrée comme pouvant être impliquée dans 1/3 des décès par cancer (prostate, mélanome, poumons...) grâce entre autre à son interaction avec la voie Wnt. Mais cette voie n'est pas toujours mutée. Dans de nombreux cas, des ligands de la voie Hedgehog sécrétés par les cellules tumorales viennent se fixer de manière autocrine et paracrine sur le récepteur Patched1 entraînant l'arrêt de l'inhibition d'une protéine transmembranaire appelée smoothened (Smo) qui va activer à son tour la protéine clef de la voie, Gli (*K. Garber, 2008*). C'est est une protéine qui peut directement interagir d'une part avec les récepteurs tyrosine kinase (RTKs), et d'autre part avec la voie Wnt/ β -caténine. Gli activée régule l'expression transcriptionnelle des gènes de la famille de Snail et d'autres cibles impliquées dans la croissance tumorale et la survie. Le signal Hedgehog régule entre autre l'expression de protéines du cycle cellulaire (Cycline D1 et D2), de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation (FOXA2, FOXC2, FOXE1, SOX13, RUNX2...) et de protéines importantes dans la signalisation des cellules souches (JAG2, INHBC, INHBE, SRFP1). Durant la TEM, la voie Hedgehog croise également avec la voie NOTCH, EGF/FGF et TGF- β /Activin/Nodal/BMP permettant l'expression et l'activation (directe ou indirecte) des facteurs Snail1, Sp1, Zeb1, NF κ B et Twist (*Y. Katoh et M. Katoh, 2008*). Dernièrement, sur modèle murin, il a été démontré que l'activation de la voie Hedgehog avait pour effet l'induction de la fibrose hépatique et le développement de l'hépatocarcinome. En effet, des souris KO exprimant de manière constitutive des ligands de la voie Hh accumulent des myofibroblastes et de nombreux progéniteurs hépatiques (avec des caractéristiques de cellules souches). Ces deux populations sécrètent des ligands de la voie Hh tels que le PDGF β et le TGF β , constituant la principale source de molécules pro-fibrotiques

permettant l'activation de Gli2, le maintien de la croissance des cellules hépatocytaires malignes et la sécrétion d'autres facteurs de type VEGF (*G. M. Philips et al., 2011*).

Le stress oxydant et la voie PKC

La production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'incapacité de la cellule à les métaboliser peut entraîner l'activation des voies MAPK/ERK, p38MAPK, SMADs, et des facteurs HIF-1 et AP-1, pouvant conduire à la TEM et à la propagation de la fibrose. Le TGF- β 1 pourrait être un point supplémentaire dans l'initiation de la TEM dépendamment de la production de ROS, en inhibant la g-glutamylcystéine synthase, l'enzyme limitant la synthèse de glutathion (*V. M. Felton et al., 2009*). Sur HepG2, le stress oxydant jouerait un rôle important dans l'initiation de la TEM. En effet, la voie ROS/PKC/ERK serait un pré-requis idéal pour la préparation à la TEM et à la migration. De plus, il a été démontré que l'utilisation d'antioxydants pouvait prévenir l'induction de ce processus ainsi que la migration en réponse au phorbol d'ester qu'est le TPA (*Wen-Sheng Wu et al., 2006*). D'autres études rapportent que la production d'espèces réactives de l'oxygène peut activer en plus des voies MAPK la voie PI3K/AKT permettant ainsi de réguler l'activité des facteurs Snail et pouvant induire la TEM (*S. Cannito et al., 2008,2010*). Dans ce sens, il a été proposé un modèle (*J. Inumaru et al., 2009*) qui explique que la production d'espèces réactives de l'oxygène peut entraîner l'inhibition de PTPs, entraînant l'activation de Src. Cela conduit à la phosphorylation de la P120-caténine, évènement qui conduit le complexe caténine / cadhérine à l'endocytose et donc à une perte des jonctions adhérentes. Cependant ce phénomène semble transitoire puisqu'en réponse à la production de ROS, les cellules augmentent l'expression de la MnSOD qui catalyse la transformation des espèces réactives de l'oxygène. L'utilisation dans certains cas de puissants antioxydants tels que la N-acétylcystéine suffit à empêcher la TEM (*V. M. Felton et al., 2009*).

La voie PKC possède de forts inducteurs spécifiques naturellement présents chez différentes espèces végétales telles que les Euphorbiacées et les Thyméléacées que sont les phorbols d'ester, des diterpénoïdes tétracycliques. Parmi eux, le TPA (tetradecanoyl phorbol-13-acétate) est le plus largement utilisé pour induire la prolifération, la différenciation ou l'apoptose en fonction du type cellulaire sur lequel il est employé. Il mime l'action du diacyl glycérol (DAG), un activateur de PKC, affectant l'activité enzymatique, la biosynthèse protéique, et la régulation de gènes lorsqu'elle est activée. Elle conduit également au relargage de protéases, de cytokines (Histamine, Il-2...) et à l'activation de leucocytes durant

la réponse inflammatoire. Le TPA est à ce jour considéré comme un cocarcinogène, car il n'induit pas de tumeurs mais permet la promotion tumorale, c'est-à-dire la croissance tumorale consécutive à l'exposition à un carcinogène à des doses sub-toxiques (G. Goel et al., 2007). Enfin, il possède une action importante sur les membranes cellulaires. Il entraîne le relargage de l'acide arachidonique (A.A.), un inducteur de TEM récemment mis à jour (R. Martinez-Orozco et al., 2010), conduisant à la synthèse de prostaglandines. Il mène également à l'altération du métabolisme lipidique et à l'inhibition de la fixation des facteurs EGF sur les récepteurs de surface. Ensemble, ces événements rendent compte de l'augmentation de la fluidité membranaire, des changements de la morphologie et de l'adhésion cellulaire en réponse au TPA.

Nous l'avons vu, la TEM est un processus complexe qui fait intervenir de manière contextuelle différentes voies de signalisation et différents facteurs de transcription. La voie du TGF- β est certainement la plus impliquée dans le sens où elle interagit avec les voies Wnt, Hedgehog, Notch, et Ras pour induire une TEM complète (J. Fuxe et al., 2010). La prochaine partie traite, comme le résume la figure 13, des différents types de TEM répertoriés à ce jour. Nous verrons ainsi que ce même processus peut gouverner différents événements au sein d'un même organisme, de son développement jusqu'à sa mort par cancer métastatique.

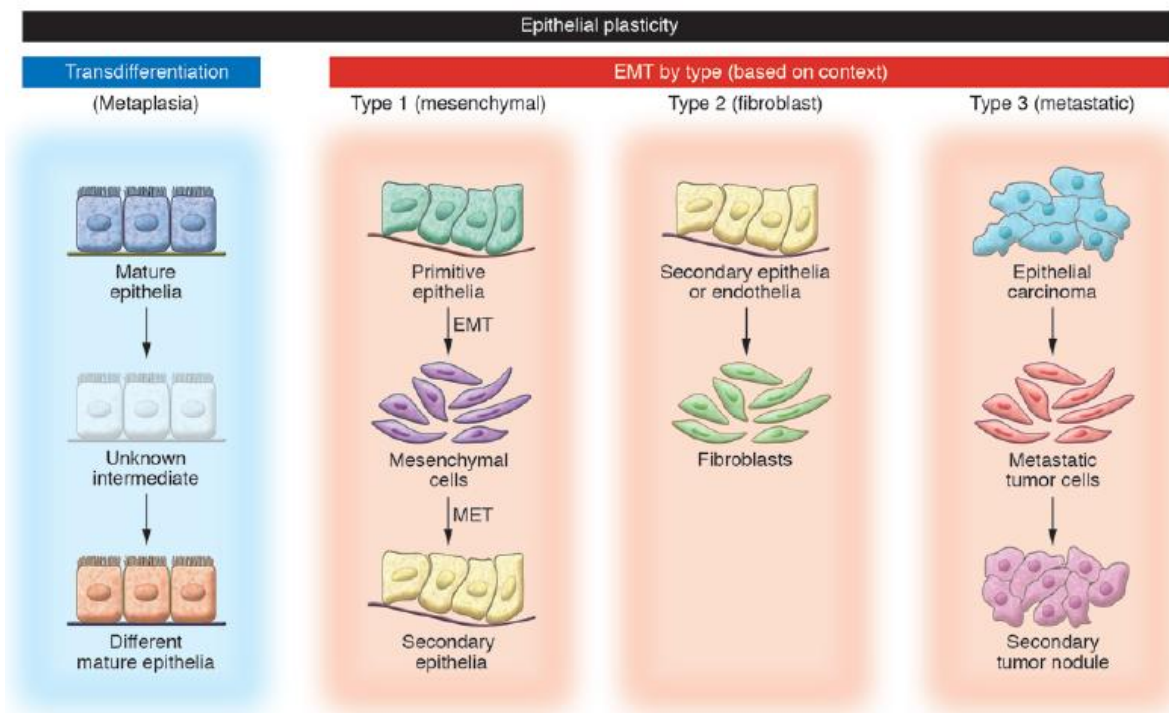


Figure 13. Les trois types de TEM d'après M. Zeisberg et E. G. Neilson, 2009

La TEM durant le développement embryologique et physiologique (type 1)

Ce type de TEM est exclusivement décrit lors de l'embryogenèse et comprend entre autre une phase TME. Il génère un mésenchyme mésodermal et endodermal, qui va à son tour et par le processus inverse (TME) engendrer un épithélium secondaire. Ainsi, au sein des organes, les cycles TEM/TME vont se répéter et permettre leur développement (*S. S. Choi et al., 2009*). La TEM de type 1 permet donc de générer les différents types de cellules adultes au sein d'un organisme. Une famille de gène est particulièrement impliquée dans le processus : c'est la famille SOX. Ce sont des facteurs de transcription qui contrôlent la migration des cellules durant la TEM.

Formation de la crête neurale

Chez les vertébrés, il existe des cellules épithéliales, les cellules de la crête neurale, localisées entre le tube neural et l'ectoderme, qui sont capables de passer par un état mésenchymateux. De manière indépendante, elles peuvent se détacher de l'épithélium neural dorsal et migrer au sein de l'embryon pour former le système nerveux périphérique, les cellules gliales et les structures cranio-faciales. Parmi les nombreux facteurs contrôlant ce processus, SOX9 a montré qu'il jouait un rôle clef dans l'initiation de la TEM en coopérant avec Snail2 et la voie PKA durant le développement de la crête neurale (*D. Sakai et al., 2006*).

Gastrulation

C'est un processus fondamental qui conduit à la formation de trois couches germinales embryonnaires, l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Elle débute par un changement phénotypique des cellules épiblastiques leur conférant la capacité de se désolidariser de la couche épithéliale. Elles vont ensuite continuer à se différencier en cellules mésenchymateuses et vont pouvoir migrer à travers la lame basale pour former le mésoderme. En l'absence de TEM, la gastrulation ne peut avoir lieu et le développement de l'embryon s'arrête au stade blastula (*J. P. Thiery et al., 2006*).

Développement

Une fois les premières structures mises en place, un nouveau cycle de TEM est initié. En particulier au sein du diverticule hépatique ou les hépatoblastes d'origine endodermique vont proliférer pour former le bourgeon hépatique. Pour cela, les hépatoblastes vont envahir le septum transversum (tissu mésodermique) par migration au travers de la membrane basale du bourgeon hépatique. Il en va de même concernant la formation du cœur. Les cellules endocardiales migrent au sein de la MEC pour former l'endocarde. A ce stade, deux feuillettes sont mis en place : le myocarde externe et l'endocarde interne formant à eux deux le tube cardiaque primitif. Un nouveau cycle de TEM va permettre aux cellules de l'endocarde de migrer pour former entre autre le septum et les valvules cardiaques (*D. Firrincieli et al., 2010*).

La TEM durant la fibrose hépatique et l'inflammation chronique du foie (type2)

La fibrose est une pathologie consécutive de la modification de l'expression en excès de protéines de la matrice extra-cellulaire et de leur accumulation. Au niveau hépatique, son rôle est encore clairement débattu mais on pense qu'elle protégerait le foie de l'apoptose en réponse aux dommages consécutifs à la prise d'alcool par exemple, conduisant à une réponse de type cicatrisation incontrôlée. Elle est généralement consécutive d'une inflammation chronique induite par un virus (hépatite B ou C) ou par un toxique (alcool majoritairement). Il existe également des cas auto-immuns observés. Elle résulte en un dysfonctionnement du tissu et de l'organe touché. La fibrose est particulièrement bien décrite au niveau du foie. Elle fait partie des maladies chroniques du foie chez l'homme (CLDs pour Chronic Liver Diseases). Lors d'une fibrose hépatique, on observe d'une part l'augmentation du pool de myofibroblastes (MFs) interstitiels issus de la prolifération et de l'activation des « hepatic stellate cells » (HSC) ainsi que les myofibroblastes issus du tissu épithélial (hépatocytes et cellules voie biliaire en TEM), et d'autre part l'augmentation des fibroblastes locaux. Ces modifications sont à ce jour histologiquement et cliniquement des évidences quant à la mise en place, au développement et à la rechute de la maladie (*M. Guarino et al., 2009*). La fibrose hépatique est néanmoins un processus réversible à condition qu'elle soit traitée. Elle reste cependant un terrain de prédisposition à la cirrhose hépatique qui est considéré comme un stade avancé de la fibrose. Or la cirrhose est la plus commune cause non néoplasique de mortalité aux USA et en Europe. Elle s'observe par un taux important de collagènes de type I

et III, par une insuffisance hépatique grave et irréversible et par une hypertension portale. Elle prédispose à son tour au développement d'hépatocarcinomes (*M. Parola et al., 2009*). A ce jour, 4 types de fibroses ont été mises en évidence (biliaire, centrolobulaire, périsinusoïdale/péricellulaire et septale).

Influence du microenvironnement stromal

Lors de cancer ou en cas de néoplasie, le microenvironnement stromal appelé stroma, a été démontré comme étant indispensable au maintien de la prolifération cellulaire et des modifications cellulaires amorcées (différenciation), et ce grâce aux nombreux échanges paracrines de facteurs pro-tumoraux entre les différentes populations cellulaires impliquées. Les cellules stromales (fibroblastes -CAFs-, cellules endothéliales, lymphocytes T, monocytes/macrophages et cellules étoilées du foie -HSCs-) peuvent représenter à elles seules 50 à 70% de la masse tumorale ce qui permet de comprendre la pluri directionnalité des communications au sein d'une tumeur (*S. Thomson et al., 2011 ; J. D. Yang et al., 2011*).

Les cellules étoilées (HSCs)

Bien que minoritaires dans le foie (1 HSC pour 20 hépatocytes), elles jouent un rôle clef une fois activées par le TGF- β sécrété par les cellules immunitaires environnantes, dans les maladies chroniques du foie, en particulier lors de la fibrogenèse. En effet, en réponse à des dommages hépatiques répétés, les HSCs vont se trans-différencier en myofibroblastes (MFs) capables de proliférer et reconnaissables grâce à leurs marqueurs spécifiques α -SMA et GFAP (protéine acide fibrillaire gliale). De plus, elles sont capables de produire des éléments de la MEC et également de sécréter des facteurs vaso-actifs et chémoattractants pour les monocytes tels que CCL-2 et -5, permettant ainsi l'augmentation de l'infiltration inflammatoire des cellules de Kupffer (*J. P. Iredale et al., 2007 ; F. Van Zijl et al., 2009*). Les HSCs vont de plus pouvoir infiltrer le stroma des tumeurs hépatiques et se retrouver dans la majeure partie des zones tumorales (capsule, septum, sinusoïdes...). Elles sont à l'origine de la sécrétion de facteurs conduisant à la prolifération, la migration et l'invasion des hépatocytes lors de HCC. Parmi ces facteurs, on dénombre le PDGF et le TGF- β . Ensemble, l'activation de ces voies conduisent à la modulation de l'expression protéique du MMP9, d'IGFBP5, des cathepsines B et D, des protéines non structurales HCV et des protéines X du virus de l'hépatite B.

Fibroblastes (ou CAF pour carcinoma associated fibroblasts)

Ce sont les cellules que l'on retrouve le plus souvent au sein du stroma des tumeurs cancéreuses. Il a été démontré sur modèle hépatique murin qu'elles pouvaient provenir des hépatocytes (Zeisberg *et al.*, 2007). Néanmoins, l'origine des cellules fibrogéniques au sein d'un foie fibrosé reste encore à ce jour controversée (K. Taura *et al.*, 2010). Ce même auteur a en effet montré que les hépatocytes *in vivo* de souris ne subissent pas de TEM, remettant en cause les travaux de M. Zeisberg, A. Kaimori et S. Dooley. Il se base sur les hypothèses suivantes : les cellules primaires d'hépatocytes en culture *in vitro* utilisée par les auteurs pourraient être contaminées par d'autres types cellulaires de type fibroblastique ; il n'existe aucune donnée concernant les cellules FSP1 positives dans le foie quant à leur capacité à synthétiser des protéines de la MEC ; les observations transitoires effectuées *in vitro* (l'augmentation de la collagène1 α 1 par exemple) ne sont pas relevantes de la TEM *in vivo*. D'autres auteurs ont cependant fait le lien entre fibrose d'origine virale (Hépatite C) et activation hépatocytaire (S. Battaglia *et al.*, 2009). Sur hépatocytes humains, le TGF- β active le processus de TEM conduisant à la transdifférenciation en myofibroblastes responsables de la fibrose hépatique et pouvant conduire à l'aggravation en hépatocarcinome.

Appelés également fibroblastes réactifs, les CAFs sont donc activés par le TGF- β et possèdent toutes les propriétés des fibroblastes ordinaires en exprimant certains marqueurs spécifiques tels que l' α -SMA, l'augmentation de la sécrétion de MMPs (2-3-9-13-14), et la sécrétion de S100a4, de PDGF pour leur prolifération et le TGF- β . Ce dernier influe sur les cellules épithéliales environnantes et permet la promotion du processus de carcinogénèse. Elles sont responsables de la synthèse, du dépôt et du remodelage du stroma grâce à l'expression excessive de protéines de la MEC (TENASCINE, COLLAGENE, FIBRONECTINE, PROTEOGLYCANES...). Enfin, elles sécrètent certains facteurs permettant de moduler les activités biologiques de l'HCC tels que le HGF, l'EGF, le FGF, la famille des Wnt et des cytokines (SDF-1 α et IL-6).

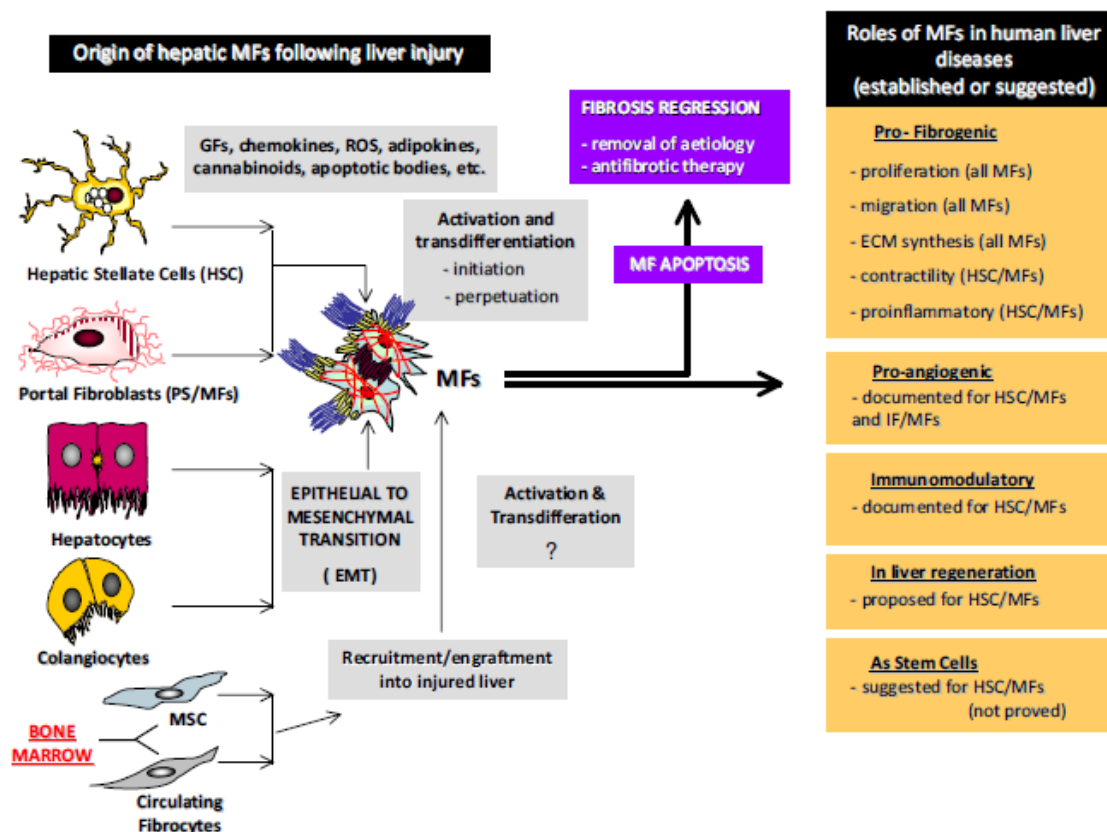


Figure 14. Origine et rôle des myofibroblastes hépatiques, d'après M. Parola et M. Pinzani, 2010

Autres cellules du stroma

On distingue les lymphocytes, les cellules de Kupffer, les monocytes et les cellules endothéliales. Les lymphocytes sont responsables de la réponse immunitaire au sein de la tumeur et peuvent être impliqués dans la progression tumorale (J. E. Talmadge, 2011). Il n'y a pas d'évidences directes quant au rôle joué par les lymphocytes T sur HCC. Cependant, des études récentes montrent que les cellules T régulatrices sont impliquées dans la modulation des hépatites B et C associées à la réponse immunitaire, conduisant ainsi à la progression du HCC (C. Miroux et al., 2010 ; Y. Takata et al., 2011). Les cellules de Kupffer sont des macrophages (Tumor Associated Macrophages -TAMs-) qui produisent entre autre l'interleukine-6, une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle dans la promotion et la progression tumorale (R. S. Aziz-Seible et al., 2011), et l'ostéopontine impliquée dans l'inflammation, et le développement du HCC en cancer métastatique (S. K. Ramaiah and S. Rittling, 2009). Les cellules endothéliales au sein des tumeurs ont une fonction particulière, en particulier en promouvant l'angiogenèse (M. Fernández et al., 2009).

Les régulateurs de la fibrogenèse

Les voies du TGF β et P38 sembleraient être impliquées dans l'augmentation de l'expression de COLLAGENE alors que les voies MAPK et AKT/MTOR seraient elles impliquées dans la prolifération cellulaire (C.J. Parsons et al., 2007). Le TGF- β sécrété est activé dans le stroma par MMP-2 ou MMP-9. JNK est nécessaire à la transduction du signal via la voie SMAD pour l'activation et la prolifération des HSCs (J. Kluwe et al., 2010). On dénombre également l'influence du PDGF, mais aussi du CTGF, de l'Endothéline 1 (ET1), de la protéine chémoattractive des monocytes (MCP1) et du TNF- α .

Le TGF- β est donc clairement un régulateur clef de la fibrogenèse. Sa surexpression est cliniquement liée à la fibrose hépatique chez des patients atteints de maladies chroniques du foie. En plus des Collagènes, il régule l'expression de la Fibronectine, de PAI-1 et de TIMPS qui sont des inhibiteurs des métalloprotéases. Parmi la famille des protéines SMADs, Smad7 a été démontré comme étant le principal inhibiteur du processus de fibrose. Sa surexpression est liée à l'inhibition du processus de TEM (S. Dooley et al., 2008).

Il existe d'autres régulateurs de la fibrogenèse que les cytokines et les facteurs de croissance. Ce sont les rétinoïdes, les prostaglandines (lipides) et les oxy-radicaux provenant du stress oxydant. De manière intéressante, les HSC contiennent beaucoup de rétinoïdes et de gouttelettes lipidiques, et sont perçues une fois activées comme étant la principale source de collagène hépatique durant la fibrose (J. P. Iredale et al., 2007).

Les marqueurs fibrotiques

La fibrose hépatique est caractérisée par l'augmentation de collagènes, principalement de type I et en moindre mesure du type III et IV, par l'augmentation de l'expression des CYCLINES D1, D2 et E, par la néo-synthèse de la protéine α -SMA, par la diminution de la vitamine A stockée, par l'activation de la voie MEC/Intégrine/Fak et enfin par une augmentation de la prolifération cellulaire. Ce type de TEM est également défini par un « switch » E-cadhérine / OB-cadhérine. On observe de plus la sous expression de la LAMININE 1 et à contrario la sur expression de la LAMININE 5. On dénombre entre autre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui est le récepteur à la fibronectine, DOR2 qui est un récepteur collagène spécifique dont l'expression est liée à une augmentation de la motilité. D'autres marqueurs fibrotiques ont été mis en évidence tels que la colocalisation de la Cytokératine-19 avec des marqueurs mésenchymateux (S100a4,

Vimentine, HSP-47, Snail et LOX) et l'accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de SMAD2 et 3 (M. Guarino et al., 2009).

La Cicatrisation

C'est un processus de réparation visant à régénérer le tissu ou l'organe touché suite à des dommages. Comme lors de la fibrose, les cellules vont se différencier via l'initiation de la TEM. Cependant, durant ce processus, on observe une perte transitoire de la polarité épithéliale sans l'acquisition complète des caractéristiques mésenchymateuses (P. Leroy et K. E. Mostov, 2007). C'est ce qu'il se passe lors d'une lésion de l'épiderme cutané. On observe tout d'abord une inflammation localisée et la formation de caillots. Les cellules lésées vont libérer des facteurs de croissance qui vont stimuler les cellules épidermiques basales telles que les kératinocytes bordant la plaie et ainsi conduire à une ré-épithélialisation (P. Savagner et V. Arnoux, 2009). Ces dernières vont entrer en TEM partielle qui se traduit par une perte temporelle de l'E-cadhérine, une perturbation des desmosomes sous le contrôle de Slug, la modulation de l'expression des cytokératines et un changement dans l'expression des récepteurs de la MEC. Ces cellules nouvellement mésenchymateuses vont être capables de proliférer et de migrer jusqu'à la zone centrale de la plaie où elles participeront à la ré-épithélialisation avec la sécrétion de composants de la matrice dermique (P. Savagner et al., 2005 ; A. Wells et al., 2008). A noter que la cicatrisation nécessite également la migration de fibroblastes.

La TEM durant le cancer du foie (type3)

La TEM de type 3 concerne les cellules cancéreuses. Elle est une étape essentielle pour le gain de caractères migratoires et invasifs nécessaires pour leur devenir métastatique. Elle comprend comme le type1 une phase MET nécessaire à son installation et à son développement après dissémination intra-hépatique des cellules et/ou intravasation dans un tissu périphérique (formation métastatique distale). C'est donc un processus réversible et dynamique. Il est le résultat de changements géniques et épigéniques au sein du site de la tumeur primaire, conduisant à un processus invasif. Sur HCC, l'EMT est liée à la capacité des cellules hépatique tumorales à envahir la capsule ou la veine portale.

Changements génétiques et épigénétiques

Durant l'EMT touchant les cellules cancéreuses hépatiques, on observe l'augmentation de l'expression des répresseurs de la E-cadhérine que sont TWIST et SNAIL, avec une perte de l'adhésion cadhérine/caténine et la translocation de la β -caténine au niveau nucléaire (*B. Zhai et al., 2008*). Cela est fortement corrélé, chez les patients étudiés, à un pronostic défavorable concernant l'évolution du cancer. De plus, les cellules cancéreuses ayant subi une TEM de type 3 sur expriment la LAMININE 5 qui est associée aux hépatocarcinomes invasifs (*M. Zeisberg et al., 2009*). Cela se fait via la coopération du TGF- β (*G. Gianneli et al., 2005*). De manière complémentaire, il a été récemment mis en évidence une coopération étroite entre le TGF- β et la voie MAPK, jouant un rôle crucial dans la survie des hépatocytes et le maintien de la TEM lors de la progression tumorale. En effet, Le TGF- β sécrété par les HSC au sein des tumeurs hépatiques aurait pour effet d'entraîner la transdifférenciation des fibroblastes pour augmenter le pool de MFs. Ces derniers sécrètent en plus des cytokines et chimiokines nécessaires à la stimulation des cellules immunitaires (cf. TEM de type 2), du TGF- β et du PDGF de manière paracrine, permettant aux HSC voisines d'entrer en TEM. Les HSC initiant la TEM vont à leur tour sécréter du PDGF de manière autocrine afin de maintenir ce processus (*F. Van Zijl et al., 2009*).

L'expression constitutive de la voie MAPK ou du récepteur au PDGF est en soi considérée comme une modification génétique contribuant au maintien du processus de prolifération ou de progression tumorale. Les modulations épigénétiques interviennent elles à d'autres niveaux. On retiendra la méthylation de l'ADN, la modification des histones ou encore l'intervention des séquences d'ARN non codantes (miRNAs), 3 phénomènes décrits comme interférant sur le processus de TEM.

Famille microARNs (miRNAs)

Les microARNs sont de petits bruns endogènes non codants de 19 à 25 nucléotides découverts depuis peu et pouvant moduler la TEM via leur activité post-transcriptionnelle. En effet, ils se fixent sur la région 3'UTR des ARN messagers pour les réprimer et engendrer ainsi leur dégradation. Ayant récemment été associés au phénomène de résistance aux traitements par chimiothérapie, ils sont devenus de ce fait une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. Mais les mécanismes rendant compte de la résistance des cellules tumorales en TEM sont encore mal compris. Des études suggèrent que ce sont leurs caractéristiques

proches des cellules souches qui leur permettent d'être résistantes (Z. Wang *et al.*, 2010). Par exemple, sur hépatocarcinome, il a été mis en évidence les effets positifs de la Doxorubicine et du Méthotrexate, deux médicaments anti-tumoraux, sur la viabilité des cellules souches cancéreuses hépatiques Hoechst⁺ (N. Zhang *et al.*, 2010). Ainsi la relation entre cellules souches, TEM et miRNA repose donc sur ce type d'études récentes confrontant les miRNA impliqués dans la TEM à la résistance des cellules souches aux chimiothérapies. Les miRNAs peuvent être impliqués en agissant comme des pro-oncogènes. Mais certains ont la capacité d'être des répresseurs de tumeurs comme mir-15a et mir-16-1. Ils se sont donc avérés comme d'encourageants marqueurs, en particulier lors du diagnostic des cancers métastatiques. Mir-141, mir-200a, mir-200b, mir200c, mir-205 et mir-429, régulés négativement par le TGF- β , contrôlent l'expression de ZEB1 et ZEB2 (P. A. Gregory *et al.*, 2008 ; O. De Wever *et al.*, 2008). Mir-10b est lui activé directement par Twist1 et participe à la migration et à l'invasion en inhibant HOXD10, un répresseur connu de RhoC et donc de la migration cellulaire (Y. Katoh *et M. Katoh*, 2008). Mir-30 inhibe sur modèle murin l'action du TGF β et la TEM induite via son action répressive touchant à Snail1 (J. Zhang *et al.*, 2012). La liste est non exhaustive et on compte chaque mois de nouvelles études intégrant les miRNA et leur rôle durant la TEM. Dernièrement, une étude a mis en évidence le rôle de P53 dans la régulation de la famille des miR-200 et miR-192 lors du processus de TEM sur HCC (T. Kim *et al.*, 2011). De manière intéressante, ces mêmes miR-200 sont capables de se lier directement à la β -caténine et ainsi inhiber le signal de la voie Wnt/ β -caténine (P. S. Mongroo *et A. K. Rustgi*, 2010). Enfin, miR-335 s'est révélé crucial dans la modulation de l'expression des gènes COL1A, α -SMA et TENASCIN C connus pour participer au processus de TEM. En effet, il a été démontré, sur cancer du sein et en ce qui nous concerne plus précisément durant la fibrose hépatique, comme étant réprimé, permettant ainsi la migration et l'activation des HSCs (C. Chen *et al.*, 2011).

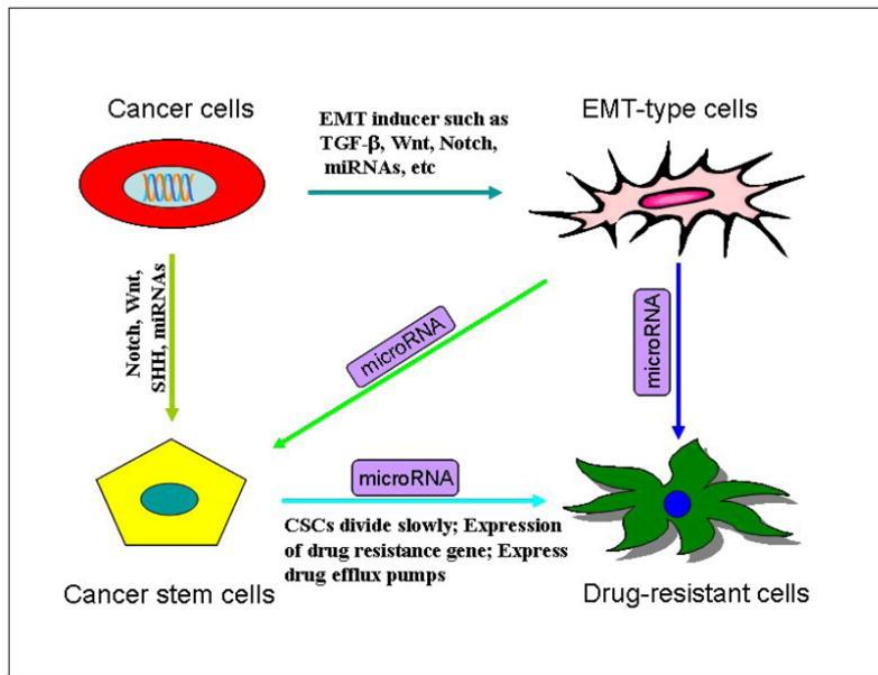


Figure 15. La connexion entre TEM, cellules souches cancéreuses et miRNA, d'après Z. Wang et al., 2010.

La réponse hypoxique : HIF-1 et l'angiogénèse

L'hypoxie est considérée comme un facteur aggravant permettant la promotion tumorale puisqu'elle conduit à la promotion des phénomènes de prolifération, de survie, d'invasion et d'angiogénèse. De plus, elle est corrélée à un mauvais pronostic vital chez les patients atteints de tumeurs car elle est révélatrice d'un état avancé métastatique. Concernant le foie, c'est un organe très vascularisé qui dépend donc à l'origine du processus d'angiogénèse pour sa régénération. Or ce processus étant également incontournable durant la croissance tumorale, l'invasion et la formation de métastases, la balance angiogénique se trouve perturbée au sein des HCC. Les cellules tumorales sécrètent en effet un excès de facteurs angiogéniques (VEGFs, PDGFs, TGF α/β , bFGF, EGF, HGF, IL-4/8, Angiopoïétines) qui vont activer et recruter les cellules endothéliales et les péricytes conduisant à la néo vascularisation. Au centre de ce processus se trouve le facteur HIF, gouverné principalement par trois voies (RAS, PI3K et STATs) et responsable de la modulation de l'expression des facteurs angiogéniques dont la sécrétion est à la fois autocrine et paracrine (S. Whittaker et al., 2010). Le facteur HIF-1 est en fait composé de deux sous-unités, HIF-1 α régulé par l'oxygène, et HIF-1 β constitutivement exprimé. Elles sont capables de s'homodimériser ou de

s'hétérodimériser lorsqu'elles sont activées. HIF-1 α est de manière continue hydroxylée ce qui lui permet d'être une cible pour un complexe de dégradation. Durant l'hypoxie, il y a inhibition de l'hydroxylation ce qui permet la stabilisation de HIF-1 α et son activation. L'augmentation de l'expression et de l'activité de la famille des HIFs a été corrélée à de nombreux cancers métastatiques. Il a été montré sur souris que l'injection dans la veine porte hépatique de pshHIF-1 (ARN interférence) diminuait l'expression de HIF-1 α dans la tumeur du foie et chez les cellules saines périphériques. Au bout de quelques jours, la tumeur avait réduit et l'expression de MMP-9 avait diminué (*Y. Takahashi et al., 2008*). De manière plus détaillée, le lien entre l'induction de l'hypoxie et la progression tumorale en cancer métastatique serait la TEM. En effet, l'activation de HIF entrainerait dans de nombreux cancers l'activation de voies conduisant à ce processus telles que le TGF- β , NF κ B ou encore NOTCH (*J. Jiang et al., 2011*). Sur hépatocarcinomes, HIF joue un rôle clef à travers l'activation de la voie PI3P/AKT/HIF-1 α dans la surexpression de TWIST, VEGF et MMP2, conduisant à la TEM, l'angiogenèse, l'invasion et globalement à l'aggravation du cancer du foie (*J. Fu et al., 2011*). Il a été clairement établi que la surexpression de TWIST induite par l'hypoxie jouait un rôle en faveur de la dissémination tardives des cellules tumorales (*M. H. Yang et K. J. Wu, 2008*). Sur cellules HepG2, une récente étude a montré que l'hypoxie chronique induite avait pour effet l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le phénotype agressif typique des cellules métastatiques. Parmi ces gènes, on retiendra ITGA5, LOX, MMP1/7, SNAIL, TWIST, TIMP, VEGF, HIF1 α , LOXL2 et la VIMENTINE qui sont augmentés alors qu'en parallèle le CDH1, ZO-1, KRT7 et l'OCCLUDINE sont eux diminués. De plus, cette même expérience a montré que l'hypoxie sur HCC impliquait principalement la voie du TGF β , mais également les complexes PPAR/RXR et PXR/RXR avec une diminution des enzymes du métabolisme que sont les CYP450 et les GST (*H. Van Malenstein et al., 2012*).

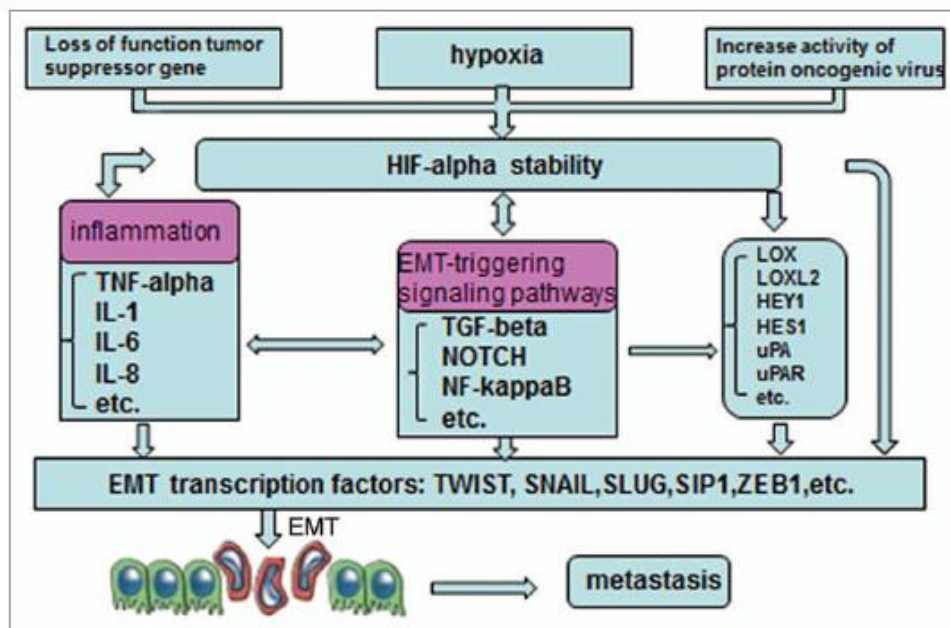


Figure 16. L'augmentation de l'activité de HIF favorise le développement de métastases via l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, d'après J. Jiang et al., 2011.

Métastases

Après invasion des tissus périphériques de la tumeur primaire par les cellules métastatiques, ces dernières amorcent le processus inverse qui les a conduites à la migration. La transition mésenchymo-épithéliale serait une étape obligatoire pour la prolifération et le développement de macro métastases (tumeurs secondaires). Les cellules invasives qui ont colonisé de nouveaux tissus périphériques expriment à nouveau les marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine, l' α et la β -caténine. Des travaux *in vitro* sur lignées issues de HCC ont montré que le blocage de l'intégrine- $\alpha 3$ avait pour effet de reverser le processus de TEM en MET et que d'autres intégrines telles que l' $\alpha 6\beta 4$ ou l' $\alpha 5\beta 1$ jouaient un rôle dans la prolifération et l'invasion des cellules du HCC (C. Bergamini et al., 2007 ; E. Fransvea et al., 2009).

De manière générale, les facteurs moléculaires impliqués lors de l'invasion des hépatocarcinomes et du processus métastatique plus globalement sont les molécules d'adhésion (E-cadhérine, Caténine, CD44, Laminine-5...), les protéases responsables de la dégradation de la MEC et les facteurs régulateurs de l'angiogénèse (VEGF...). Ils sont reconnus comme de bons prédicteurs pour la récurrence des métastases lors des résultats cliniques (L. X. Qin et al., 2004). Cet auteur a également noté qu'il était important de prendre en compte en tant que marqueurs métastatiques les régulateurs du cycle cellulaire que sont les

cyclines A, D et E. Ils sont en effets cliniquement corrélés avec le phénomène de récurrence tumorale sur hépatocarcinomes (*R. Ohashi et al., 2001*). Sur HCC, Twist et S100a4 sont également utilisés comme marqueurs cliniques métastatiques (*M. Sabbah et al., 2008*). De manière générale, il ressort que les facteurs de transcription de la TEM sont de bons marqueurs pour la récurrence tumorale, les métastases et la survie des patients atteints de carcinomes communs (colon, pancréas, prostate, foie, cœur...).

Il a été mis en évidence d'autres mécanismes conduisant les cellules de HCC à la TEM. On incrimine certains virus d'être à l'origine de la progression tumorale dans le foie. C'est le cas des protéines du virus de l'hépatite C qui en conjonction avec l'activation des voies SMAD (TGF- β /SMAD3) et STAT5 induisent la TEM et l'invasion des cellules du HCC (*S. Battaglia et al., 2009*). La tétraspanine (inducteur de TEM), Sox4 et la diminution de l'expression de miR-122 ont été tous les 3 également associés au phénomène de métastase intra-hépatique.

Expression des marqueurs de cellules souches.

Au sein des tumeurs résident une petite population composée de cellules souches cancéreuses ou TISCs pour « tumor initiating stem-like cells ». Elles expriment principalement les marqueurs Nanog (régulé par Snail1), Oct-4, CD44 et EpCam. Elles possèdent des mécanismes de survie particuliers ainsi que la capacité de se renouveler et de produire diverses populations cellulaires différenciées qui peuvent participer au maintien et à la progression de la masse tumorale. Elles sont entre autre capables de fournir des cellules malignes car invasives, responsable de l'évolution en métastases (*H. Dang et al., 2011*). Ces cellules sont accusées d'être à l'origine de la résistance aux diverses chimiothérapies dans un grand nombre de cancers recensés (*Z. Wang et al., 2010*). En effet, après un traitement chimiothérapeutique, leur nombre augmente fortement (cellules CD44⁺/CD24⁻) et ces dernières sont moins sensibles aux inhibiteurs classiques ciblant l'EGFR car elles sont moins dépendantes de cette voie en partie grâce à l'activation constitutive de la voie AKT (*K. Polyak et R. A. Weinberg, 2009*). Sur cellules humaines issues d'hépatoblastomes, le Cetuximab s'est avéré inefficace sur les cellules souches cancéreuses hépatiques (*Fuchs et al., 2008*), de même que l'Erlotinib sur les cellules mésenchymateuses issues du processus de TEM (*R. L. Yauch et al., 2005*). Il existerait donc deux pools distincts de cellules aux caractères embryonnaires. Depuis peu, certaines équipes ont remarqué que la dédifférenciation qui s'appliquait lors de la TEM était accompagnée de l'expression de marqueurs de cellules souches au sein des cellules nouvellement mésenchymateuses. Il a été démontré par exemple que les hépatocytes de rat

foëtaux exprimaient après traitement par la cytokine TGF- β , le Thy-1, un marqueur de surface caractéristique des cellules souches hématopoïétiques, mais également c-Met qui est le récepteur au facteur de croissance hépatocytaire (HGF) également utilisé comme contrôle sur cellules souches du foie, et un faible niveau de c-Kit dont la modulation (augmentation ou diminution) est décrite et corrélée avec les cellules progénitrices du foie (*G. Del Castillo et al., 2008*). D'autres marqueurs comme la Vimentine et l' α -SMA sont utilisés pour les cellules souches et sont communs également aux myofibroblastes ce qui laisse supposer un lien étroit entre TEM et cellules souches. Sur des cellules matures, cette même observation a été faite concernant l'apparition de marqueurs de cellules souches durant la TEM (*L. Caja et al., 2011*). L'utilisation du TGF- β sur cellules de HCC (Hep3B) et sur cellules hépatocytaires humaines normales (HCH) induit la perte de marqueurs des hépatocytes matures (Albumine et AFP), la modulation de marqueurs de TEM (diminution de la E-cadhérine et augmentation de SNAIL et de la Vimentine) ainsi que l'augmentation de marqueurs de cellules souches (Thy, c-Kit, EpCAM). Cela peut se traduire par le fait même que la TEM est un processus qui peut enrichir la population hépatocytaire normale ou néoplasique par des cellules aux propriétés des cellules souches. Cela peut avoir un intérêt en termes de régénération concernant la transplantation hépatique. Par contre cela pourrait avoir de fâcheuses conséquences quant à leur participation dans la progression des tumeurs hépatiques. En effet, des études ont montré qu'au sein de tumeurs, il existait des cellules souches appelées cellules souches cancéreuses (CSCs) qui bien que minoritaires, étaient capables de se diviser et de se répandre dans l'organe pour former de nouvelles tumeurs (*T. Reya et al., 2001*). Les mécanismes de dissémination des cellules souches et des cellules mésenchymateuses issues de la TEM semblent être identiques. Il existerait donc une possible association de ces deux populations distinctes lors de la progression tumorale ou lors de maladies hépatiques (*T. G. Bird et al., 2008 ; S. A. Mani et al., 2008*).

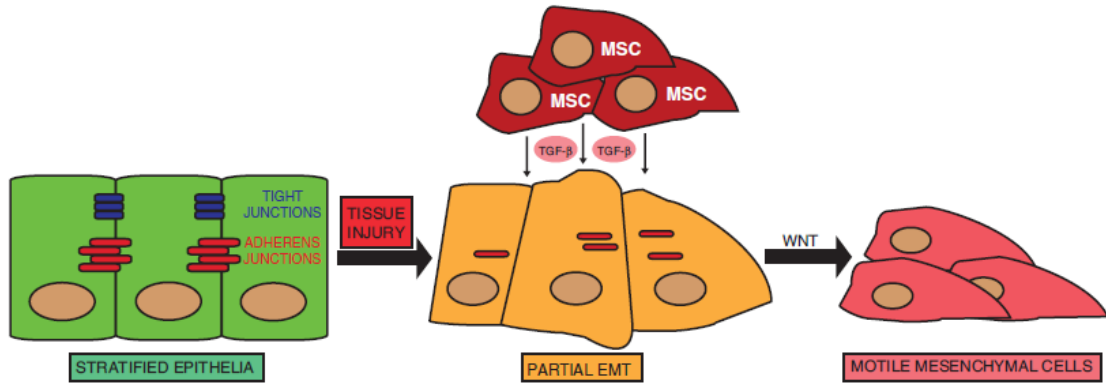


Figure 17. Représentation schématique de la TEM dans le cadre de conditions physiopathologiques, d’après A. Singh et J. Settleman, 2010.

Cette hétérogénéité cellulaire au sein des tumeurs est histologiquement bien connue aujourd’hui. Elle expliquerait les phénomènes de résistances aux thérapies. De plus, des tissus endommagés sont capables de recruter des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) qui libèrent des facteurs de croissance tels que le TGF- β permettant aux cellules épithéliales d’entrer partiellement en TEM (A. Singh et J. Settleman, 2010). Ces MSCs expriment à leur surface les marqueurs ABCG2, CD133, EpCAM et ALDH1 et sont capables de régénérer une tumeur d’origine hétérogène.

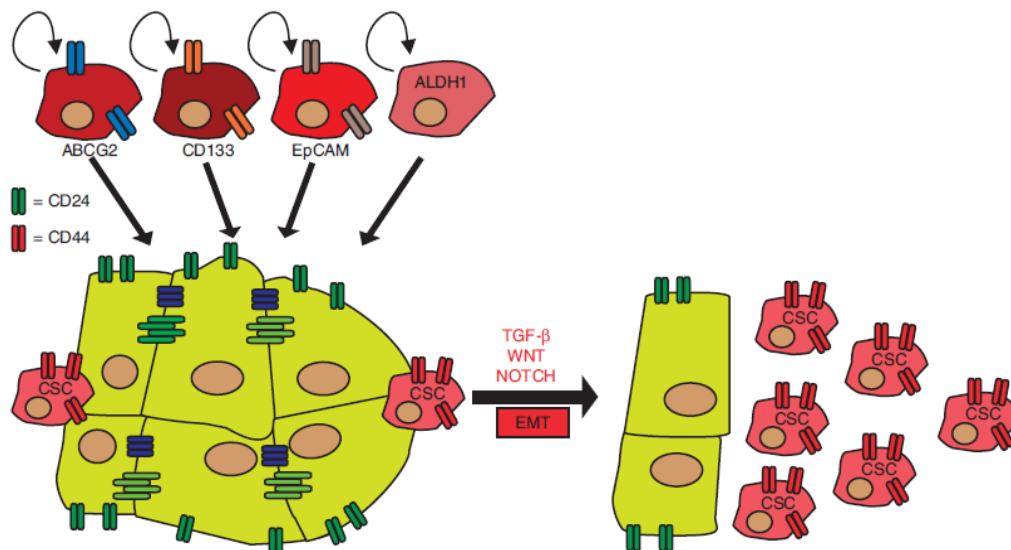


Figure 18. Les cellules souches cancéreuses d’après A. Singh et J. Settleman, 2010.

tableau 3 (modifié) - Marqueurs de TEM Selon M. Zeisberg et E. G. Neilson, 2009

| Marqueurs acquis | | Marqueurs atténués | |
|----------------------------------|----------|---------------------------|----------|
| Nom | Type TEM | Nom | Type TEM |
| Protéines de surface | | | |
| N-cadhérine | 1,2 | E-cadhérine | 1,2,3 |
| OB-cadhérine | 3 | ZO-1 | 1,2,3 |
| intégrine $\alpha 5 \beta 1$ | 1,3 | Desmoplakine | 1,3 |
| intégrine $\alpha V \beta 6$ | 1,3 | Claudine-1 | 1,3 |
| Syndécan-1 | 1,3 | Occludine | |
| ILK | 3 | | |
| Cytosquelette | | | |
| FSP1 | 1,2,3 | Cytokératine | 1,2,3 |
| α -SMA | 2,3 | | |
| Vimentine | 1,2 | | |
| Tenascine C | 2 | | |
| SPARC | 3 | | |
| Cycle cellulaire | | | |
| Cyclines A,D,E | 3 | | |
| Protéines MEC | | | |
| collagène $\alpha 1$ (I) | 1,3 | collagène $\alpha 1$ (IV) | 1,2,3 |
| collagène $\alpha 1$ (III) | 1,3 | Laminine 1 | 1,2,3 |
| Fibronectine | 1,2 | | |
| Laminine 5 | 1,2 | | |
| MMPs | 1,3 | | |
| Facteurs de transcription | | | |
| Snail1 | 1,2,3 | | |
| Slug | 1,2,3 | | |
| ZEB1/2 | 1,2,3 | | |
| CBF-A/KAP-1 | 2,3 | | |
| Twist | 1,2,3 | | |
| LEF-1 | 1,2,3 | | |
| Ets-1 | 1,2,3 | | |
| FOXC2 | 1,2 | | |
| Goosecoïde | 1,2 | | |
| SOXs | 1 | | |
| HIF-1 α | 3 | | |
| Smad 2/3 | 2 | | |
| NF-kB | 3 | | |
| β -caténine | 1,2,3 | | |
| Micro ARNs | | | |
| miR10b | 2,3 | famille miR-200 | 2,3 |
| miR-21 | 2,3 | miR-15a | 3 |
| | | miR-16-1 | 3 |
| | | miR-141 | 3 |
| | | miR-205 | 3 |
| | | miR-335 | 2 |
| | | miR-429 | 3 |

PUBLICATIONS

Introduction : HCC et pesticides

Les pesticides sont des composés chimiques très hétérogènes, par nature toxiques, et généralement trouvés en combinaison dans les formulations commerciales. En dehors de leur utilisation courante, on a rapporté des effets génotoxiques, œstrogènes ou encore immunotoxiques avérés chez l'homme. Cette toxicité dépend de plusieurs paramètres dont le principal est la dose, mais les modalités d'exposition, le degré d'absorption, la nature des effets induits par le produit actif et ses métabolites, la capacité d'accumulation et de persistance dans l'organisme, et l'état de santé du sujet sont d'autant d'autres critères à prendre en compte. Ce sont globalement des herbicides, des fongicides, des insecticides, des nématocides, des acaricides, des rodenticides, des molluscides et des algicides qui peuvent à l'intérieur même de leur formulation comprendre également des impuretés toxiques telles que du chloroforme ou des dérivés de la dioxine qui les rendent d'autant plus actifs. On dénombre plus de 1500 composés de ce type dans le monde. En France, il existe environ 900 composés actifs présents dans 8800 préparations commercialisées. A ce titre, nous sommes le troisième producteur mondial de produits phytosanitaires derrière les USA. Entre les années 1945, date approximative de leur apparition en masse, et 1985, la production doublait tous les 10 ans, pour atteindre 3 millions de tonnes par an en 1980 (*N. Penel et D. Vansteene, 2007*). Un rapport d'un plan européen sur les résidus de pesticides présents dans l'alimentation, réalisé en 2007 et publié par l'EFSA en 2009 souligne l'imprégnation de ces composés chimiques dans notre quotidien. En effet, ce programme de surveillance rapporte l'importante contamination des produits de bases de l'alimentation tels que les fruits, les légumes et les céréales. Par exemple, sur 265 pesticides de classes différentes recherchés sur toutes cultures confondues, 122 ont été retrouvés. Dans 1 cas sur 3, ce sont plusieurs pesticides que l'on retrouve en même temps. Comme 80% des produits testés proviennent de l'UE, il est évident que nos propres pratiques agricoles contribuent à poser des problèmes en termes de santé publique et environnementale.

Ce travail de thèse a double vocation. Il permet tout d'abord une expertise approfondie des impacts cellulaires et moléculaires des contaminants environnementaux de type pesticide. Il s'insère dans la logique du plan Ecophyto 2018 faisant suite au Grenelle de l'environnement de 2007. Ce plan vise à réduire et à sécuriser l'utilisation des produits phytosanitaires en

France pour diminuer leur utilisation de moitié d'ici à 2018. D'autre part, ce travail a pour but de développer des biomarqueurs *in vitro* de cancérogenèse qui pourraient s'intégrer à l'évaluation toxicologique des xénobiotiques. Cette démarche s'inscrit dans les directives du plan REACH adopté en 2006 et qui vise à rendre plus sûre la mise sur le marché des produits chimiques. Car la communauté scientifique s'accorde à le dire, l'analyse chimique et les tests de contrôle en vigueur restent insuffisants à ce jour pour l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux. Ils peuvent difficilement, par exemple, renseigner sur la fraction disponible pour les organismes ou prédire les effets cumulatifs des xénobiotiques. Bien que l'approche *in vitro* via l'utilisation de biomarqueurs a permis de manière sensible et spécifique de rendre compte de certains mécanismes de toxicité cellulaire (*S. Ait-Aïssa et al., 2003*) et de s'affranchir de certaines données *in vivo*, souvent longues, coûteuses et pouvant poser des problèmes d'éthique, elle reste à ce jour un domaine encore en plein expansion.

Encore aujourd'hui, les données épidémiologiques restent la valeur de référence de part leur robustesse pour la communauté scientifique. Cependant, de manière générale, ces données manquent, en particulier concernant les effets associés des pesticides aux cancers. Pourtant, ils sont considérés comme des agents étiologiques au même titre que l'alcool, le tabac ou les radiations. Sur 10 000 articles recensés sur Pubmed et relatant des effets des pesticides sur le modèle hépatique, 1/5 traitent réellement des problèmes sur le foie humain. Or moins de 10 articles au final soit 0.5% d'entre eux parlent de relations probables entre l'exposition aux pesticides et le développement des HCC. Dès 1984, une étude avait évalué la relation possible entre exposition à des composés chimiques et HCC, mais aucune association positive ne fut dégagée (*H. Austin et al., 1987*). Presque 20 ans plus tard, une étude égyptienne indique que l'exposition aux organophosphorés (OP) et aux carbamates (CB), 2 familles distinctes de pesticides, ne peut être directement associée aux HCC, mais qu'elle constitue un facteur de risque additif pour le développement des infections virales de type Hépatites (*S. Ezzat et al., 2005*). Or les hépatites chroniques peuvent conduire à la cirrhose et constituent donc en soi une condition pré néoplasique dans la majorité des HCC. C'est dans ce sens que la première relation, certes indirecte, fut faite entre les pesticides organochlorés (OC), composés hépatotoxiques et donc potentiellement carcinogènes, et le HCC. (*T. Y. Leong et A. S. Leong, 2005*). Puis en 2008, une revue espagnole recommande la diminution de l'exposition pré natale aux pesticides dans le but de réduire le développement de tumeurs malignes hépatiques observées d'après 25 ans de rapports pédiatriques (*J. Ferrís I Tortajada, et al., 2008*). Le cas de l'exposition au chlorure de vinyle, un agent propulseur, est intéressant (*V. B. Smulevich et*

al., 1988) puisqu'il relie indirectement l'angiosarcome du foie aux pesticides. En effet, ce composé est également présent dans les solutions aérosols et les professionnels qui l'utilisent à l'image de ceux de la coiffure qui utilisaient les laques contenant ce composé, sont dangereusement exposés (*P. F. Infante et al.*, 2009). Enfin, récemment, une étude épidémiologique a établi la première relation directe entre p,p'DDT et p,p'DDE (un pesticide organochloré et l'un de ses métabolites) et le HCC chez l'humain (*E. C. Persson et al.*, 2012).

Contrairement aux poumons par exemple, qui présentent une association avérée entre cancer et pesticides arsenicaux, organochlorés, organophosphorés et herbicide de type acides phénoxy-acétiques, il existe nous l'avons vu, peu de données cliniques/épidémiologiques sur le foie. Pourtant, un grand nombre de travaux *in vitro* et *in vivo* sont disponibles mais ils restent insuffisants pour reconsidérer le classement de ces composés chimiques. On sait entre autre que les organophosphorés, les carbamates et les organochlorés provoquent des changements dans le métabolisme lipidique, protéique et glucidique via l'altération des processus enzymatiques au sein du cytoplasme, des mitochondries et des peroxysomes. Ils ont donc en soi une incidence hépatotoxique. OC et CB sont également connus comme étant des inhibiteurs d'acétylcholinestérase (AChE), affectant le système nerveux central et périphérique, les muscles, le pancréas et bien entendu le foie. Les OC altèrent également les canaux ioniques et sont donc neurotoxiques. Ils sont capables de se fixer et d'activer le récepteur à l'œstrogène alpha (ER α) ainsi que le PXR, conduisant à la modulation de l'expression des cytochromes P450 CYP1A1 et CYP3A4 (*X. Coumoul et al.*, 2002). Ils induisent également un stress oxydant, ce qui perturbe les fonctions mitochondriales et se traduit par des complications nerveuses et hormonales (*S. Karami-Mohajeri et M. Abdollahi*, 2011). D'autres rapports relient les effets des pesticides à la perte des jonctions communicantes intercellulaires, diminuant le contrôle de l'homéostasie hépatique. Cette réduction est de plus un indicateur pour la détection des effets non génotoxiques conduisant à l'hépatocarcinogenèse (*M. Vinken et al.*, 2009). Certaines études relient l'exposition précoce prénatale aux OP à l'obésité et au diabète (*T. A. Slotkin et al.*, 2011). Enfin, ces mêmes OP présentent en plus de leur action en temps qu'agonistes des hormones stéroïdiennes, une action inhibitrice des cytochromes P450, ce qui se traduit par l'inhibition de la prise en charge des xénobiotiques et des substrats hormonaux endogènes (testostérone, Œstradiols...) par les systèmes métaboliques (*E. Hodgson et R. L. Rose*, 2006).

Les travaux présentés ci-après ont 2 objectifs complémentaires :

- dans un premier temps, ils permettent une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués durant l'initiation et la progression du cancer hépatique de type HCC. La TEM constituerait à ce jour le processus clé de l'initiation et de la progression tumorale. Ainsi nous avons analysé les étapes de ce phénomène sur primo-culture d'hépatocytes humains et sur lignée cancéreuse issue d'hépatoblastome.
- Dans un second temps, ces travaux nous ont permis d'étudier plus précisément les effets des polluants environnementaux (pesticides organochlorés, carbamates, dioxine...) sur l'initiation de ce processus. Le but était d'introduire de nouveaux outils fiables pour prédire les effets sanitaires potentiels de ces contaminants. En synergie avec les biomarqueurs de TEM, une nouvelle technologie permettant de mesurer l'impédance cellulaire a été évaluée. Sa validation a permis son intégration dans une démarche toxicologique classique.

Résultats

La TEM : mécanismes hépatiques et applications

Article 1: Crosstalk between β -catenin and Snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway

La première étape de ces travaux de thèse a consisté à analyser les processus cellulaires et moléculaires conduisant à la TEM sur le modèle cancéreux hépatique HepG2. En effet, en fonction du type cellulaire étudié, les voies de signalisation et les principaux facteurs engagés ne sont pas les mêmes. Dans ce cadre on parle d'un phénomène tissu voir modèle spécifique dont les bases d'activation varient en fonction entre autre du type de stimuli. Pour illustrer ce point, prenons l'exemple de TWIST, qui semblerait être essentiel dans le développement des métastases en induisant le processus de TEM et la migration sur cellules cancéreuses humaines (*J. Yang et al., 2004*). Nos données annexes ont montré que les HepG2 n'exprimaient pas ce facteur, même lorsqu'elles sont stimulées par le TPA, un inducteur de TEM reconnu sur ce modèle. Pourtant elles acquièrent bien la capacité de migration. De manière intéressante et complémentaire, nous n'avons jamais détecté de modulations de l'expression de la N-cadhérine, un composant mésenchymateux considéré comme un biomarqueur majeur de la TEM. La balance E-cadhérine/N-cadhérine permettrait en effet de suivre l'initiation du processus et d'évaluer le niveau de dédifférenciation (*J. Y. Chai et al., 2010*). Il semblerait que ces données se regroupent dans le sens où TWIST pourrait être responsable de la modulation de l'expression de la N-cadhérine (*N. R. Alexander et al., 2006 ; Y. H. Ng et al., 2012*). Ceci rend bien compte du fait que les biomarqueurs ne sont pas universels et que l'on puisse trouver des variations dans l'expression des protéines témoins du processus de TEM.

Pour ses raisons, nous avons cherché à identifier les événements cruciaux dans la dédifférenciation des cellules HepG2 et l'acquisition de nouvelles caractéristiques durant la TEM. En l'absence d'effets morphologiques probant du TGF- β sur cette lignée, nous nous sommes tournés vers le TPA, reconnu comme un inducteur fort du processus (*C. T. Hu et al., 2008 ; K. Murata et al., 2009*). C'est un phorbol d'ester qui a pour récepteur cellulaire un grand nombre de PKCs, et dont l'augmentation des activités est corrélée à la progression

tumorale sur HCC (*T. T. WU et al., 2007 et 2008*). Il est considéré comme un promoteur tumoral potentiel, en particulier lorsqu'il est associé aux effets d'un carcinogène. Il mime l'effet endogène du diacyl glycérol (DAG) et affecte un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la croissance, l'inflammation, la différenciation, la survie et le métabolisme d'un grand nombre de lignées cellulaires et de cultures primaires (*A. S. Guberman et al., 2005 ; G. Goel et al., 2007*). Ses effets sur les isomères PKCs sont ensuite relayés via l'activation des voies MAPK/ERK, PI3K, JNK et via l'activation d'AP-1 (protéines activatrices 1). Les AP-1 sont des facteurs de transcription comprenant les membres de la famille Fos et Jun qui sont des protéines régulées très précocement, en réponse généralement à des cytokines, des oncoprotéines, des mitogènes ou des agents de stress. Ils sont responsables de la modulation de l'expression de gènes possédant les éléments de réponse au TPA (TREs) également appelés sites de liaison AP-1 (*R. Wisdom, 1999*). Concernant ses applications, le TPA est utilisé comme modèle en carcinogénèse pour comparer les effets de certains métaux lourds (cadmium, arsenic, nickel), en particulier au niveau de la dérégulation des gènes jouant un rôle clef dans le cycle cellulaire (*K. Kawata et al., 2009*). Il est également couramment employé comme contrôle positif de l'activation de nombreuses voies de transduction. Enfin, il induit la migration des cellules HepG2, la production d'espèces réactives de l'oxygène et l'arrêt de la croissance cellulaire sur cette lignée (*Wen-Sheng Wu et al., 2006*).

Contrairement aux activations distinctes présentées à ce jour sur ce modèle cellulaire (*Chi-Tan Hu et al., 2011 ; Wen-Sheng Wu et al., 2006*), nous avons clairement établi dans l'article suivant le lien direct existant entre les acteurs de la cascade TPA-Erk1/2-Snail1-E-cadhérine conduisant à la TEM. Nous avons de plus fait la lumière sur la réelle implication du facteur Snail dans ce processus. En effet, il est souvent décrit comme essentiel à l'induction de la TEM (*C.T. Hu et al., 2008*). Nous nous sommes ainsi accordés sur le fait que Snail peut dans certains cas ne pas gouverner entièrement le phénomène de TEM (*E. A. Carver et al., 2001*). Ici nous avons montré qu'il était en effet essentiel à la répression de l'E-cadhérine mais qu'il n'avait qu'un rôle partiel dans l'engagement total du processus. Nous avons également établi un lien original entre la voie Erk1/2 et la voie Wnt, puisque le TPA est capable d'induire la formation d'un complexe entre Snail et β -caténine, conduisant à l'activation de la voie Wnt.

Ces résultats nous ont permis de faire la lumière sur l'importance de l'activation de la voie ERK1/2 parmi l'ensemble des voies évaluées (JNK/SAPK, AKT/PI3K, TGF β /SMAD, PKCs), et ce grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. En effet, le

processus de TEM sur lignée HepG2 semble être ERK1/2 dépendant. Ils nous ont également permis d'avoir une idée quant à l'implication des principaux facteurs dans ce processus puisqu'en dehors de Snail1, les facteurs Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 et Notch ont été testés. Enfin, dans l'intérêt de valider le TPA comme contrôle positif du processus de TEM pour la suite des expériences concernant l'expertise toxicologique des contaminants environnementaux, nous avons testé, sélectionné et validé un grand nombre de biomarqueurs de TEM fonctionnels sur ce modèle biologique. Parmi eux, on retiendra l'E-cadhérine, la β -caténine, S100a4, l'intégrine ITGA5, la Fibronectine, la Vimentine, Fak, ILK, HIF-1 α , Snail1, Slug, MMP7, CD44 et la p-120 caténine. Cette première étape de compréhension globale du processus sur modèle cancéreux hépatique servira à mieux évaluer le rôle des xénobiotiques dans la progression tumorale pouvant conduire à la formation de métastases.

Crosstalk between β -catenin and Snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway

Nathalie Zucchini-Pascal†*, Ludovic Peyre†, Roger Rahmani*

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, UMR 1331 TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), 06903 Sophia Antipolis, France.

†These authors equally contributed to this work

* **Correspondence** should be addressed to Dr. N. Zucchini-Pascal or Dr. R. Rahmani

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire et Génomique, INRA, UMR 1089, 06903 Sophia Antipolis, France.

Phone: 33 4 92 38 65 48, Fax : 33 4 92 38 64 01

E-mail: zucchini@sophia.inra.fr; rahmani@sophia.inra.fr

Running head: ERK stimulates EMT in hepatocarcinoma

Keywords: Epithelial-mesenchymal transition, ERK1/2, hepatocellular carcinoma, β -catenin, Snail

Number of Figures: 7

Number of Tables: 1

Contract grant sponsor: The French National Research Agency (ANR); **Contract grant number:** ANR “ONCOPOP” 06SEST26

Disclosure: All authors state that they have no conflicts of interest

Abstract

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an integral process in the progression of many epithelial tumors. It involves a coordinated series of events, leading to the loss of epithelial features and the acquisition of a mesenchymal phenotype, resulting in invasion and metastasis. The EMT of hepatocellular carcinoma (HCC) cells is thought to be a key event in intrahepatic dissemination and distal metastasis. In this study, we used 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) to dissect the signaling pathways involved in the EMT of HepG2 hepatocarcinoma cells. The spectacular change in phenotype induced by TPA, leading to a pronounced spindle-shaped fibroblast-like cell morphology, required ERK1/2 activation. This ERK1/2-dependent EMT process was characterized at the cellular and the molecular levels by a loss of E-cadherin function, modification of the cytoskeleton, the acquisition of mesenchymal markers and profound changes to extracellular matrix composition and mobility. Snail was essential for E-cadherin repression, but was not sufficient for full commitment of the TPA-triggered EMT. We found that TPA triggered the formation of a complex between Snail and β -catenin that activated the Wnt pathway. This study thus provides further evidence for the existence in hepatocellular carcinoma cells of a complex network governed by the ERK1/2 signaling pathway, converging on the coregulation of Snail and the Wnt/ β -catenin pathway and responsible for the onset and the progression of EMT.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most commonly diagnosed and the third most deadly cancer worldwide (El-Serag and Rudolph, 2007; Kensler et al., 2003). Hepatocarcinogenesis is a multistep process, slowly unfolding against a backdrop of chronic liver disease, including chronic hepatitis and cirrhosis, which are regarded as preneoplastic (Coleman, 2003; Bréchet, 2004; Liang and Heller, 2004). The early steps of HCC development are influenced by both epigenetic and genetic mechanisms (Thorgeirsson and Heller, 2002; Coleman, 2003). In later stages, the escape of carcinoma cells from the solid tumor may result from the dedifferentiation of epithelial cells, through a loss of cell-to-cell contact accompanied by an increase in migratory and invasive capacities (Friedl and Wolf, 2003). This phenotypic conversion, collectively referred to as the epithelial to mesenchymal transition (EMT), is considered to constitute an important process in intrahepatic dissemination and distal metastasis during HCC progression (Zijl et al., 2009; Firrincieli et al., 2010).

EMT plays a key role in the critical phases of embryonic development and contributes to both physiological processes, such as tissue repair, and pathological conditions, including carcinogenesis and fibrosis, in adults (Kalluri and Weinberg, 2009). It allows a polarized epithelial cell to undergo multiple biochemical changes leading to the acquisition of a mesenchymal cell phenotype. EMT occurs as a sequence of steps, beginning with the loss of apico-basal polarity, due to dissolution of the tight junctions, resulting in the intermingling of apical and basolateral membrane components (Firrincieli et al., 2010; Thiery, 2003; Ozdamar et al., 2005). Additional cell-to-cell junctions (adherens and gap junctions) are disrupted and the underlying basement membrane is broken down (Peinado et al., 2004). Cell surface proteins, such as E-cadherin and integrins, responsible for connecting epithelial cells to

neighboring cells and to the basement membrane, respectively, are replaced by N-cadherin and integrins conferring more transient adhesive properties on the cell, priming it for adoption of the mesenchymal phenotype (Huber et al., 2005). The cytoskeleton is also reorganized, to enable the cell to move through the three-dimensional extracellular matrix (ECM). In particular, the structure of the actin cytoskeleton undergoes dynamic changes, from a cortical actin network to stress fibers in areas of cell protrusion. The epithelial cytokeratin intermediate filaments are replaced by vimentin (Zeisberg and Neilson, 2009). Together, these changes cause a transition in cell shape from cuboidal to spindle-shaped. Finally, the cell acquires a motile and invasive phenotype.

These morphological changes are governed by multiple molecular mechanisms, including the loss of E-cadherin function, a crucial step in EMT (Cavallaro and Christofori, 2004; Huber et al., 2005). Low levels of E-cadherin have been observed in HCC and are associated with a poor prognosis (Endo et al., 2000), reflecting the critical role of the loss of this protein in tumor progression. E-cadherin is thought to be downregulated via several repressors acting either indirectly (e.g. Twist, Goosecoid) or directly, by binding to and repressing the E-cadherin promoter (e.g. Snail, Slug, Zeb) (Peinado et al., 2007; Yang and Weinberg, 2008).

E-cadherin repression is frequently accompanied by activation of the β -catenin/Wnt signaling cascade (Fransvea et al., 2008). β -catenin, a member of the protein complex connecting cadherins to the actin cytoskeleton at adherens junctions, plays a crucial role in the onset and progression of EMT. In normal unstimulated cells (i.e. in the absence of the Wnt signal), β -catenin levels are regulated by a multiprotein complex consisting of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein, axin, casein kinase 1 (CK1) and the glycogen synthase kinase, GSK3 β . In steady-state conditions, the cytoplasmic β -catenin is thus bound to this complex, leading to its phosphorylation by casein CK1 and GSK3- β at specific

serine/threonine residues. This sequential phosphorylation targets β -catenin for ubiquitination and ultimate degradation by the proteasome (Orford et al., 1997; Clevers 2006). Docking of the Wnt ligand to its Frizzled (Fz) receptor triggers activation of the canonical Wnt pathway, in a cascade of events that destabilizes the degradation complex, allowing unphosphorylated β -catenin to accumulate and to be translocated to the nucleus. Within the nucleus, β -catenin binds to lymphoid-enhancing factor/T-cell factor (LEF/TCF), to initiate the transcription of target genes, such as TCF1 (transcription factor 1), CD44, MMP-7 (matrix metalloproteinase-7) and cyclin D1 (Roose et al., 1999; Wielenga et al., 1999; Brabletz et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999).

The EMT of neoplastic hepatocytes is thought to be a key event in metastasis. We therefore investigated the cellular and molecular events underlying the EMT of hepatoma cells, using the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), which has been reported to induce EMT in differentiated HCC cells derived from the HepG2 cell line (Hu et al., 2008). We found that TPA-triggered ERK1/2 activation played a critical role in the onset and progression of EMT, allowing the regulation of cell-surface, cytoskeletal and ECM proteins. We also found that EMT in HepG2 cells resulted from co-activation of the Snail transcription factor and the Wnt/ β -catenin signaling pathway, amplifying EMT progression. Our data also reveal the existence of an intriguing network, governed by the ERK1/2 signaling pathway and responsible for regulating EMT in the dedifferentiation of hepatocellular carcinoma cells.

Materials and Methods

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen (Rockville, USA) and penicillin/streptomycin solution was obtained from Bio-Whittaker (CAMBREX Company, Walkersville, USA). U0126 was purchased from Cell Signaling (Danvers, USA). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesne, Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified. The antibodies specific for pERK1/2, pMEK1/2, ERK2, pP90RSK, pBad and Gapdh (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), E-cadherin, fibronectin (Epitomics, Burlingame, CA), β -catenin and Snail (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) were used for western blotting and immunodetection experiments (Table 1).

Cell culture and drug treatments

HepG2 was obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C, under a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. For all the experiments, the FBS content of the medium was decreased to 5%. TPA was added to the culture medium at a concentration of 100 nM for the times indicated. The mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)1/2 inhibitor U0126 was added before TPA treatment, at a concentration of 5 μ M. U0126 and TPA were prepared as stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in the medium was 0.25% in all conditions.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (Zucchini-Pascal et al., 2009). Target protein levels were determined by immunoblotting with the corresponding

primary antibodies for 1 hour and then incubating the membrane with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse immunoglobulin G or anti-rabbit immunoglobulin G; Promega, Madison, WI, USA). Signals were detected with Immobilon Western Detection Reagents (Millipore, Molsheim, France) and acquired with a CCD camera (ChemiGenius2, SynGene). Semi-quantitative analysis was then carried out with GeneTools software.

Immunofluorescence staining

Hepatoma cells seeded on glass coverslips in 12-well plates (4×10^5 cells per well). After drug exposure, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% saponin and incubated with the corresponding primary antibodies for 1 hour. They were then probed by incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to AlexaFluor[®] 488 or 594 (Molecular Probes, Eugen, OR) for 1 hour. Nuclei and F-actin were stained with 2,6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) and AlexaFluor 488-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Eugen, OR), respectively. Slides were mounted and sealed in ProlongGold antifade reagent (Invitrogen). Images were acquired with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CCD camera (ORCA ER, Hamamatsu Photonics), at x 20 magnification.

Cell migration assay

HepG2 cells were used to seed six-well plates (2×10^6 cells per well) and were cultured until they formed a monolayer (~ 48h later). Crossing wounds were created with a sterile pipette tip. The cell migration progress was photographed in three regions immediately (T0) and 24 h after treatments, with an inverted microscope (Nikon) equipped with a CCD camera (ORCA ER, Hamamatsu Photonics), at x 4 magnification. Automated analyses were carried out with Tscratch software (Gebäck et al., 2009).

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

RNAs were isolated and cDNA synthesized as previously described (28). Quantitative PCR analysis was carried out with LightCycler®480 Probes Master (Roche), according to the manufacturer's instructions, together with FAM-labeled hydrolysis probes from the Universal Human Probe Library Set (Roche). Intron-spanning primers were designed with Universal Probe Library Assay Design Center software (https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct_030000). Calculations were carried out with *gapdh* as the endogenous control reference gene. Fold differences in gene expression were calculated with LightCycler software, taking into account the efficiency of amplification, determined from a standard curve obtained with the second-derivative maximum method.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed with the EZ-ChIP Kit (Upstate Biotechnology), according to the manufacturer's instructions. Briefly, immunoprecipitation was carried out with specific antibodies directed against Snail (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), normal rabbit IgG (as a negative control, Millipore, Molsheim, France) or against RNA Pol II (as a positive control, mouse monoclonal IgG1, Millipore, Molsheim, France) for 16 hours at 4°C, with rotation. The purified immunoprecipitated DNA was eluted in 20 µl. ChIP DNA was analyzed by PCR, with specific primers amplifying two fragments of the *Cdh1* promoter and one fragment of the 3'-untranslated region (UTR), as described by Saito *et al.* (Saito *et al.*, 2006). The amplified DNA was subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The binding of Snail to DNA was assessed by calculating dividing the intensity for each bound sample by

the input, dividing the value for the vehicle control by the input and then calculating the ratio of the two results.

Small interfering RNA (siRNA)

HepG2 cells were used to seed 12-well plates (1.2×10^5) and were transfected with 40 pmol control or Snail siRNA pool (Santa Cruz), in the presence of interferin transfection reagent (Polyplus-Transfection, NY, USA), according to the manufacturer's instructions. After 24 h of incubation at 37°C, cells were treated with TPA, with or without U0126. At each of the times indicated, RNA and proteins were extracted for quantitative PCR and western blotting analysis, respectively.

Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times. Data are expressed as means \pm standard deviations (SD). The statistical significance of differences between samples was determined in Student's *t* test. Probability is indicated as follows: * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$.

Results

ERK1/2 activation is critical for TPA-mediated hepatoblastoma cell migration.

The activation of MAPK pathways (including ERK, p38 and JNK) by TPA treatment has been reported in several cell models. Hence, we studied the kinetics of MAPK activation in HepG2 cells by western blotting with antibodies directed against phosphorylated forms of ERK1/2, p38 (data not shown) and JNK (data not shown), to analyze kinase activation. The ERK1/2 signaling pathway was the most rapidly and strongly activated of the MAPK pathways tested. Indeed, TPA treatment led to a considerable increase in the amounts of phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2) and their known downstream effectors (Fig. 1A). This activation occurred within five minutes of TPA treatment (data not shown) and peaked after about one hour. As expected, the use of U0126, a specific inhibitor of MEK1/2, abolished all downstream ERK1/2 signal transduction (Fig. 1A).

Because TPA has been reported to induce EMT-like cell scattering in HepG2 cells (Hu et al., 2008), we used U0126 to determine whether ERK1/2 activation was responsible for this process. In control conditions, HepG2 cells had an epithelial cell-like morphology with a characteristic “cobblestone” appearance and the organization of F-actin into a cortical pattern at cell-to-cell junctions (Fig. 1B, arrowhead). Phase contrast microscopy revealed that the cells underwent a change in morphology in response to TPA treatment, acquiring a pronounced spindle-shaped fibroblast-like cell morphology within 24 h of treatment, with polarization of the F-actin stress fibers throughout the cell (Fig. 1B, arrows). HepG2 cells treated with TPA in the presence of the MEK1/2 inhibitor U0126, underwent little or no change in morphology, contrasting strongly with the results obtained when the cells were treated with TPA alone (Fig. 1B). U0126 had no apparent effect on cell morphology (data not shown). We investigated the possible functional impact of ERK1/2 pathway blockade on

TPA-induced cell migration, by carrying out wound-healing assays. TPA treatment resulted in more complete and rapid wound closure (Fig. 1 C and D) than the control treatment (DMSO). U0126 slowed TPA-mediated cell migration by a mean of 70 % ($P < 0.01$), while it had no effect on the basal wound closure (data not shown).

These results revealed that ERK1/2 activity is directly involved in the morphological transformation and cell migration induced by TPA.

Inhibition of the ERK1/2 pathway abrogates the TPA-mediated deregulation of epithelial and mesenchymal markers

Cell migration is often considered a hallmark of EMT. We therefore investigated whether the TPA-induced ERK1/2-dependent migration of cells was consistent with EMT. This process is classically associated with the deregulation of defined molecular markers, including cell-surface, cytoskeletal and extracellular proteins.

We first investigated the effect of TPA on the cytoskeletal markers S100a4 and vimentin. Levels of mRNA for S100a4, a marker of hepatocytes undergoing EMT (Zeisberg et al., 2007), increased considerably in response to TPA treatment, in a concentration- and time-dependent manner. These levels had increased by a factor of about 10, 48 hours after TPA and their increase was abolished by simultaneous treatment of the cells with U0126. Vimentin is an intermediate filament protein normally found in cells of mesenchymal origin in physiological conditions or in migrating epithelial cells. The presence of this protein is commonly used to identify cells undergoing EMT in cancers (Yang et al., 2004; Boyer et al., 1989). In HepG2 cells, the vimentin gene was weakly expressed in basal conditions (data not shown). However, after 48 h of TPA treatment, vimentin mRNA levels had considerably increased (Fig. 2A). This effect was ERK1/2-dependent, because it was abolished by U0126 treatment.

Extracellular matrix (ECM) remodeling is another major phenotypic modification observed during EMT. Fibronectin, a high-molecular weight glycoprotein, serves as a scaffold for the fibrillar ECM and is one of the first molecules to appear during the formation of the fibrillar ECM. We therefore analyzed fibronectin levels by western blotting and immunofluorescence studies. Western blot analysis (Fig. 2B) shown that TPA treatment induced a time-dependent upregulation of fibronectin protein levels over control conditions (t0), and that this effect was prevented by U0126. These findings are consistent with the synthesis of large amounts of fibronectin in the cytoplasm of HepG2 cells detected by immunofluorescence analysis after 24 h of TPA treatment (Fig. 2C). Fibronectin was deposited as fibrils (arrows) in the extracellular compartment, 48 h after TPA exposure. Interestingly, this extensive fibronectin matrix was significantly decreased by exposure to U0126. The formation of fibronectin fibrils requires the presence of fibronectin receptors, such as $\alpha5\beta1$ (Schwarzbauer and Sechler, 1999). The overproduction of fibronectin was accompanied by a significant induction of $\alpha5$ transcripts (itga5) in cells treated for 48 h with TPA (Fig. 2D). In the presence of U0126, this effect was abrogated. It is to note that U0126 had no effect on the expression and the localization of fibronectin (data not shown)

Thus, HepG2 cells exposed to TPA underwent an EMT process in an ERK1/2-dependent fashion.

ERK1/2 is critical for TPA-mediated cdh1 repression.

As E-cadherin downregulation is the prototypic hallmark of EMT, we then investigated E-cadherin protein levels in untreated (t0) and TPA-treated cells in the presence and absence of U0126. In HepG2 cells, exposure to TPA for 30 minutes to 48 h resulted in significantly lower levels of E-cadherin protein ($\approx 60\%$ at 24 h) than in control conditions, and this decrease was prevented by U0126 (Fig. 3A and B). In the absence of TPA, U0126 had no

apparent effect on E-cadherin protein levels (data not shown). Indirect immunofluorescence studies (Fig. 3C) showed that E-cadherin was restricted to zones of cell-to-cell contact in control conditions. In the presence of TPA, its distribution was disorganized, resulting in a loss of membrane labeling. Co-treatment with U0126 prevented the effect of TPA. As expected, the expression of E-cadherin (*CDH1*) gene decreased within 24 h of TPA exposure, and a sustained decrease was observed thereafter ($\approx 80\%$ after 48 h of TPA treatment). Inhibition of ERK1/2 activity restored the basal level of *CDH1* expression. TPA therefore seems to abolish the transcription of the E-cadherin gene in an ERK1/2-dependent manner.

The *CDH1* promoter is frequently repressed, directly or indirectly, by specific transcriptional repressors, such as Snail, Slug and Twist 1. Previous study had shown that the EMT triggered by TPA is dependent on Snail (Hu et al., 2008). Accordingly, we sought to determine if ERK1/2 was responsible for the Snail activation. Because this protein is extremely labile (half-life of only 25 min), we firstly used qPCR analysis to determine whether TPA directly affected Snail gene expression. mRNA levels were about seven times higher in HepG2 cells exposed to TPA than in control cells, and the TPA-induced expression of Snail was prevented by simultaneous incubation with U0126 (Fig. 4A). This induction was both rapid (within 4 h of TPA treatment) and transient. It is to note that TPA treatment did not increase expression of the Twist, Slug or Zeb genes (data not shown), confirming the role of Snail as the most important E-cadherin repressor activated by TPA in HepG2 cells.

Secondly, we investigated the requirement of the ERK1/2 signaling pathway for the E-cadherin repression induced by TPA, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. PCR-amplified fragments specific to the *CDH1* promoter region containing the E-box (obtained with two different primer pairs, ChIP1 and 2, Fig. 4B) gave a weak signal for DNA extracted in control conditions (DMSO and U0126, data not shown) and immunoprecipitated with an antibody against Snail. The treatment of Hepg2 cells for 45 minutes with TPA

resulted in significant binding of Snail to the E-cadherin promoter, and this effect was strongly decreased by simultaneous incubation with U0126 (Fig. 4C and D).

These results are consistent with previous findings and demonstrate that the binding of Snail to the overlapping E-box sequences in the E-cadherin promoter is dependent on ERK1/2 activity.

Snail is necessary, but not sufficient, for TPA-induced EMT

We used small interfering RNAs (siRNAs) to knock down endogenous Snail expression in HepG2 cells, to confirm the essential role of Snail in TPA-driven EMT.

We first assessed the ability of Snail siRNAs to knock down Snail expression. The transfection of cells with Snail siRNA significantly decreased Snail protein ($\approx 75\%$) and mRNA ($\approx 60\%$) levels (Fig. 5A and 5B, respectively).

Snail silencing resulted in significantly lower levels of TPA-induced E-cadherin protein and mRNA loss (Fig. 5A and 5C, respectively) than observed after transfection with nonspecific siRNA (siCT) and in mock transfection conditions. Having confirmed the essential role of Snail in TPA-driven E-cadherin repression, we investigated the contribution of Snail and ERK1/2 signaling pathways to the EMT of TPA-exposed HepG2 cells. The induction of vimentin (Fig. 6A) and fibronectin (data not shown) by TPA was prevented by both Snail siRNA and ERK1/2 inhibition. TPA-induced S100a4 expression was partially restored by Snail siRNA, and totally repressed by U0126 (Fig. 6B). These results are consistent with the poor efficacy of Snail silencing against EMT morphological changes in HepG2 cells exposed to TPA (Fig. 6C). Indeed, the morphological modifications induced by TPA were strongly inhibited by exposure to U0126 (Fig. 6C, TPA+U0126, -siRNA), whereas Snail siRNA was less effective at preventing development of the spindle-shaped fibroblast-

like cell morphology (Fig. 6C, TPA, +siRNA). The inhibition of EMT features by U0126 was almost entirely prevented by the transfection of cells with Snail siRNA.

S100a4 is a known Wnt target gene, suggesting a possible role for TPA in the activation of β -catenin/TCF signaling. Moreover, it has been shown that Snail can increase Wnt-dependent target gene expression by interacting functionally with β -catenin. We therefore investigated whether Snail associated with β -catenin upon TPA treatment. Co-immunoprecipitation and western blotting demonstrated that Snail bound to β -catenin (Fig. 6). This binding was enhanced at 24 h of TPA treatment and was significantly inhibited by U0126.

These results suggest that there is cross-talk between the Snail and β -catenin signaling pathways in the commitment of EMT induced by TPA in HepG2 cells.

TPA activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway

β -catenin signaling requires stabilization of the cytoplasmic component of β -catenin, which then enters in nucleus, where it associates with and activates TCF/LEF transcription factors. We therefore investigated whether the EMT process observed in HepG2 cells exposed to TPA resulted from the co-activation of Snail and the Wnt/ β -catenin pathway. The distribution of β -catenin within the cell was analyzed by western blotting (Fig.7A) and immunofluorescence analysis (Fig.7B) in TPA-treated HepG2 cells. Total β -catenin levels increased, in a time-dependent manner, in cells exposed to TPA (Fig. 7a), without mRNA induction (data not shown). These findings are consistent with stabilization of the β -catenin protein. A significant increase in the amount of β -catenin in the nucleus of the cells was observed within 4 h of incubation with TPA, whereas cytoplasmic protein levels remained unchanged. This nuclear translocation was reversed by U0126. For confirmation of these results, we visualized the distribution of β -catenin, by immunofluorescence imaging. As

expected, in basal conditions, HepG2 cells showed staining of the plasma membrane and weaker staining of the nucleus. These cells are known to co-express the wild-type and a constitutive active truncated mutant of β -catenin, resulting in a dual distribution, at the membrane and in the nucleus. However, in the presence of TPA, marked nuclear staining of endogenous β -catenin was observed (24 h), this effect being prevented by U0126 (Fig. 7B).

As nuclear β -catenin is the hallmark of active Wnt signaling, we investigated TCF/LEF activation, by assessing expression of the *MMP-7* and *CD44* genes by qPCR, two known down-stream target genes of the β -catenin/TCF transcription complex. A large increase in *MMP-7* and *CD44* gene expression was observed in HepG2 cells exposed to TPA (Fig. 7C). Interestingly, U0126 prevented this induction of gene expression, whereas Snail siRNA had no such effect. These findings suggested a Snail-independent regulation of these critical genes.

Thus, TPA induces ERK1/2-dependent β -catenin translocation into the nucleus, leading to the activation of specific target genes dependently and independently of Snail activation. These data indicate that TPA-driven EMT requires both the Snail and β -catenin activation pathways and is dependent on ERK1/2.

Discussion

Features of EMT have been observed in cancers developing in several tissues. In the liver, there is a body of evidence to suggest that hepatocellular EMT plays a key role in the dissemination of malignant hepatocytes during HCC progression, allowing hepatic tumor cells to invade the capsule or the portal vein (Zijl et al., 2009). EMT is now recognized as key process in the mechanisms of metastasis, but the molecular signaling processes underlying EMT in HCC remain poorly understood. This study is the first to reveal the complex networks implicated in EMT in HCC, involving crosstalk between Snail and the β -catenin/Wnt pathway, governed by ERK1/2.

Our results highlight the importance of ERK signaling in the onset of hepatocellular EMT in response to TPA stimulation. We found that the inhibition of ERK1/2 signaling prevented E-cadherin repression, mesenchymal marker induction, cell scattering and the acquisition of a spindle cell-like phenotype during EMT. A crucial role for ERK1/2 signaling pathways in the onset and progression of EMT in several cell or biological models has been widely demonstrated (Thiery, 2003; Barberà et al., 2004; Shin et al., 2010). Previous experimental studies have shown that the ERK pathway is necessary either for mesodermal gene induction during development (Christen and Slack, 1999; Yao, 2003) or for the full EMT induced by several stimuli in tumor cell lines (Ellenrieder et al., 2001; Grände et al., 2002; Bates and Mercurio, 2003; Peinado et al., 2003). For instance, it has been shown that U0126 completely abolishes the mesenchymal conversion of the thyroid epithelial cells in response to costimulation with TGF- β 1 and EGF (Grände et al., 2002). Levels of ERK1/2 production and activity are significantly higher in HCC models and human HCC tissue specimens than in healthy liver (McKillop et al., 1997; Ito et al., 1998). Moreover, MAPK/ERK activity has been shown to be positively correlated with tumor size and

aggressive tumor behavior (Schmitz et al., 2008; Domínguez et al., 2003), suggesting that ERK1/2 activation reflects aggressive tumor behavior in clinical conditions.

Our findings, together with those of previous studies, provide evidence for a crucial role of Snail in E-cadherin repression by TPA. Moreover, we show that the transcription of Snail and the binding of this factor to the *CDHI* promoter following exposure to TPA are dependent to the activation of ERK1/2. These observations were supported by the inhibition of the Snail induction and activation (qPCR and ChIP experiments, respectively) by U0126, and are also consistent with previous findings. For example, it has been shown that suppression of ERK1/2 activity in MCF7 or HEK293 cells correlated with the downregulation of Snail (Zhou et al., 2004). Moreover, the ERK pathway leads to the activation of the transcription factor Snail1 in chick embryo that undergoes a process of EMT in the central dermomyotome (Delfini et al., 2009). We notably found that ERK1/2 was involved in the binding of Snail to the *CDHI* promoter and, thus, in the repression of E-cadherin gene transcription.

Snail activity can also be regulated post-translationally (Ito et al., 1998), but Snail gene transcription generally displays the reverse pattern to E-cadherin gene transcription, being detected in cells that have lost their epithelial characteristics. Indeed, an inverse correlation between E-cadherin and Snail levels has been reported in a panel of epithelial and dedifferentiated cells derived from carcinomas of various types, including HCC (Jiao et al., 2002). EMT is initiated principally by the abolition of E-cadherin gene expression by zinc-finger proteins (e.g. Snail, Slug) or bHLH family transcriptional factors (e.g., Twist), which bind to three E-boxes located in the proximal promoter of *CDHI* (Giroldi et al., 1997). The disruption of E-cadherin-mediated adhesion is thought to be a key step in progression toward the invasive phase of hepatocarcinoma (Behrens et al., 1992; Takeichi, 1993; Christofori and Semb, 1999). The connection between the loss of E-cadherin function in cancer cells and the

occurrence of EMT is well documented. E-cadherin downregulation in HCC is associated with increases in tumor size, low levels of histological differentiation, invasion recurrence, metastasis and poor prognosis (Kozyraki et al., 1996; Yang and Weinberg, 2008). The disruption of E-cadherin/ β -catenin complexes at cell-to-cell junctions is characteristic of hepatocellular EMT. Indeed, E-cadherin is frequently found in the cytoplasm and may even be entirely absent in poorly differentiated HCC, as it remains at the plasma membrane in well-differentiated human HCC (Zijl et al., 2009; Zhai et al., 2008; Fransvea et al., 2008). Increases in the expression of E-cadherin repressors, such as Snail, constitute a critical step in EMT in HCC, as demonstrated by the acceleration of invasion by Snail overexpression (Miyoshi et al., 2005; Sugimachi et al., 2003).

Furthermore, in addition to its role in the repression of E-cadherin, Snail is also known to stimulate mesenchymal gene transcription (Nieto, 2002). We found that TPA induced the production of vimentin and fibronectin and that this induction was dependent on Snail and ERK1/2. However, we demonstrated that Snail binding to and repression of the E-cadherin gene was not sufficient to induce a complete morphological transformation, unlike exposure to U0126. Indeed, Snail knockdown had only a limited effect on the induction by TPA of a spindle-shaped fibroblast-like morphology. Thus, Snail is not exclusively responsible for full commitment to the EMT process induced by TPA. It has been shown that, in some instances, Snail could induce an incomplete EMT. For instance, in mice lacking Snail, the cells of the primitive streak begin to invade, however the EMT is incomplete (Carver et al., 2001). Moreover, a study demonstrated that hypoxia condition could induce partial EMT of breast cancer cells where induction of Snail does not elicit a motile phenotype (Lundgren et al., 2009). By analogy, a loss of E-cadherin has been shown to be necessary, but not always sufficient, for the induction of full EMT (Zavadil et al., 2005). For example, the ectopic expression of E-cadherin does not restore the epithelial phenotype in cells overproducing

Twist (Thiery et al., 2002; Yang et al., 2004). Taken together, our findings imply that TPA-induced EMT involves another signaling pathway in addition to Snail activation.

Although Snail plays a critical role in EMT, the repression of E-cadherin gene transcription has frequently been reported to occur in tandem with activation of the Wnt signaling cascade (Uematsu et al., 2003; Yook et al., 2005). Wnt signaling may therefore help to stabilize the pool of β -catenin released after Snail-mediated E-cadherin repression (Nelson and Nusse, 2004; Conacci-Sorell et al., 2002). Moreover, direct interactions between the Wnt signaling pathway and Snail activation have been demonstrated. Indeed, Stemmer *et al.* showed that Snail can interact physically and functionally with β -catenin, to increase Wnt-dependent target gene expression (Stemmer et al., 2008). This association is thought to stimulate the Wnt pathway in a positive feedback loop. Consistent with this view, we found that TPA-induced ERK1/2 activation led to a physical interaction between Snail and β -catenin in differentiated hepatoma cells.

The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a key role in liver development, growth, regeneration, zonation, metabolism and oxidative stress (Thompson and Monga, 2007). It is also involved in the development of various liver diseases, ranging from hepatitis to HCC. Indeed, abnormal regulation of the transcription factor β -catenin has been identified as a major, early carcinogenic event in HCC development (Takigawa and Brown, 2008). Intriguingly, we found that ERK1/2, but not Snail, was required for the induction of MMP-7 and CD44. These results are consistent with an activation of the Wnt pathway that is dependent on ERK1/2 activation but independent of Snail. It thus seems likely that TPA-triggered ERK1/2-dependent EMT may result from the combined activation of the Snail/ β -catenin axis and the Wnt pathway.

Aberrant activation of the Wnt/ β -catenin pathway has been observed in 18-67% of HCC tumors and has been shown to play an important role in hepatocarcinogenesis (Laurent-

Puig et al., 2001). β -catenin mutations have been identified as chief activators of the Wnt pathway in HCC. Such alterations were therefore believed to be involved in the occurrence and development of HCC (Merle et al., 2004; Ban et al., 2003; Schmitt-Graeff et al., 2005). We used the HepG2 cell line, a well-differentiated cell line derived from human HCC. These cells produce both full-length (wild-type) and a truncated form of β -catenin lacking the phosphorylation sites for GSK3 (de la Coste et al., 1998). Our findings are consistent with previous reports of a dual membrane and nuclear distribution of the β -catenin protein (Zeng et al., 2007). We found that, despite the constitutive activation of canonical Wnt signaling in HepG2 cells, TPA increased the nuclear translocation of β -catenin and activation of the Wnt signaling pathway. We found that the stabilization of β -catenin in the nucleus after TPA exposure was associated with the overproduction of MMP-7 and CD44, two proteins directly involved in invasion and metastasis (Mori et al., 1995; Günthert et al., 1991).

This study reveals the key role of ERK1/2 in an EMT process regulated by Snail and the Wnt/ β -catenin signaling pathway, implying a balanced mechanism in the dedifferentiation of hepatocellular liver carcinoma cells. Our work sheds new light on mechanisms that could be targeted in new molecular approaches. Identification of the genetic controls and biochemical mechanisms underlying acquisition of the invasive phenotype and the subsequent spread of hepatocellular cells is of prime importance when selecting potential treatment targets. Inhibition of the ERK pathway can reduce, or even entirely abolish EMT in the liver. These findings imply that the targeting of ERK signaling in HCC could potentially improve outcomes, restricting the progression of this disease.

Abbreviations: Ab, antibody; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenyl indole; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial to mesenchymal transition; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2; FBS, foetal bovine serum; HCC, Hepatocellular carcinoma; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

Conflict of interest statement

No potential conflicts of interest are reported for any of the authors.

Acknowledgments

The authors received a Public Institutional Funding from INRA and the French National Research Agency (ANR “ONCOPOP” 06SEST26). We gratefully acknowledge G. de Sousa for helpful scientific discussion.

References

- Ban KC, Singh H, Krishnan R, Seow HF. 2003. GSK-3beta phosphorylation and alteration of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 199(2):201-208.
- Barberà MJ, Puig I, Domínguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiró S, Baulida J, Francí C, Dedhar S, Larue L, García de Herreros A. 2004. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 23(44):7345-7354.
- Bates RC, Mercurio AM. 2003. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 14(5):1790-1800.
- Behrens J, Frixen U, Schipper J, Weidner M, Birchmeier W. 1992. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol* 3(3):169-178.
- Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, Gavrilovic J, Thiery JP. 1989. Reversible transition towards a fibroblastic phenotype in a rat carcinoma cell line. *Int J Cancer Suppl* 4:69-75.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155(4):1033-1038.
- Bréchet C. 2004. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 127(5 Suppl 1):S56-61.
- Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21(23):8184-8188.
- Cavallaro U, Christofori G. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014:58-66.
- Christen B, Slack JM. 1999. Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos. *Development* 126(1):119-125.
- Christofori G, Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24(2):73-76.
- Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469-480.
- Coleman WB. 2003. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 3(6):573-588.
- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109(8):987-991.
- de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15):8847-8851.
- Delfini MC, De La Celle M, Gros J, Serralbo O, Marics I, Seux M, Scaal M, Marcelle C. 2009. The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAIL1 pathway. *Dev Biol* 333(2):229-237.
- Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Francí C, García de Herreros A. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 23(14):5078-5089.
- El-Serag HB, Rudolph KL. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132(7):2557-2576.
- Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM. 2001. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61(10):4222-4228.
- Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. 2000. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 31(5):558-565.
- Firincieli D, Boissan M, Chignard N. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in the liver.

- Gastroenterol Clin Biol 34(10):523-528.
- Fransvea E, Angelotti U, Antonaci S, Giannelli G. 2008. Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 47(5):1557-1566.
- Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5):362-374.
- Gebäck T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 46(4):265-274.
- Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A, Schalken JA. 1997. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 241(2):453-458.
- Grände M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. 2002. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci* 115(Pt 22):4227-4236.
- Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Hausmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65(1):13-24.
- Hu CT, Wu JR, Chang TY, Cheng CC, Wu WS. 2008. The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2. *J Biomed Sci* 15(3):343-355.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):548-558.
- Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27(4):951-958.
- Jiao W, Miyazaki K, Kitajima Y. 2002. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 86(1):98-101.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6):1420-1428.
- Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD. 2003. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer* 3(5):321-329.
- Kozyraki R, Scoazec JY, Flejou JF, D'Errico A, Bedossa P, Terris B, Fiorentino M, Bringuier AF, Grigioni WF, Feldmann G. 1996. Expression of cadherins and alpha-catenin in primary epithelial tumors of the liver. *Gastroenterology* 110(4):1137-1149.
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 120(7):1763-1773.
- Liang TJ, Heller T. 2004. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127(5 Suppl 1):S62-71.
- Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. 2009. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer* 101(10):1769-1781.
- McKillop IH, Schmidt CM, Cahill PA, Sitzmann JV. 1997. Altered expression of mitogen-activated protein kinases in a rat model of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 26(6):1484-1491.
- Merle P, de la Monte S, Kim M, Herrmann M, Tanaka S, Von Dem Bussche A, Kew MC, Trepo C, Wands JR. 2004. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127(4):1110-1122.

- Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. 2005. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92(2):252-258.
- Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K. 1995. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer* 75(6 Suppl):1516-1519.
- Nelson WJ, Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303(5663):1483-1487.
- Nieto MA. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3):155-166.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 272(40):24735-24738.
- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307(5715):1603-1609.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7(6):415-428.
- Peinado H, Portillo F, Cano A. 2004. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48(5-6):365-375.
- Peinado H, Quintanilla M, Cano A. 2003. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278(23):21113-21123.
- Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. 1999. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285(5435):1923-1926.
- Saito T, Nagai M, Ladanyi M. 2006. SYT-SSX1 and SYT-SSX2 interfere with repression of E-cadherin by snail and slug: a potential mechanism for aberrant mesenchymal to epithelial transition in human synovial sarcoma. *Cancer Res* 66(14):6919-6927.
- Schmitt-Graeff A, Ertelt-Heitzmann V, Allgaier HP, Olschewski M, Nitschke R, Haxelmans S, Koelble K, Behrens J, Blum HE. 2005. Coordinated expression of cyclin D1 and LEF-1/TCF transcription factor is restricted to a subset of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 25(4):839-847.
- Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA. 2008. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 48(1):83-90.
- Schwarzbauer JE, Sechler JL. 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol* 11(5):622-627.
- Shin SY, Rath O, Zebisch A, Choo SM, Kolch W, Cho KH. 2010. Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 70(17):6715-6724.
- Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J. 2008. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene* 27(37):5075-5080.
- Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Tsuneyoshi M. 2003. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 9(7):2657-2664.
- Takeichi M. 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5(5):806-811.
- Takigawa Y, Brown AM. 2008. Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets* 9(11):1013-1024.
- Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398(6726):422-426.

- Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442-454.
- Thiery JP. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15(6):740-746.
- Thompson MD, Monga SP. 2007. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 45(5):1298-1305.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31(4):339-346.
- Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, Li K, Peterlin BM, McCormick F, Jablons DM. 2003. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res* 63(15):4547-4551.
- van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, Machat G, Grubinger M, Huber H, Mikulits W. 2009. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 5(8):1169-1179.
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST. 1999. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154(2):515-523.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117(7):927-939.
- Yang J, Weinberg RA. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14(6):818-829.
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM. 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22):12759-12764.
- Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* 280(12):11740-11748.
- Zavadil J, Böttinger EP. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24(37):5764-5774.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67(21):10123-10128.
- Zeisberg M, Neilson EG. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119(6):1429-1437.
- Zeng G, Apte U, Cieply B, Singh S, Monga SP. 2007. siRNA-mediated beta-catenin knockdown in human hepatoma cells results in decreased growth and survival. *Neoplasia* 9(11):951-959.
- Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, Wu MC, Wang HY. 2008. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 14(37):5665-5673.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6(10):931-940.
- Zucchini-Pascal N, de Sousa G, Rahmani R. 2009. Lindane and cell death: at the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology* 256(1-2):32-41.

Figure legends

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

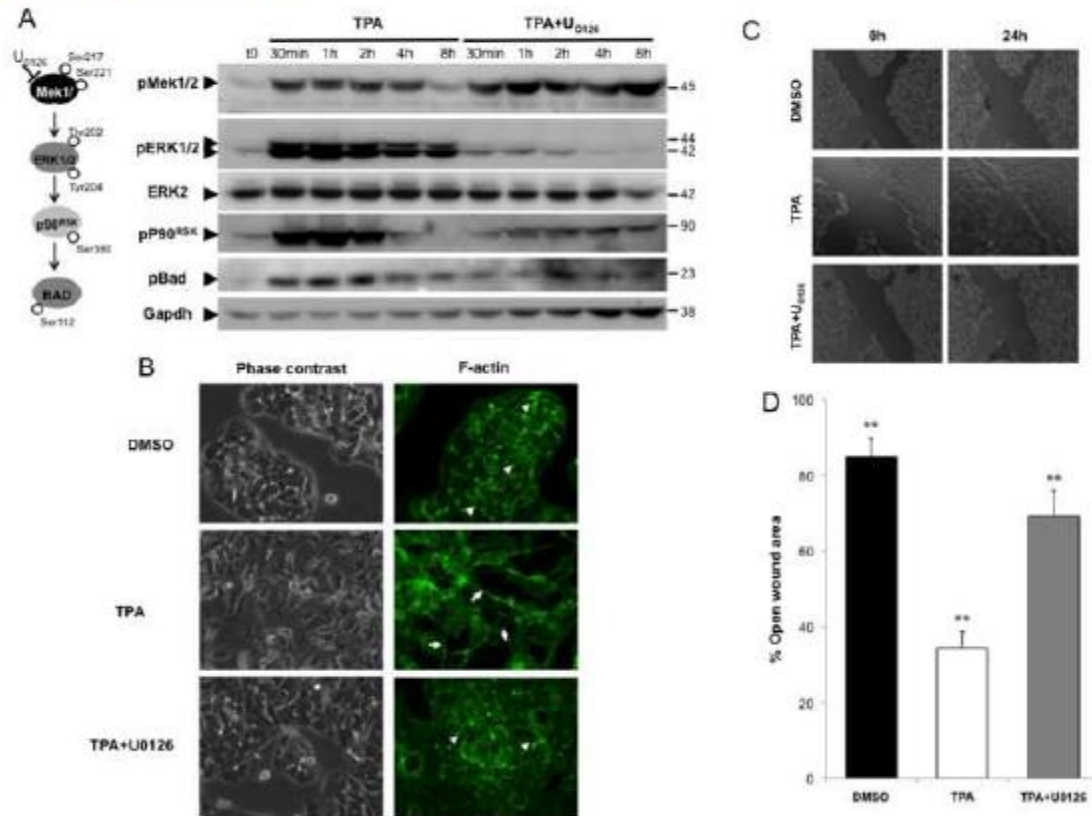


Figure 1. The inhibition of ERK1/2 activation by U0126 prevents HepG2 cell migration. A, HepG2 cells were exposed to 100 nM TPA for 30 min to 4 h, with or without U0126. Cells were lysed and subjected to western blotting, as described in section 2. The ERK1/2 signaling pathway was studied by analyzing the phosphorylation of MEK1/2, ERK1/2, P90^{rsk} and Bad, together with ERK2 levels. As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against Gapdh. B, 24 h after TPA treatment, cell morphology was examined under a light microscope. F-actin was visualized by AlexaFluor 488-conjugated phalloidin staining (green) and fluorescence microscopy. C and D, The subconfluent HepG2 cells were wounded 48 h after plating and exposed to TPA or TPA + U0126. Images were obtained 24 h after treatment (C). Percentages of open wound area at 24

h, in each set of conditions, as in C, were plotted, with wound width was normalized with respect to the initial value at 0 h (D). Data are means \pm SEM * P <0.05; ** P <0.01.

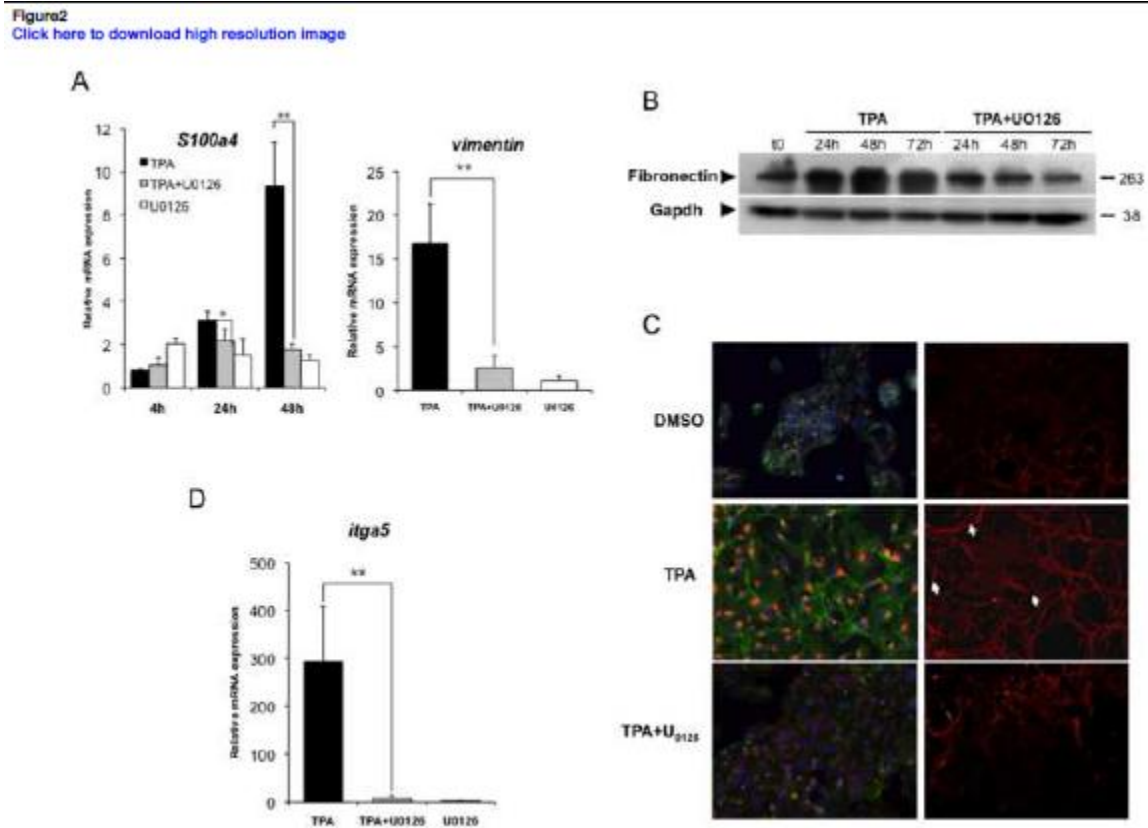


Figure 2. ERK1/2 inhibition reverses the EMT process induced by TPA. A, changes in mRNA levels for the EMT-related *S100a4* and *vimentin* genes were assessed by real-time RT-PCR. The HepG2 cells were stimulated with 100 nM TPA, with or without U0126, for 4 h, 24 h and 48 h (*S100a4*) or 48 h (*vimentin*). B, cells were exposed to 100 nM TPA, with or without U0126, for 24 to 72 h. At the indicated times, cells were lysed and fibronectin protein levels were assessed by western blotting (results representative of three experiments). C, HepG2 cells were grown on coverslips and treated with TPA with or without U0126 for 24 h (intracellular fibronectin) or 48 h (fibronectin deposition). After exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of fibronectin (red) and visualization of the actin cytoskeleton (phalloidin, green) and nuclei (DAPI, blue). The

results shown are representative of three independent experiments. D, *itga5* mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h of TPA treatment, with or without U0126. For all real-time RT-PCR experiments (A and D), relative mRNA levels with respect to *gapdh* mRNA levels are given, and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Errors bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01.

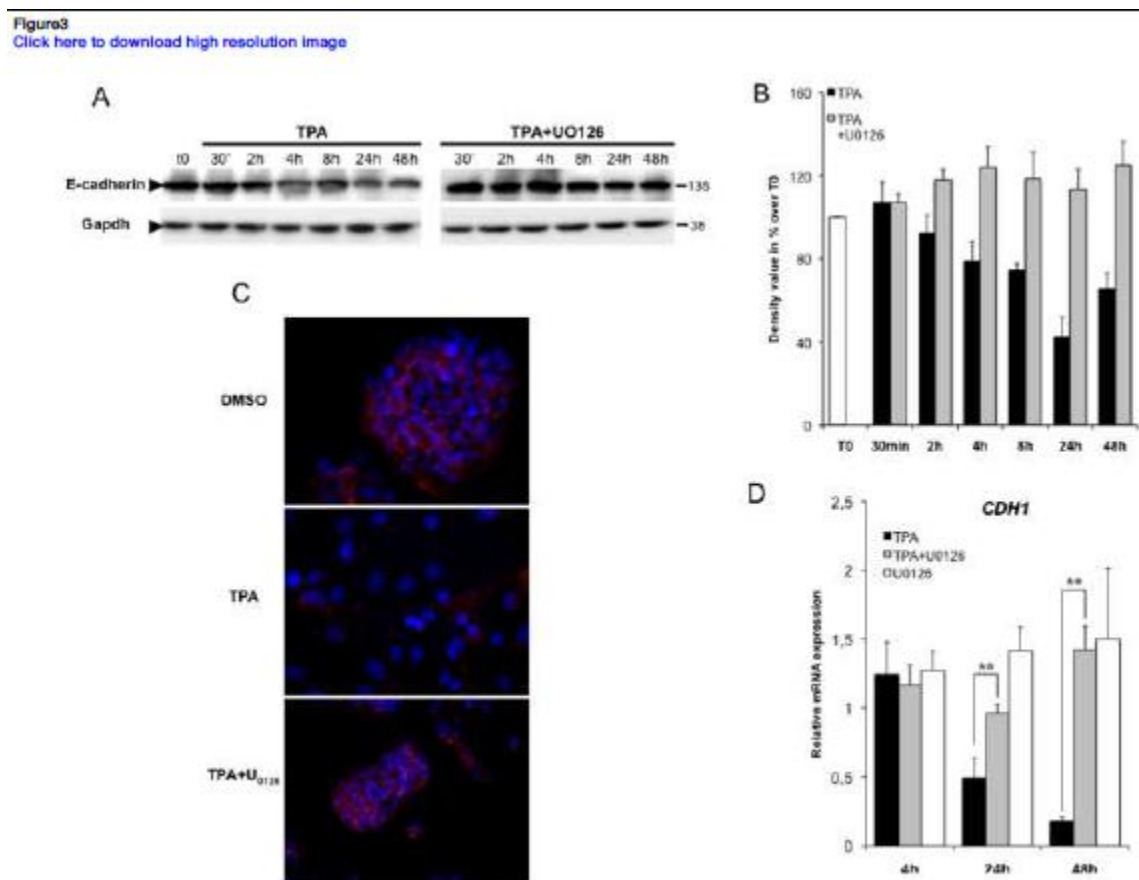


Figure 3. The repression of E-cadherin in TPA-exposed HepG2 cells is ERK1/2-dependent. HepG2 cells were treated with 100 nM TPA in the presence or absence of U0126. A, At the indicated time, cells were lysed and E-cadherin protein levels were assessed by western blotting. B, Band intensities were assessed by densitometry after image acquisition with a CCD camera and the results are presented as the ratio of Gapdh-normalized results for treated cells to those for DMSO-treated cells (means \pm SD for three experiments). * P <0.05 and

** $P < 0.01$. C, HepG2 cells were grown on coverslips and treated with TPA with or without U0126 for 48 h. After exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of E-cadherin (red) and visualization of nuclei (DAPI, blue). The results shown are representative of three independent experiments. D, E-cadherin (*CDH1*) mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 4, 24 and 48 h of TPA treatment, with or without U0126. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

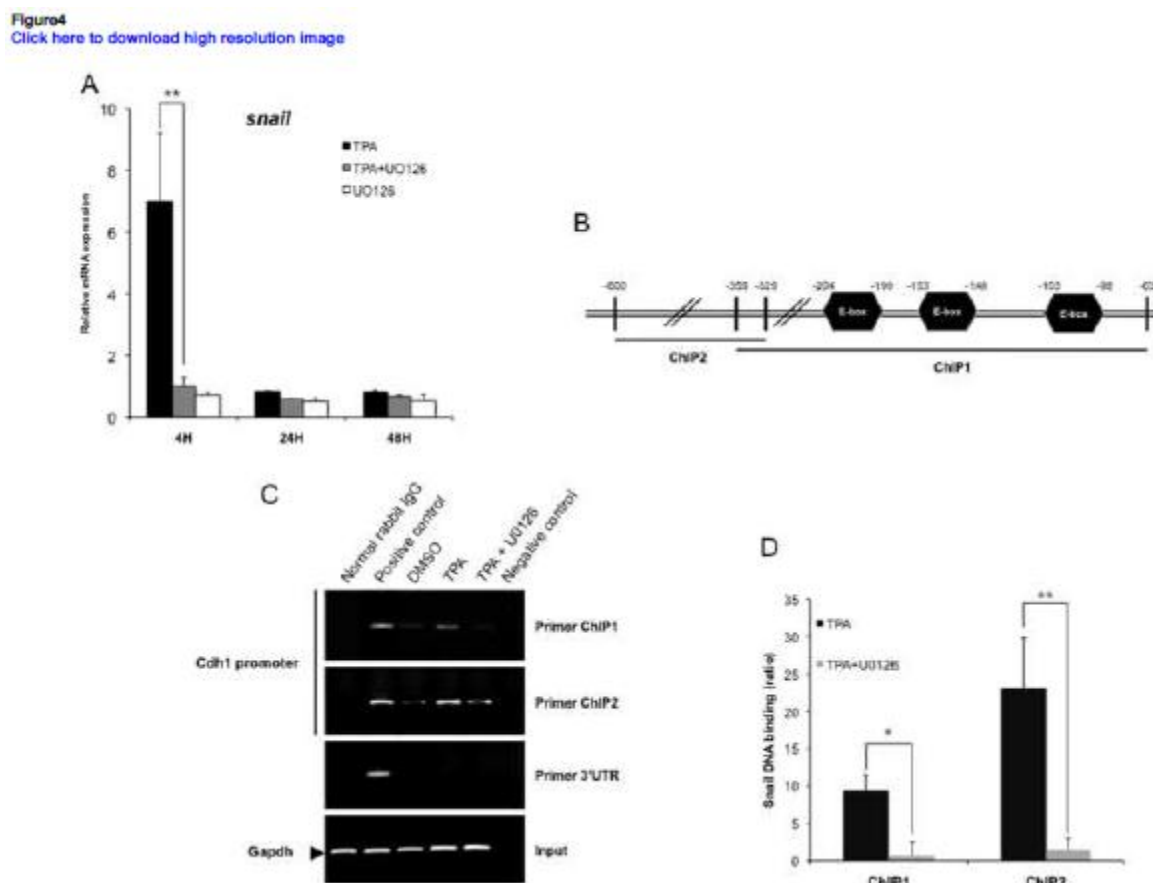


Figure 4. The binding of Snail to the E-box of the *CDH1* promoter requires ERK1/2 activation. A, Levels of Snail mRNA were assessed by real-time RT-PCR. The HepG2 cells were stimulated with 100 nM TPA, with or without U0126, for 4 h, 24 h and 48 h. Relative

mRNA expression levels (with respect to *gapdh*) were determined, with the mRNA levels in DMSO-treated cells set to 1. B, Diagram of the *CDH1* promoter showing the amplification site used for ChIP analyses. C, HepG2 cells were exposed for 4 h to 100 nM TPA with or without U0126. Rabbit anti-Snail, normal rabbit IgG (negative control) and mouse anti-RNA Pol II (positive control) antibodies were used for immunoprecipitation. Input DNA, together with immunoprecipitated and purified DNA, was used for the amplification by PCR of a 296 bp (ChIP1) or a 271 bp (ChIP2) fragment specific to the *CDH1* promoter. D, Band intensities were assessed by densitometry after image acquisition with a CCD camera and the results are presented as the ratio between the value for treated cells to that for DMSO-treated cells, both these values being normalized according to input (means \pm SD for three experiments). The data presented are representative of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01.

Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

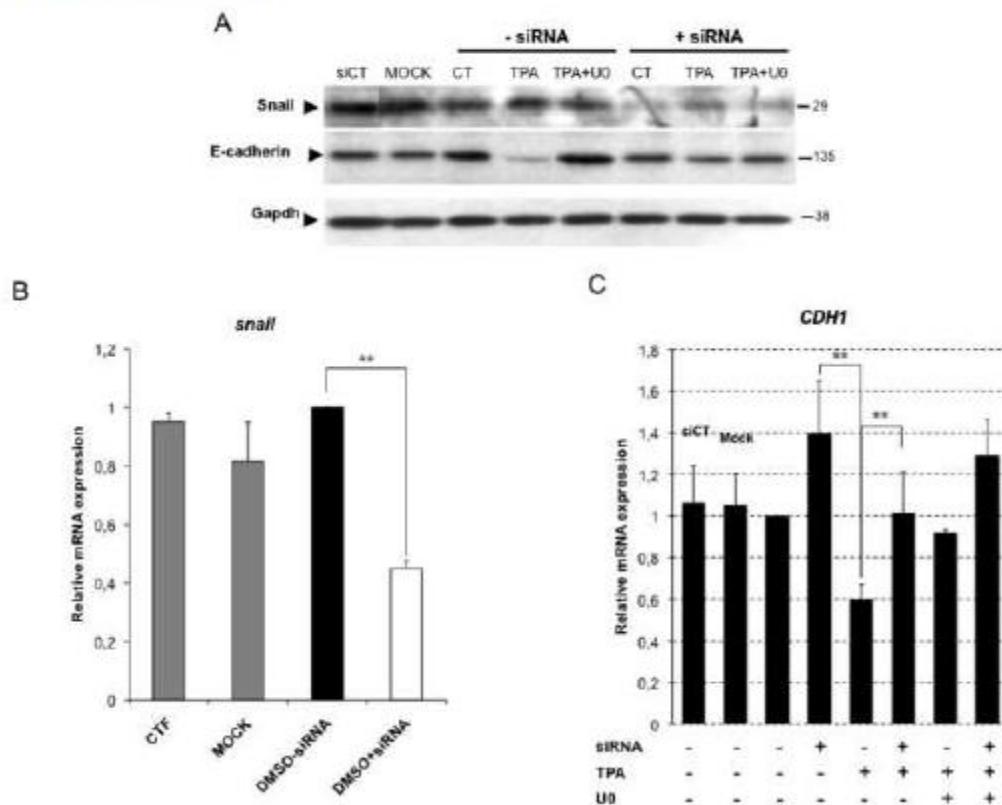


Figure 5. The expression of E-cadherin upon TPA exposure is restored by Snail silencing and ERK1/2 inhibition. HepG2 cells were transfected by incubation with either 40 pmol Snail siRNAs or nonspecific siRNAs (CT) for 36 h. “Mock” indicates that the cells were subjected to transfection conditions in the absence of siRNA. HepG2 siRNA transfectants were exposed to 100 nM TPA, with or without U0126. A, Total proteins were extracted after 48 h and the expression level of Snail and E-cadherin was examined by western blotting. As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against Gapdh. *Snail* (B) and *CDH1* (C) mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h of TPA treatment, with or without U0126. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells (untransfected condition) were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01.

Figure6
[Click here to download high resolution image](#)

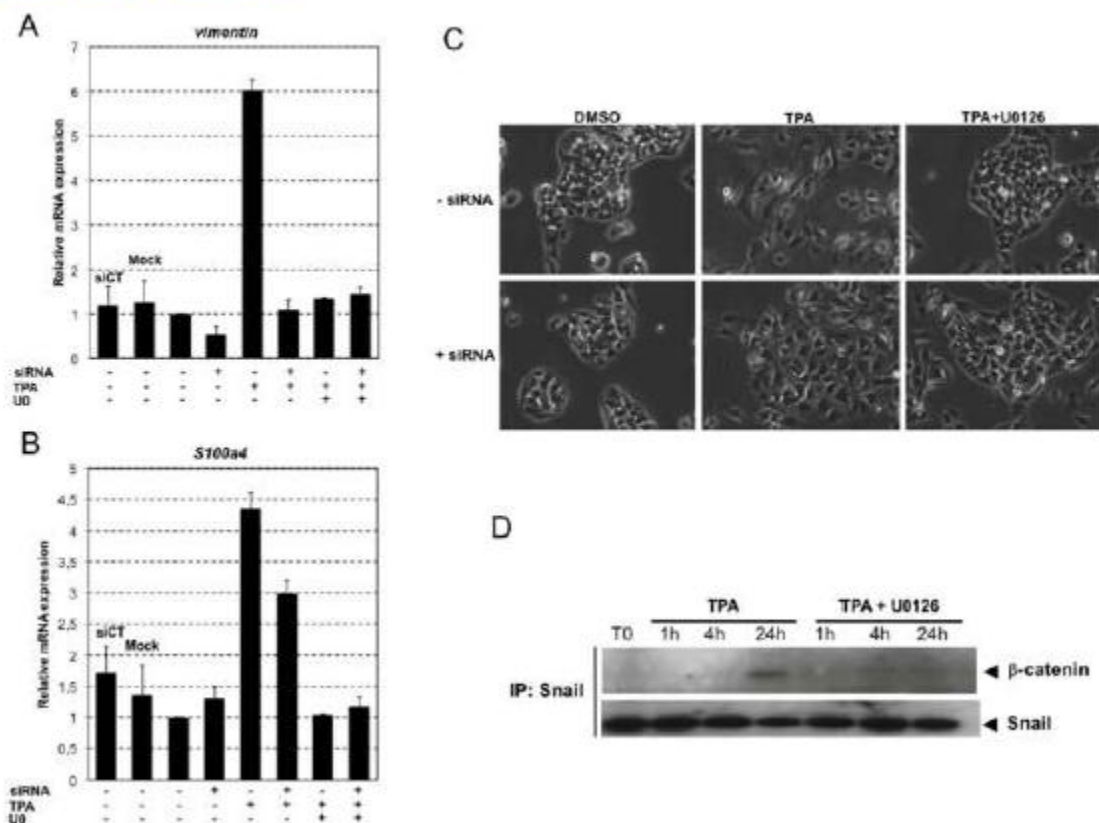


Figure 6. Snail knockdown restores the TPA-induced EMT only partially. A, B, C, HepG2 cells were transfected by incubation with either 40 pmol Snail siRNAs or nonspecific siRNAs (CT) for 36 h. HepG2 siRNA transfectants were exposed to 100 nM TPA, with or without U0126.

CDH1 (A) and *S100a4* (B) mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h of TPA treatment, with or without U0126. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells (untransfected condition) were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. C, 48 h after TPA treatment with or without U0126, cell morphology was examined under a light microscope. D, The complex of Snail/ β -catenin was examined by co-immunoprecipitation assays at 1, 4 or 24 h on HepG2 exposed to TPA with or without U0126. The co-immunoprecipitation results are representative of three independent repeats for each experiment.

Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

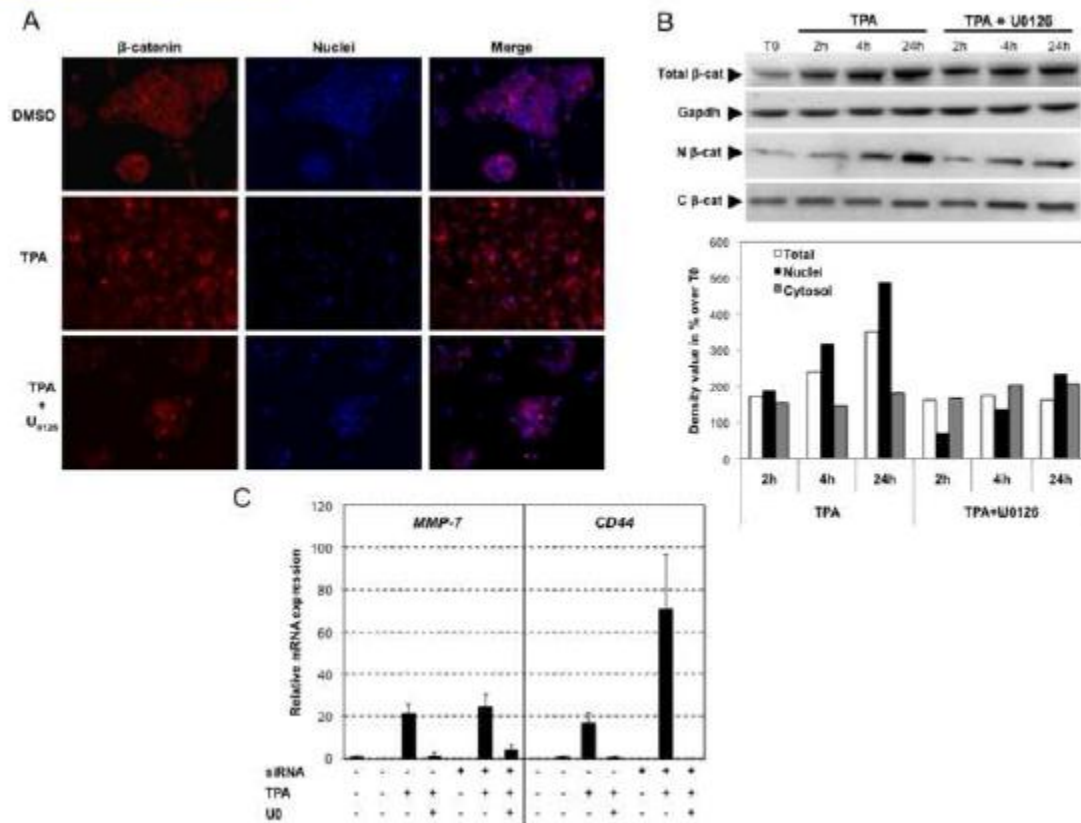


Figure 7. TPA promotes EMT through concomitant activation of the Snail and Wnt/ β -catenin pathways. A, HepG2 cells were grown on coverslips and treated with TPA with or without U0126 for 48 h. After exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of β -catenin (red) and visualization of nuclei (DAPI, blue). B, At indicated time, nuclear (N) and cytosolic (C) fractions were prepared as described in materials and methods, and β -catenin was detected by Western blotting. The semi-quantification of chemiluminescence was performed after the acquisition with a CCD camera. Results are expressed as a percentage of T0-treated cells, designated as 100%. The results are representative of three independent repeats for each experiment. C, Changes in mRNA levels for *MMP-7* and *CD44* genes were assessed by real-time RT-PCR. The HepG2 cells were stimulated with 100 nM TPA, with or without U0126 for 48 h. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells (untransfected condition) were set to 1. Error bars

indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 1

[Click here to download high resolution image](#)

Table 1
Primary antibodies used for Western blot and Immunofluorescence staining.

| Antigen | Phosphorylation site | Source / Type | Manufacturer | Dilution WB | Dilution IF |
|---------------------|----------------------|-------------------------|----------------|-------------|-------------|
| pErk1/2 | Thr202/Tyr204 | Rabbit mAb ¹ | Cell signaling | 1:2000 | |
| pErk1/2 | Thr202/Tyr204 | Mouse mAb | Sigma | | 1:300 |
| pMEK1/2 | Ser217/221 | Rabbit pAb ² | Cell signaling | 1:2000 | |
| Erk2 | | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:5000 | |
| pP90 ^{Rsk} | Ser380 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| pRad1 | Ser136 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Gapdh | | Rabbit mAb | Cell signaling | 1:7500 | |
| E-cadherin | | Rabbit mAb | Epitomics | 1:5000 | |
| β -catenin | | Mouse mAb | Santa Cruz | 1:2000 | 1:500 |
| Fibronectin | | Rabbit mAb | Epitomics | 1:1000 | 1:400 |
| Sna1 | | Rabbit pAb | Santa Cruz | 1:1000 | |

¹ mAb, monoclonal antibody

² pAb, polyclonal antibody

Article 2: effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion:
epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance

L'Endosulfan est un composé chimique de la famille des pesticides organochlorés (POC) rentrant dans l'utilisation des produits phytosanitaires à visée insecticide/acaricide pour lutter contre les ravageurs des cultures fruitières, légumières et céréalières. Il fut utilisé pendant environ 50 ans sur l'ensemble du globe avant d'être classé en 2001 lors de la convention de Stockholm comme polluant organique persistant (POP). Sa stabilité varie dans l'environnement en fonction du milieu (eau, sol, air) et de ses paramètres physico-chimiques (turbidité, PH, oxygène dissout) mais dépasse rarement 1 an. On le retrouve généralement sous forme d'isomère alpha et beta dans les proportions respectives 7 : 3. Or la dégradation du stéréo-isomère β conduit à l'apparition de la forme α -endosulfan plus stable thermodynamiquement parlant, ce qui accroît sa demi-vie dans l'environnement de 120 jours normalement ainsi que son potentiel toxique. En effet, il est reconnu comme étant très toxique pour les organismes aquatiques (R50) et il peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (R53). Il a comme autres propriétés d'être volatile, résistant à la photo dégradation et bioaccumulable le long des chaînes trophiques. L'ensemble de ses caractéristiques en font un composé préoccupant pour l'environnement et la santé publique. Son interdiction est principalement liée à son caractère xénoestrogène. C'est en effet un perturbateur endocrinien reconnu, également responsable de problèmes touchant aux systèmes nerveux et immunitaire chez l'homme. De plus, il aurait des effets néfastes sur le développement et la reproduction. En dehors de ces données et des cas cliniques avérés (nausées, convulsions, néphro-toxicité, morts...), il existe peu d'études concernant son implication dans l'initiation et la progression tumorale en dehors des corrélations démontrées et des suspicions quant à son implication dans les cancers de la prostate et du sein (*P. R. Band et al., 2011 ; A. P. Høyer et al., 2002 ; Z. Zhu et al., 2008*).

Il a été interdit en Europe dès 2005, puis suite à la nouvelle convention de Stockholm d'avril 2011, dans d'autres pays du monde comme les USA ou le Brésil. Cependant, il est toujours largement utilisé dans certains pays africains, en Chine et en Inde. En France, sa distribution a été stoppée fin 2006 et l'arrêt de son utilisation fut fixé en mai 2007. A cette même période, un rapport européen sur l'évaluation des résidus de pesticides dans l'alimentation a montré que l'Endosulfan était couramment présent dans les denrées. Sur 57 489 fruits et légumes testés, il a été retrouvé présent dans 685 cas. Il a également été détecté sur des produits

destinés à l'alimentation des nourrissons, et dans certains cas à des doses supérieures aux LMR (limites maximales de résidus autorisés). C'est donc une substance active surveillée et classée comme étant risquée à court. Peu de données témoignent de sa présence chez l'homme. Néanmoins, une étude rapporte qu'il pouvait être présent à des doses de 1.3×10^{-8} M dans les urines des consommateurs américains, avec des maximums relevés dans le sérum de consommateurs espagnols de l'ordre de 6.3×10^{-8} à 3.58×10^{-7} M (R. C. T. Casabar et al, 2010). Ces valeurs sont révélatrices d'un niveau potentiellement bien plus élevé présent dans les tissus humains. Par comparaison, il a été relevé des quantités d'Endosulfan sulfate (un métabolite) de l'ordre de 4 à 94 ng/g de lipides provenant d'échantillons de graisses de bélugas mâles (J. Weber et al., 2010). De grandes quantités d'Endosulfan sont retrouvées dans la peau, les muscles, le foie, la graisse et les reins d'espèces marines du Greenland (Danemark) suggérant une même bioaccumulation chez l'homme. Cependant, les mécanismes toxicologiques d'action de l'Endosulfan étant encore à ce jour mal compris, nous nous sommes penchés sur les impacts cellulaires et moléculaires en réponse aux composés organochlorés.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à trois POC que sont le DDT, l'Heptachlore et l'Endosulfan. Très vite, sur la lignée HepG2, l'Endosulfan s'est révélé comme étant le composé qui induisait de nets changements phénotypiques à des doses non cytotoxiques, proches de $20 \mu\text{M}$. On sait que sur cette même lignée, l'Endosulfan est génotoxique (D. Li et al., 2011). Il a été montré positif au test SCE (échange de chromatines sœurs) à des doses de 0.1 à $10 \mu\text{M}$ et au test MN (micronoyau) à des doses de 1mM ou répétées de $10 \mu\text{M}$ (Y. Lu et al., 2000). D'autres données montrent qu'il est capable d'inhiber l'expression des CYP1A1 (X. Coumoul et al., 2001) et d'activer les voies ERK/MAPK et P38/SAPK à des doses de $30 \mu\text{M}$ conduisant à l'augmentation de l'activité AP-1 à l'image du TPA (M. O. Song et al., 2012). Comme c'est généralement à des doses proches de $50 \mu\text{M}$ que l'Endosulfan semble être cytotoxique (R. C. T. Casabar et al., 2010), nous nous sommes focalisés sur ses effets à plus faible dose. Grâce à l'utilisation combinée des tests de cytotoxicité et de la mesure de l'impédance en temps réel (système xCELLigence® Roche), nous avons sélectionné une dose efficace de $20 \mu\text{M}$. Le choix de la concentration est très important dans la mesure où les cellules HepG2 ont des niveaux inférieurs de cytochromes P450 (CYP) à ceux retrouvés normalement sur hépatocyte, dont les CYP2B6, -3A4 et -3A5 (Y. Fery et al., 2010) qui sont responsables de la métabolisation du POC. Cela peut conduire à son non prise en charge par les mécanismes naturels de détoxification et à des dommages liés

à la persistance dans le modèle, tels que le stress oxydant par exemple. En effet, Il a été décrit comme pouvant exercer un tel type de stress sur de nombreuses lignées cellulaires grâce entre autres à la production d'espèces réactives de l'oxygène (*K. Kannan et al., 2000 and 2003; P. F. Dehn et al., 2005; S. Antherieu et al., 2007*).

En prenant en compte l'ensemble de ces éléments, nous avons tenté de corréler les modifications phénotypiques observées au processus de TEM. Car l'observation de pseudopodes, l'individualisation de certaines cellules et la réorganisation du cytosquelette d'actine avec la formation de fibrilles de stress, constituent autant d'évènements représentatifs de l'initiation du processus de TEM, initialement montrés en réponse au TPA. Dans ce cadre, nous avons choisi d'utiliser les biomarqueurs de TEM sélectionnés lors du premier travail afin d'évaluer l'impact du POC sur l'initiation du processus de différenciation. C'est ainsi que nous avons noté une redistribution des protéines du cytosquelette RhoA/B/C et son effecteur principal Rock1, accompagné d'une augmentation de leurs expressions. En parallèle, nous avons montré que l'Endosulfan induisait l'activation de la voie Fak. Cette voie est impliquée dans la motilité et l'invasion durant les cancers malins et a été démontrée comme étant nécessaire durant la TEM sous l'induction du TGF- β et de Snail sur modèle hépatocytaire (*C. Cicchini et al., 2008*). Ces résultats préliminaires concordent avec le phénomène de plasticité cellulaire conduisant à la migration cellulaire.

Or il existe principalement deux formes de migration : collective et individuelle. La TEM induit un processus individuel plus représentatif des premières observations phénotypiques réalisées par microscopie. Nous nous sommes alors intéressés dans un second temps aux jonctions adhérentes, car leur perte est nécessaire pour l'initiation de la migration cellulaire. Nous avons d'une part mis en évidence la phosphorylation de la p120-caténine sous l'effet de l'Endosulfan, processus qui conduit à la déstabilisation des complexes cadhérines/caténines et qui conduit à l'augmentation du pool de β -caténine dans le cytoplasme. D'autre part, nous avons montré une répression génique de l'E-cadhérine de l'ordre de 50% à 48h de traitement, probablement due à l'augmentation transitoire et à l'activation combinée des facteurs de répression Snail1 et Slug observées par q-PCR et immunofluorescence. Ces deux évènements seraient à l'origine de la perte de la β -caténine au niveau des péri-membranaire observée, à sa stabilisation et à son activation. Or l'activation de la voie WNT/ β -caténine conduit à l'activation du complexe LEF-1/TCF-1 α et à l'expression de gènes cibles tels que la Fibronectine, S100a4, CCND1 ou encore P21. Ces expressions ont bien été notées.

Cependant, elles sont pour la plupart transitoires. L'expression d'autres marqueurs mésenchymateux tels que la Vimentine ou encore l'activation du facteur hypoxique HIF-1 α pouvant mener à l'angiogenèse, la migration et la formation de métastases ont été observées, mais l'absence de migration des cellules HepG2 sous l'effet de l'Endosulfan traduirait une TEM partielle ou incomplète.

Durant la TEM, la perte de l'E-cadhérine est liée au phénomène de résistance à l'anoïkis. En effet, une perte d'adhésion ou une adhésion inappropriée due aux constituants de la MEC ou à l'expression d'intégrines inadéquats se traduit normalement par l'induction de ce processus apoptotique particulier. Or la TEM confère aux cellules une résistance à la mort cellulaire en l'absence d'adhésions avec la MEC. Les HepG2 sont normalement insensibles à l'anoïkis. En présence d'une matrice de type Poly-Hema, elles n'adhèrent pas mais ne meurent pas pour autant. Cependant, en présence d'Endosulfan, on observe l'induction d'activités Caspases, des marqueurs pro-apoptotiques. Cette même activation est retrouvée sur les cellules non adhérentes qui ont en conditions normales (sans matrices) subissent une perte d'adhésion en réponse à l'Endosulfan. En outre, ce POC serait capable de sensibiliser les cellules de la lignée HepG2 à l'apoptose.

L'endosulfan a donc un effet sur la plasticité cellulaire, et conduit les cellules HepG2 à adopter, à des doses non toxiques, un phénotype métastable, partageant ainsi des critères à la fois épithéliaux et mésenchymateux. D'autre part, ce POC induit une sensibilisation transitoire des HepG2 à l'apoptose suite à leur perte d'adhésion, processus qui est modéré par une mise en place progressive d'une résistance à l'anoïkis. Au total, ces données traduisent un effet pro-tumoral et potentiellement préjudiciable à l'homéostasie hépatique en réponse à l'Endosulfan.

EFFECTS OF ENDOSULFAN ON HEPATOMA CELL ADHESION: EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND ANOIKIS RESISTANCE

Ludovic Peyre, Nathalie Zucchini-Pascal, George de Sousa and Roger Rahmani.

*Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, UMR 1331
TOXALIM Sophia Antipolis, 06903 Sophia Antipolis, France.

Correspondence should be addressed to to Dr. N. Zucchini-Pascal or Dr. R. Rahmani
Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, UMR 1331
400 route des Chappes, BP167
06903 Sophia Antipolis, France.
Phone: 33 4 92 38 65 48, Fax: 33 4 92 38 64 01
Email: rahmani@sophia.inra.fr

Abstract

Endosulfan is an organochlorine pesticide commonly used in agriculture yet classified by the Stockholm Convention in 2011 as a persistent organic pollutant (POP). Its potential toxicity makes its continued use a major public health concern. Despite studies in laboratory animals, the molecular mechanisms underlying the carcinogenic effects of endosulfan in human liver remain poorly understood. In this study, we investigated the phenotypical effects of endosulfan on HepG2 liver cells. First, we found that endosulfan disrupted the anoikis process. Indeed, cells exposed to endosulfan were initially sensitized to anoikis and thereafter recovered their resistance to this process. This phenomenon occurred in parallel to the induction of the epithelial to mesenchymal (EMT) process, as demonstrated by: (1) reorganization of the actin cytoskeleton together with activation of the FAK signaling pathway; (2) repression of E-cadherin expression; (3) induction of Snail and Slug; (4) activation of the WNT/ β -catenin pathway; and (5) induction and reorganization of mesenchymal markers (S100a4, vimentin, fibronectin, MMP-7). Secondly, despite the acquisition of mesenchymal characteristics, HepG2 cells exposed to endosulfan failed to migrate. This incapacity to acquire a motile phenotype could be attributed to a disruption of the interaction between the ECM and the cells. Taken together, these results indicate that endosulfan profoundly alters the phenotype of liver cells by inducing cell detachment and partial EMT as well as disrupting the anoikis process. All these events account, at least in part, for the carcinogenic potential of endosulfan in liver.

Keywords: endosulfan, anoikis, EMT, hepatocarcinoma, HepG2

Abbreviations: Ab, antibody; DAPI, 4',6'-di-amidino-2-phenyl indole; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial to mesenchymal transition; FAK, focal adhesion kinase; FBS, foetal bovine serum; HCC, Hepatocellular carcinoma; LEF1 / TCF-1, Lymphoid Enhancer Factor 1 / T Cell Factor 1 ; MMP, metalloprotease; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Poly-HEMA, Poly 2-hydroxyethyl methacrylate; POP, persistent organic pollutant; ROCK, Rho-associated protein kinase; WNT, wingless integration site; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

1. Introduction

Since the 1950's, organochlorine pesticides (OCPs) such as the chlorinated cyclodiene endosulfan have been employed extensively in agriculture, viticulture, horticulture, domestic and public health. Endosulfan is sold under different trade names (Thiodan®, Rocky®, Thionex®...) and corresponds to a mixture of 70% endosulfan- α and 30% endosulfan- β . While it does have beneficial effects on crops, it also represents a potential source of environmental contamination and risk to public health (M. H. Silva and D. Gammon, 2009). Indeed, endosulfan is a persistent organic pollutant (POP) that can build up in the environment and bioaccumulate through the food chain. Its persistent and bioaccumulative properties enable it to become stored in fats where it persists for a long time. Endosulfan is readily absorbed by humans via the stomach, the skin, the lungs, and the placenta (M. J. Lopez-Espinosa et al., 2008). This OCP is one of the most toxic pesticides currently on the market and is responsible for a large number of poisoning-related deaths (V. Moses and J. V. Peter, 2010). In animals, it is toxic to the liver, kidney, nervous system, blood system, immune system and reproductive organs (T. Hashizume et al., 2010; A. D. Karatas et al., 2006; T. Ahmed et al., 2011; M. Merhi et al., 2010; V. Briz et al., 2011; M. P. Chan et al., 2006; N. Choudhary et al., 2003; M. Aggarwal et al., 2008). Due to the risk of adverse effects on human health, the World Health Organization (WHO) classified endosulfan as a moderately hazardous Class 2 pesticide while the Environmental Protection Agency (EPA) considered it as "Highly Acutely Toxic" (Category I). Despite then being banned in more than 62 countries and by the Stockholm Convention in 2011, it is still used extensively (J. Weber et al., 2009). An interdiction for use will be effective in 2017.

While the potential carcinogenic effects of endosulfan remain a matter of debate, in vitro studies have revealed mechanisms induced by endosulfan that are implicated in tumor development and progression in testes, breast and liver (L. Hardell and M. Eriksson, 2003; Hoyer et al., 2002 ; R. Fransson-Steen et al., 1992; J. I. Perez-Carreón et al., 2009). An example of such a mechanism is the disruption of gap junctions (R. J. Ruch et al., 1990). Such gap junctional intercellular communication uncouplers are responsible for many cellular dysfunctions and multiple diseases including cancer (H. P. Ehrlich et al., 2006; Trosko J. E. 2011). In addition, the genotoxic potential of endosulfan has been described in HepG2 cells (Hashizume et al., 2010 ; Li et al., 2011) and exposure to sub-lethal doses of endosulfan and its metabolites causes DNA damage and mutations (Antherieu et al., 2007; Bajpayee et al.,

2006). One study using a computational quantum chemical model indicated that endosulfan and all its metabolites have carcinogenic potential (Bedor et al., 2010). However, the exact molecular mechanisms underlying the toxic and carcinogenic effects of endosulfan in liver cells remain poorly understood.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a highly coordinated multistep process during which epithelial cells acquire mesenchymal fibroblast-like properties. It has been implicated in a variety of diseases including fibrosis and in the progression of carcinoma (Jou J. and A. M Diehl, 2010). This fundamental program also plays a key role in the critical phases of embryonic development and in adults it contributes on the one hand to physiological processes such as tissue repair and on the other pathological conditions (Kalluri and Weinberg, 2009). The morphological changes imposed are governed by multiple molecular mechanisms including the loss of epithelial proteins such as E-cadherin (Cavallaro and Christofori, 2004; Huber et al., 2005) that leads to the reduction in cell-to-cell junctions (adherens and gap junctions), the loss of cell polarity, and the gain of mesenchymal markers such as the extracellular matrix compound fibronectin, the intermediate filament protein vimentin and S100a4 (Peinado et al., 2004; H. Kim et al., 2011; O. O. Ogunwobi and C. Liu, 2011). All these steps lead to the acquisition of motile and invasive properties (N. Matsuo et al., 2009).

E-cadherin is thought to be downregulated via several repressors acting either indirectly (e.g. Twist, Gooseoid) or directly by binding to and repressing the E-cadherin promoter (e.g. Snail, Slug, Zeb) (Peinado et al., 2007; Yang and Weinberg, 2008). E-cadherin repression is frequently accompanied by the activation of the β -catenin/Wnt signaling cascade (Fransvea et al., 2008; F. van Zijl et al., 2009). Indeed, during EMT, the cytoplasmic stabilization of β -catenin occurring via WNT activation signaling and GSK3- β repression (Medici et al, 2008), leads to the formation of a nuclear complex TCF/LEF/ β -catenin that modulates the expression of target genes such as fibronectin, MMP7 or S100a4 (S. Iwai et al., 2010). Communications between cells and the new extracellular matrix environment are mainly mediated by the activation of the focal adhesion kinase -FAK- transduction pathway (N. A. Chatzizacharias et al., 2008; C. Cicchini et al., 2008).

The liver is the most sensitive tissue to xenobiotic exposure and constitutes the main target of endosulfan toxicity. Thus, we investigated the cellular and molecular effects of endosulfan in human liver cells using the HepG2 cell line. In this study, we show that endosulfan permits a transient anoikis induction that is followed by recovery of anoikis resistance. This process occurs in parallel to partial EMT and is characterized by the

repression of E-cadherin expression, the loss of adherent junctions, cytoskeleton reorganization, extra-cellular matrix (ECM) reshuffle, WNT/ β -catenin pathway activation and the gain of mesenchymal markers (vimentin, fibronectin, S100a4). Despite evidence of all these events, the cells remain unable to acquire a motile phenotype. Thus the present study shows that endosulfan transiently sensitizes HepG2 cells to anoikis before allowing a later recovery of resistance to this process that coincides with the induction of partial EMT. Such events could account, at least in part, for the carcinogenic potential of endosulfan.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution, sodium pyruvate and Eagle's non-essential amino acids were from BioWhittaker (Cambrex Company, Walkersville, USA). DMSO (dimethylsulfoxide) and chemicals were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesne, Saint Quentin Fallavier, France). Protein assay materials were from Bio-Rad. All fluorescence reagents were from Molecular Probes (Eugene, OR). The OC endosulfan was from ChemService (West Chester, PA). The antibodies used for western blotting and immunodetection experiments were from Cell Signaling, Santa Cruz and Epitomics (Table 1). Cells were visualized with a Nikon Eclipse TE2000 phase contrast microscope.

2.2 Cell culture and drug treatments

HepG2 cells were maintained in DMEM with 1% penicillin/streptomycin, 1% non essential amino acids, sodium pyruvate, and 10% FBS, in humidified atmosphere at 37°C containing 95% O₂ and 5% CO₂. After washing with sterile phosphate buffer saline (PBS), cells were detached by trypsinization (trypsin/EDTA) and plated at a concentration of 0.5-1x10⁶ or 0.4-0.5x10⁵ cells/ml in 6-well or 24-well plates, respectively, depending on the experiment. For all experimental conditions, FBS was reduced to 5% in DMEM medium and cells were treated for the indicated time with endosulfan prepared as dimethylsulfoxide (DMSO) stock solution. The final DMSO concentration was 0.25% (v/v).

2.3 Viability test

Viable cells were determined by measuring the conversion of the tetrazolium salt MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich (St.Louis,MO) to formazan, as previously described (Fautrel et al., 1991). Briefly, cells were seeded in 96 well plates and treated at 50% confluency with a concentration of 20µM endosulfan during 24, 48 and 72h. The cells were then incubated with 0.5mg/ml MTT for 2h at 37°C. The water-insoluble formazan crystal was dissolved by adding 100µl DMSO to each well and the

absorbance was determined with a spectrophotometer at 550nm (MR7000, Dynatech Laboratories, Inc., USA).

2.4 Real-time cellular impedance

The xCELLigence system was used according to the manufacturers' instructions (Roche Applied Science (Mannheim, Germany) and ACEA Biosciences (San Diego, CA, USA)). Briefly, 1×10^4 cells were added to the 96-well E-plates. Twenty-four hours later, cells were treated with different concentrations of endosulfan (2, 10, 20, 50, 100 and 200 μM) in 5% FBS DMEM medium. Real-time cellular impedance was measured in each well (Cell Index values) and a signal was observed through the integrated software (RTCA Analyzer). Each curve is representative of an experiment performed in triplicate. To compare the influence of the endosulfan on the cells, the Normalized Cell Index (NCI_{ti}) was used, calculated using the DMSO control condition.

2.5 Immunofluorescence

Cells were seeded on glass slides in 24-well plates (4×10^5 cells per well) and were exposed to endosulfan at the indicated time and concentration. For cytoskeleton and extra-cellular matrix proteins (Rho-associated Kinase, vimentin and fibronectin) and transcription factors (Snail, Slug and Hif-1 α), the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized in 0.5% saponin. For structural proteins (E-cadherin and β -catenin), cells were fixed in -20°C methanol and permeabilized in 0.25% triton. In both cases, slides were incubated with antibodies (Table 1) for 1h at room temperature. After washing with PBS, goat anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to AlexaFluor® 488 or 594 (Molecular Probes, Eugen, OR) were added to slides, before incubation in a dark room for 1h at room temperature. The actin cytoskeleton was observed after incubation with phalloidin coupled with AlexaFluor 488 for 5 minutes, and the nucleus after incubation with DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2,6-diamidino-2-phenylindone) for 10 minutes. Slides were mounted and sealed in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). Observations were performed with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CDD camera (ORCA-ER Hamamatsu Photonics).

2.6 Detection of the anoikis process

The cells were treated for 48 or 72h with 2, 10, 20, 50 and 100 μM of endosulfan. Then, the culture media containing floating cells were collected, centrifuged, and pellets

reseeded into new 6-well plates with DMEM supplemented with 5% FBS. This protocol is designed to test the ability of cells to adhere in the absence of endosulfan. Eighteen days later, the MTT viability test was performed to estimate the number of non-adhering cells from the observed population of adhering cells.

Secondly, to determine the level of anoikis, 2×10^5 cells were cultured as a suspension on plates coated with (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA) (Sigma) for the indicated periods of time. Apoptotic cells were then estimated by enzymatic assay using caspase-3 activity as a marker of apoptosis.

2.7 Enzymatic assays for caspase activity

Caspase activity was assessed by measuring fluorophore (7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (AFC)) release from caspase tetrapeptide substrate *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp (Ac-DEVD) for caspases-3-like activity. Briefly, cells grown in 6-well culture dishes were scraped into ice-cold hypotonic buffer. Cells were then lysed by being subjected to three cycles of freezing and thawing. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and equal amounts were mixed with buffer B (312.5mM HEPES, pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3125% CHAPS, 50 μ M of relative substrate enzymes). The fluorometric assay detected the shift in AFC fluorescence emission following cleavage from tetrapeptide-AFC, as measured in a fluorometer ($\lambda_{ex} = 390$ nm; $\lambda_{em} = 530$ nm).

2.8 Western blot

HepG2 cells were scraped into hypotonic buffer (20mM HEPES pH7.5, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.25mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 10 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml leupeptin, and the phosphatase inhibitory cocktail PhosphoSTOP, Roche-). The protein concentration in each cell lysate was quantified using a BCA Protein Assay Kit (Pierce), with bovine serum albumin (BSA) used as a standard. Equal protein amounts were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels and were transferred to PVDF membranes. The membranes were immunoblotted with antibodies (Table 1) for 1h at room temperature or overnight at 4°C. After washing, membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G; Promega, Madison, WI, USA) for 1 h at room temperature.

After washing, the signals were detected using Immobilon Western Detection Reagents (Millipore, Molsheim, France) and acquired using a CCD camera (ChemiGenius2, SynGene).

2.9 Reverse transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using acid phenol extraction. One microgram of total RNA was reverse transcribed using a kit (SuperScript II; Invitrogen Corp, Carlsbad, California) following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR analysis was carried out with LightCycler®480 Probes Master (Roche), according to the manufacturer's instructions, together with FAM-labeled hydrolysis probes from the Universal Human Probe Library Set (Roche). Intron-spanning primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center software. Calculations were made using *gapdh* as the endogenous control reference gene. Fold differences in gene expression were calculated using the LightCycler software, taking into account the efficiency of amplification as determined from a standard curve obtained with the second-derivative maximum method.

2.10 Cell migration assay

At 90 % confluence HepG2 cells were trypsinized and 3×10^6 of cells per well were added to a 6 well plate. After 24h of incubation, the confluent tissue formed was scratched 4 times per well with a sterile pipette tip. Cells were washed twice with PBS medium before being treated with 0.25% DMSO or 20 μ M endosulfan in a DMEM medium depleted with 5% FBS. Images were taken immediately (0 h) with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CDD camera (ORCA-ER Hamamatsu Photonics) and NIS-Elements AR 2.30 software at 4x magnification. 24 hours later, the cell migration progress was photographed in the same conditions and all data were treated with the TScratch software tool developed for automated analysis of monolayer wound healing assays as described by T.Gebäck et al., 2009.

2.11 Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times. Data shown are an average \pm standard deviation (SD). Statistical analysis of *in vitro* studies was performed using a Student's t test. Levels of probability are indicated as *P<0.05 or **P<0.01.

3. Results

3.1 Morphological changes in HepG2 cells after endosulfan treatment

To assess the effect of endosulfan on hepatoma cells, HepG2 cells were treated with increasing concentrations of the organochlorine pesticide. Viability was evaluated by MTT dye reduction assay after 24, 48 and 72h of treatment or by measuring cellular impedance in real-time. As shown in Fig.1, endosulfan decreased HepG2 viability in a dose- and time-dependent manner. Cytotoxicity occurred within 72 h following 50 μM endosulfan and peaked after 100 μM ($\text{IC}_{50} = 68.9 \mu\text{M}$ after 72h treatment).

Results obtained with the xCELLigence system do not allow the determination of IC_{50} values. Indeed, this technology is a non-invasive cytotoxicity assay that is based on the measurement of impedance in real time (cell index values). This parameter reflects the cellular status with regards to such as cell proliferation, variations in cell membrane integrity, cytotoxicity, cell adhesion and spreading, cell migration, etc. Fig. 1B depicts the dynamic changes in Cell Index (CI) values of cells after exposure to different concentrations of endosulfan. At 100 and 200 μM , endosulfan lead to a slight decline in the cell survival rate but failed to induce 100% mortality. At lower concentrations, a significant increase in the slope corresponding to the evolution of cell index over time was observed (Fig. 1B and C). This phenomenon could be explained by morphological changes correlating with defects in cell adhesion or migration.

In the control condition (DMSO), HepG2 cells had an epithelial cell-like morphology with a characteristic “cobblestone” appearance and organized cortical pattern of F-actin at cell-to-cell junctions (Fig. 1D). By contrast, HepG2 cells exposed to 20 μM endosulfan treatment exhibited more poorly defined intercellular borders and were more often spherical and individualized (arrows). These modifications correlated with the reduced organization of F-actin into a cortical pattern at cell-to-cell junctions (Fig. 1D, arrowhead).

These results suggested that endosulfan is toxic at high concentrations (>50 μM) but that lower doses could nevertheless induce phenotypic modifications.

3.2 Endosulfan sensitizes HepG2 cells to anoikis

Based upon our morphological findings, we sought to evaluate whether endosulfan affected cell death processes. We observed that nuclei from individualized cells after exposure

to 20 and 50 μM endosulfan were condensed and fragmented, as shown by DAPI staining (Fig. 2A). Moreover, when these floating cells were replated in tissue culture dishes after 48 h or 72 h in suspension, they displayed the ability to attach and proliferate (Fig. 2B). Indeed, 18 days after having replated the cells, MTT test showed that the floating cells obtained after endosulfan treatment ($<50\mu\text{M}$) had grown in a time- and dose-dependent manner. However, at high concentrations (50 and 100 μM), the number of living floating cells seemed to be too low, as demonstrated by the low viability rate obtained after replating (Fig. 2C). Hence, these results suggest that the process leading to their individualization is reversible. We firstly investigated the effect of endosulfan on caspase-3 activity levels (as a marker of apoptosis) in both the adherent and the floating cells after 48h endosulfan treatment (Fig. 3A). The caspase-3 activity remained stable in the HepG2 cells of the monolayer, whereas it increased significantly in the floating cells at concentrations $\geq 10 \mu\text{M}$ (400-450 % of activation / DMSO). Secondly, to investigate whether prevention of attachment was the main cause of cell death induced by endosulfan, HepG2 cells were cultured on poly-HEMA (+ poly-HEMA), which prevented cells from attaching. The cells responded with a significant induction of caspase-3 activity when exposed to 20 or 50 μM endosulfan for 4 h and 24 h, but not with DMSO or when kept under adherent conditions (- Poly-HEMA). However, this increased caspase-3 activity seemed to be transient, as it was not observed after 48 h treatment (data not shown). Moreover, after 24h endosulfan treatment (20 μM) we observed an induction of the gene encoding X-linked inhibitor of apoptosis (*XIAP*), the endogenous caspase-3 and -7 inhibitor. Thus, endosulfan initially sensitized the HepG2 cells to anoikis yet permitted the restoration of intrinsic anoikis resistance later on.

Taken together, these findings demonstrate that endosulfan may induce anoikis in HepG2 cells, probably via disruption of cell attachment.

3.3 Endosulfan induces changes in the cytoskeleton and ECM associated with the activation of Fak signaling and potential destabilization of adherent junctions

We therefore investigated whether endosulfan can perturb cellular adhesion by studying changes in the expression of proteins implicated in the modification of the actin cytoskeleton of HepG2 cells exposed to endosulfan. We examined the localization and expression of the Rho-associated Kinase (ROCK1), a well-known effector of the RhoGTPases implicated in lamelliopodia and stress fiber formation during cytoskeleton

remodeling (Schaller et al., 2010). As demonstrated by immunofluorescence (Fig. 4A), the cellular localization of ROCK1 was modified after 48h of treatment with 20 μ M endosulfan. Indeed, in the control condition (DMSO), ROCK1 was mainly colocalized with actin leading to a cortical pattern at cell-to-cell junctions, whereas in the presence of endosulfan, this protein was distributed uniquely throughout the cytoplasm. We also examined the protein levels of ROCK1 by western blot analysis. After endosulfan treatment, the expression of this protein was up-regulated in a time-dependent manner (Fig. 4B).

Focal Adhesion Kinase (FAK) signaling was also implicated in the control of the actin cytoskeleton organization. Indeed, FAK mediates cells motility and adhesion turnover through regulation of the RhoGTPases and ROCK activity (K. Riento and A. J. Ridley, 2003). We found that endosulfan increased the phosphorylation of FAK at Tyr 925 in a time-dependent manner as soon as 8h of endosulfan treatment (Fig. 4C). The phosphorylation of the Tyr-925 residue leads to cell migration and cell protrusion (Deramaudt et al., 2010). Extracellular matrix (ECM) remodeling is a major phenotypic modification observed during cell motility and migration. Fibronectin, a high-molecular weight glycoprotein, serves as a scaffold for the fibrillar ECM. We therefore analyzed fibronectin levels by western blotting and immunofluorescence studies. Immunofluorescence analysis showed an important increase of fibronectin in the cytoplasm of HepG2 cells after 48 h of endosulfan treatment (Fig. 4D). These findings are consistent with the up-regulation of fibronectin detected by western blot (Fig. 4E). It is worth noting that the protein level of fibronectin was increased after 30 minutes of endosulfan treatment and peaked after about 60 minutes. Moreover, fibronectin was deposited as fibrils (Fig. 4F) in the extracellular compartment, 48 h after endosulfan exposure. Interestingly, endosulfan did not increase the gene expression of *Itga5*, corresponding to the $\alpha 5$ chain of the fibronectin receptor integrin $\alpha 5\beta 1$ (data not shown). This integrin is the main receptor of fibronectin allowing cells to migrate. Together, these results show that endosulfan induced cytoskeleton remodeling and a modification of the ECM composition.

3.4 Loss of adherent junctions through E-cadherin repression: possible involvement of the repressors Snail and Slug.

To further confirm the effect of endosulfan on cell adhesion, we investigated E-cadherin gene and protein expression levels in HepG2 cells exposed to endosulfan. Endosulfan significantly decreased the protein levels of E-cadherin after 24h and 72h of

endosulfan treatment (Fig. 5A). Moreover, E-cadherin mRNA expression was decreased by approximately 50% after 48h endosulfan treatment (Fig. 5B). These data suggested that E-cadherin expression is repressed in HepG2 cells at the transcriptional level after endosulfan exposure. Hence, we sought to determine the expression and the localization of Snail and Slug, two direct repressors of E-cadherin transcription. We found that endosulfan increased Slug and Snail mRNA after 24 h and 48 h, respectively (Fig. 5C). Concomitantly, we observed a nuclear translocation of these two factors into the nucleus of HepG2 cells treated with endosulfan (Fig. 5D).

Since a decrease in levels of E-cadherin is a widely accepted characteristic associated with EMT, we wondered whether endosulfan could activate this process.

3.5 Endosulfan induces stabilization and nuclear translocation of β -catenin

During EMT, loss of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion destabilizes the β -catenin interaction with actin cytoskeleton and can promote its activation. Accordingly, we sought to evaluate whether endosulfan could act on the β -catenin signaling pathway (Clevers, 2006).

After endosulfan treatment, the protein level of β -catenin increased in a time-dependent manner (Fig. 6A) without significant modulation of its gene expression (Fig. 6B). This protein stabilization occurred together with the nuclear translocation of β -catenin after 48h endosulfan treatment, as shown by immunofluorescence imaging in Fig. 6C. Once in the nucleus, β -catenin binds with transcription factors, such as LEF/TCF, to activate different target genes, such as *LEF1*, *TCF-1*, *MMP-7* or *CCND1* (*cyclin-D1*) (J. Roose et al., 1999; V. J. Wielenga et al., 1999; T. Brabletz et al., 1999; O. Tetsu and F. McCormick, 1999). Endosulfan increased in a time-dependent manner the protein level of LEF1/TCF-1 when compared to the DMSO condition (Fig. 6D). Moreover, we found that endosulfan up-regulated both *MMP-7* and *CCND1* at the mRNA level after 48h treatment.

These results suggest that endosulfan activates the WNT/ β -catenin signaling pathway.

3.6 Endosulfan induces gain of the mesenchymal markers S100a4 and vimentin but does not confer the ability to migrate.

EMT is characterized by loss of epithelial and gain of mesenchymal markers. Consequently, we investigated the effect of endosulfan on the expression of S100a4, a marker

of hepatocytes undergoing EMT, and vimentin, an intermediate filament protein normally found in cells of mesenchymal origin.

As demonstrated by real-time PCR, endosulfan increased transiently S100a4 gene expression, as soon as 4 h and peaked after 24 h endosulfan treatment (Fig. 7A). Moreover, we observed increased amounts of vimentin in the cytoplasm of HepG2 cells exposed to endosulfan (Fig. 7B).

These results would suggest that endosulfan leads to a conversion of HepG2 cells to a mesenchymal phenotype with the capacity to migrate. Yet, wound-healing assays revealed no significant increase in wound closure after 24 h or 48 h endosulfan treatment when compared to the DMSO condition (Fig. 7C).

Thus although endosulfan is able to induce major changes with regards to the expression of epithelial characteristics, it does not confer migration properties and therefore appears to induce a partial or incomplete EMT in HepG2 cells.

4. Discussion

In this study, we have shown that endosulfan transiently sensitizes HepG2 cells to anoikis, disrupts the epithelial phenotype of HepG2 and induces a partial EMT process. Anoikis is defined as cell death induced by inappropriate or loss of cell adhesion (Frish and Francis, 1994; Meredith et al., 1993). HepG2 carcinoma cells are resistant to anoikis but after endosulfan treatment we observed an induction of caspase-3 activity in poly-HEMA culture within the first 24 hours. After that, cells recovered their resistance to anoikis as shown by increased XIAP mRNA levels. This endogenous caspase inhibitor protein has been shown to contribute to the anoikis resistance of various carcinoma cells (Berezovskaya et al., 2005; Liu et al., 2006). Hence, overexpression of XIAP in cancer cells is linked to their increased resistance to apoptosis and the expression level reflects apoptosis sensitivity (Shi et al., 2008). Acquisition of anoikis resistance is a likely prerequisite for tumor cells to successfully metastasize to distant sites (Liotta and Kohn, 2004). The loss of cellular contact with the basement membrane constitutes the starting point of the onset of anoikis. This cell-ECM interaction is monitored by integrins that bind to diverse ECM molecules and respond by triggering an intracellular cascade via SRC and FAK kinases. We found that endosulfan increases the phosphorylation of FAK at the Tyr 925 residue, an event likely to contribute towards the activation of downstream signaling events including the Rho GTPase pathway. This sustained phosphorylation of FAK after endosulfan exposure correlated with the overexpression and relocalization of the cytoskeletal RhoGTPase proteins (data not shown) and their main effector ROCK1. This cascade has been linked to cancer cell migration/invasion during metastasis via the control of cytoskeletal remodeling (*D. Yamazaki et al., 2005*). FAK is a major protein of the focal adhesion complex that integrates signals from growth factors and integrins to control ECM interactions, migration and invasion (Mitra et al., 2005). This family of kinases was linked to tumor invasiveness and their expression and/or activation is frequently associated with metastatic tumors (Gabarra-Niecko et al., 2003; McLean et al., 2005). Notably, in parallel to FAK phosphorylation, we found an up-regulation of fibronectin, a major protein that serves as a scaffold for the fibrillar ECM. All these events occurred in parallel to a rearrangement of the F-actin cytoskeleton with formation of stress fibers in endosulfan-treated cells. This phenomenon has already been described during cellular stress and cell migration (*T. D. Pollard and G. G. Borisy, 2003*). Thus, endosulfan appears to structurally reorganize the cytoskeleton and to modify the ECM composition. These changes

were accompanied by phenotypical modifications such as those observed during cell dedifferentiation (F. Van Zijl *et al.*, 2009).

The EMT process has been shown to tightly correlate with anoikis resistance (Klymkowsky and Savagner, 2009; Smit *et al.*, 2009). Genes that drive EMT (such as Snail, Slug, ZEB1/2, and Twist) frequently down-regulate E-cadherin and confer anoikis resistance. Indeed, it has been demonstrated that the loss of E-cadherin is a major landmark in the progression of EMT, and confers to epithelial cells a resistance to anoikis (Fouquet *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011). During EMT, loss of anchorage is a critical event required for cell migration (M. Yilmaz and G. Christofori, 2010). We observed a repression of E-cadherin from 24 h of endosulfan treatment, coinciding with the time at which the basal anoikis resistance status was observed. Consistently with these results, we found that endosulfan could both overexpress and activate the E-cadherin repressors Snail1 and Slug, two important factors for EMT induction (K. Polyak and R. A. Weinberg, 2009). The Snail family members are most widely recognized as suppressors of E-cadherin expression and regulate other aspects of the EMT phenotype, such as increased expression of fibronectin and protection from cell death (Zeisberg and Neilson, 2009). The disruption of E-cadherin-mediated adhesion is thought to be a key step in the progression of hepatocarcinoma (Behrens *et al.*, 1993; Takeichi, 1993; Christofori and Semb, 1999). Indeed, E-cadherin downregulation in HCC is associated with increased tumor size, low levels of histological differentiation, invasion recurrence, metastasis and poor prognosis (Kozyraki *et al.*, 1996; Yang and Weinberg, 2008).

We also observed a stabilization of the β -catenin protein and its translocation to the nucleus in HepG2 cells treated with endosulfan. E-cadherin repression led to its disappearance from the intercellular junctions and to the release of β -catenin into the cytoplasm. The membrane-unbound β -catenin is usually phosphorylated by a complex responsible for its degradation through the ubiquitin-proteasome system (Cowin *et al.*, 2005; Peifer and Polakis, 2000). Docking of the Wnt ligand to its Frizzled (Fz) receptor triggers activation of the canonical Wnt pathway and allows β -catenin to accumulate in the cytoplasm and translocate to the nucleus. There it functions as a cofactor for members of the Tcf/Lef family of transcription factors, which further activate the transcription of important genes, such as *TCF-1*, *MMP-7*, *S100a4* or *fibronectin* (Papkoff *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Behrens *et al.*, 1996; M. Yilmaz *et al.*, 2009). Increased levels of the gene *CCND1* encoding the protein cyclin D1 is correlated with tumor progression and metastasis recurrence in HCC (L. X. Qin *et al.*, 2004) and it is also used as a marker of fibrosis (M. Guarino *et al.*, 2009). MMP-7 (matrix metallo-proteinase-7) and fibronectin are both proteins implicated in cancer cell invasion and

metastasis (*Q. Gao et al., 2011; A. Bianchi et al., 2010*). Concordantly, we found that the stabilization of β -catenin in the nucleus after endosulfan exposure was associated with the overexpression of *S100a4*, *MMP-7*, *fibronectin* and *CCND1*.

In addition to an increased expression of mesenchymal markers such as S100a4, MMP-7 and fibronectin, endosulfan also increased the expression of the most commonly used EMT biomarker vimentin. Though normally present in mesenchymal cells, vimentin may also be found in metastatic cells after EMT (*A. Satelli and S. Li, 2011*) or in epithelial cells in response to a cellular stress (*M. Zeisberg et al., 2009*).

We found that endosulfan induced an EMT-like event characterized by the loss of E-cadherin expression, modulation of the cytoskeletal architecture, synthesis of mesenchymal markers and resistance to anoikis. However, despite fulfilling all the required modifications, cells exposed to endosulfan failed to migrate. Many processes involving the transient loss of epithelial features without full acquisition of mesenchymal characteristics have been described as occurring both during development and in adult organisms (*Grunert et al., 2003; M. A. Huber et al., 2005*). Such a metastable phenotype can lead to the simultaneous expression of epithelial and mesenchymal markers. For example, E-cadherin, β -catenin, cytokeratin and vimentin co-expression has been described in edge cells during avian epiboly (*Futterman et al., 2011*). We found that endosulfan induced an EMT-like event that occurred without cell migration, as demonstrated by the inefficiency of this pesticide at accelerating wound closure in a HepG2 monolayer. Cell motility involves the integration of diverse biophysical processes including the dynamic formation and disruption of cell substratum attachments along with the extension of membrane protrusions. Notably, we observed that endosulfan increased the synthesis and the deposition of fibronectin in the extracellular medium. However, we observed no increase in the gene expression of the fibronectin receptor *itga5*. This gene mediates cell adhesion and migration on fibronectin. One possible mechanism underlying this failure of the cells to migrate despite the observed endosulfan induced EMT-like phenotype, could be a change in the synthesis of basement membrane constituents. We hypothesized that this failure to migrate occurred due to inadequate ECM composition and attachment (*P. Chiarugi and E. Giannoni et al., 2008*). However, the use of collagen, fibronectin and poly-L-lysine coating (data not shown) failed to induce cell motility. Among other proteins, integrins play a key role in cell adhesion and migration processes. These heterodimeric membrane-spanning receptors are the drivers of cell migration allowing a physical linkage between the actin cytoskeleton and ECM (*Vicente-Manzanares et al.,*

2009). We can suppose that disruption of integrin synthesis and/or signaling could account for the incapacity of endosulfan-exposed cells to migrate.

For the first time, we have highlighted the potential carcinogenic effect of endosulfan *in vitro* using EMT biomarkers also used *in vivo* on liver. We have shown that this organochlorine pesticide could induce both cellular and molecular changes which could lead to liver damage and cancer aggravation.

Legends to figures

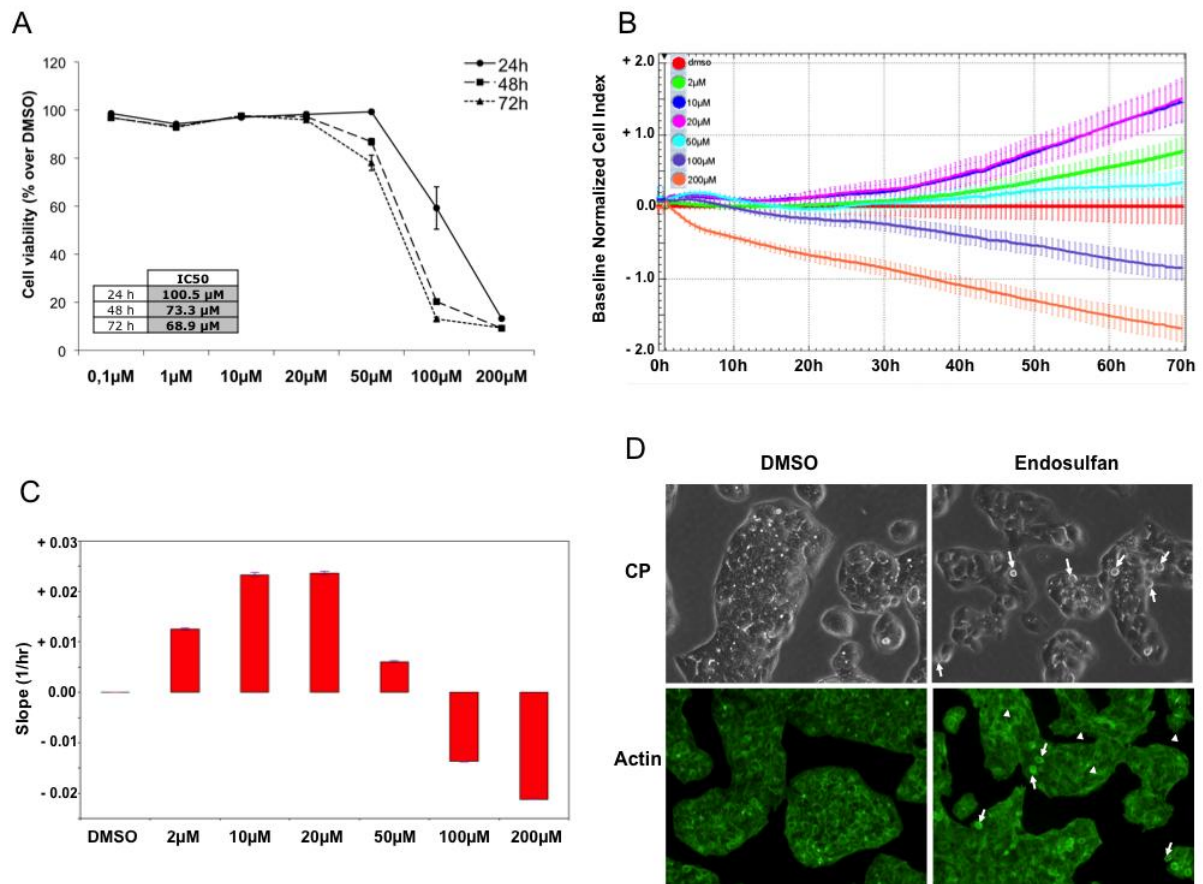


Figure 1: Endosulfan modifies the HepG2 cell morphology. A, HepG2 cell viability was assessed by MTT test after 24 h, 48 h and 72 h treatment with increasing concentrations of endosulfan (from 0.1 µM to 200 µM). MTT results are presented as a percentage of viability over DMSO treatment and each value is the mean \pm S.D. of three separate experiments (note: means \pm S.D., * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ when compared to DMSO). B and C, Cells were seeded onto 96-well E-plates and treated for 24 h with endosulfan (from 2, 10, 20, 50, 100 and 200 µM). Cell impedance was measured in real-time and cell index normalized against the DMSO condition. Results are means \pm S.D. for triplicates of one experiment and are representative of three independent experiments. D, 48 h after 20 µM endosulfan treatment, cell morphology was examined under a light microscope. F-actin was visualized by AlexaFluor 488-conjugated phalloidin staining (green) and fluorescence microscopy.

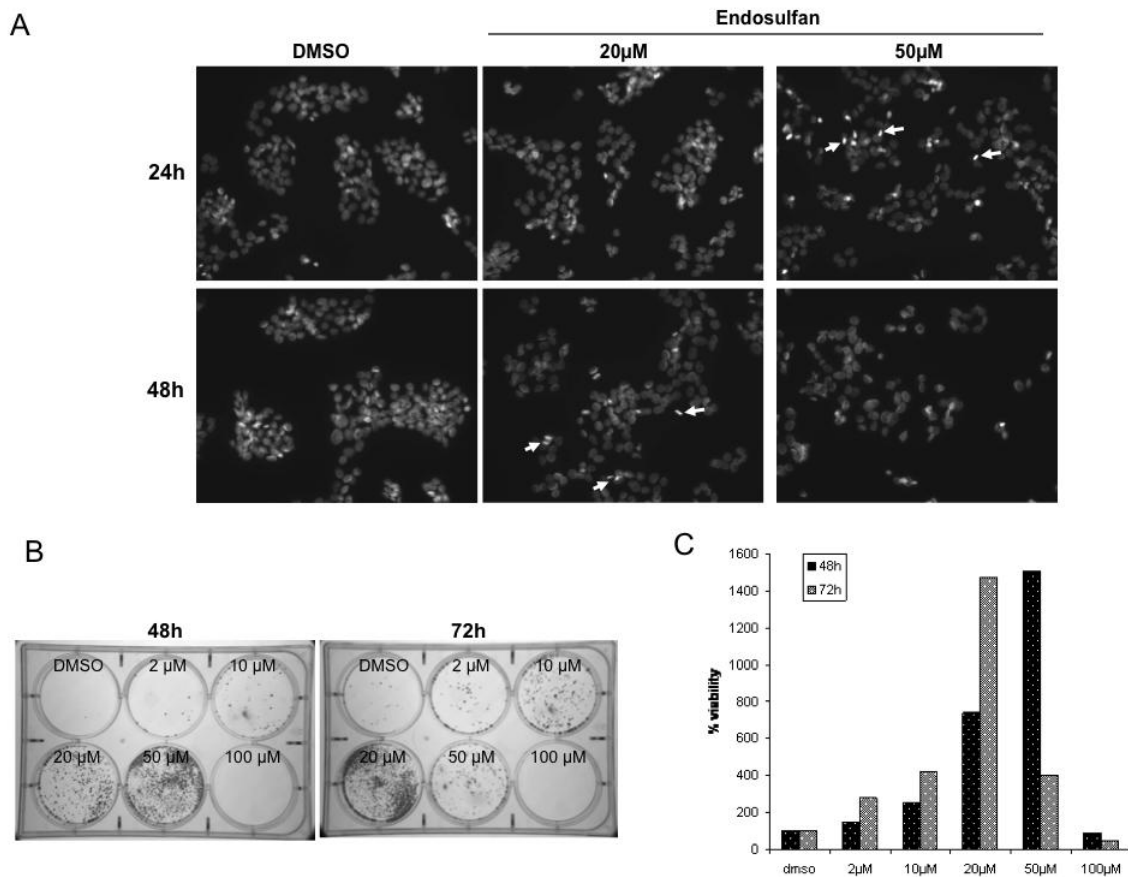


Figure 2: Effects of endosulfan on adherence, viability and nuclear condensation of HepG2 cells. A, Nuclear morphology was observed by DAPI staining after 24 h and 48 h of DMSO (0.25%) or endosulfan treatments (20 and 50 μ M). Arrows indicate apoptotic nuclei from non-adherent cells after endosulfan treatment. The results shown are representative of three separate experiments. B and C, Floating cells obtained after 48 h or 72 h of 20 μ M endosulfan exposure were replated in 6-well plates as described in the material and methods section. 18 days after plating, pictures were taken (B) and cell viability was measured by MTT test (C).

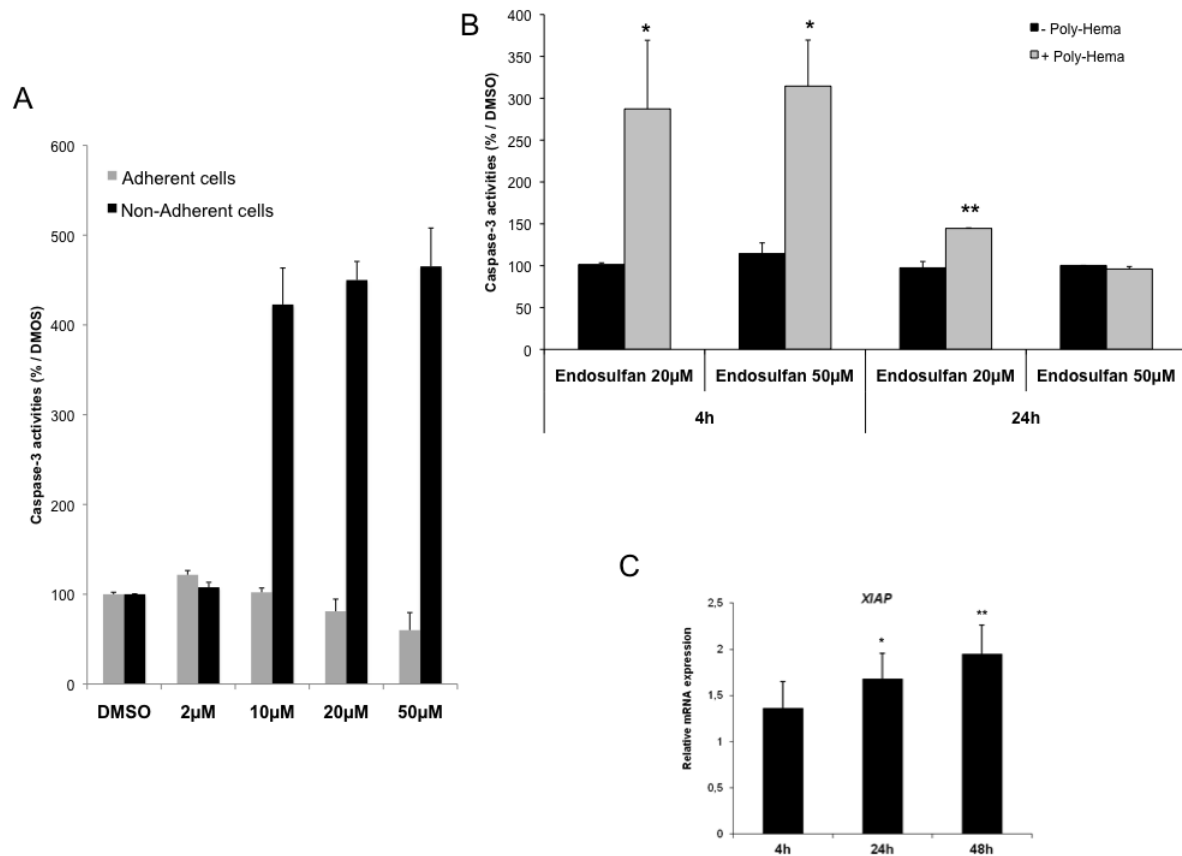


Figure 3: Induction of anoikis by endosulfan treatment. A and B, HepG2 were exposed to increased concentrations of endosulfan (from 2 to 50 μ M) for 48 h. Caspase-3 activities were assayed as described in the experimental procedures in either adherent cells of the cell monolayer or in floating cells (non-adherent cells) (A). B, HepG2 cells were cultured overnight either adherent (- Poly-HEMA) or suspended on poly-HEMA-coated plates (+ Poly-HEMA) and received endosulfan (20 or 50 μ M) for 4, 24 or 48 h before measuring caspase-3 activity. A and B, Results are expressed as a percentage of the value obtained for DMSO-treated cells, set at 100%. Data are means \pm SD for four separate experiments. Caspase-3 activities were assayed as described in the experimental procedures. C, *XIAP* mRNA level was assessed by real-time RT-PCR after 4, 24 and 48 h of 20 μ M endosulfan treatment. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. Note: $P > 0.05$ and ** $P > 0.01$.

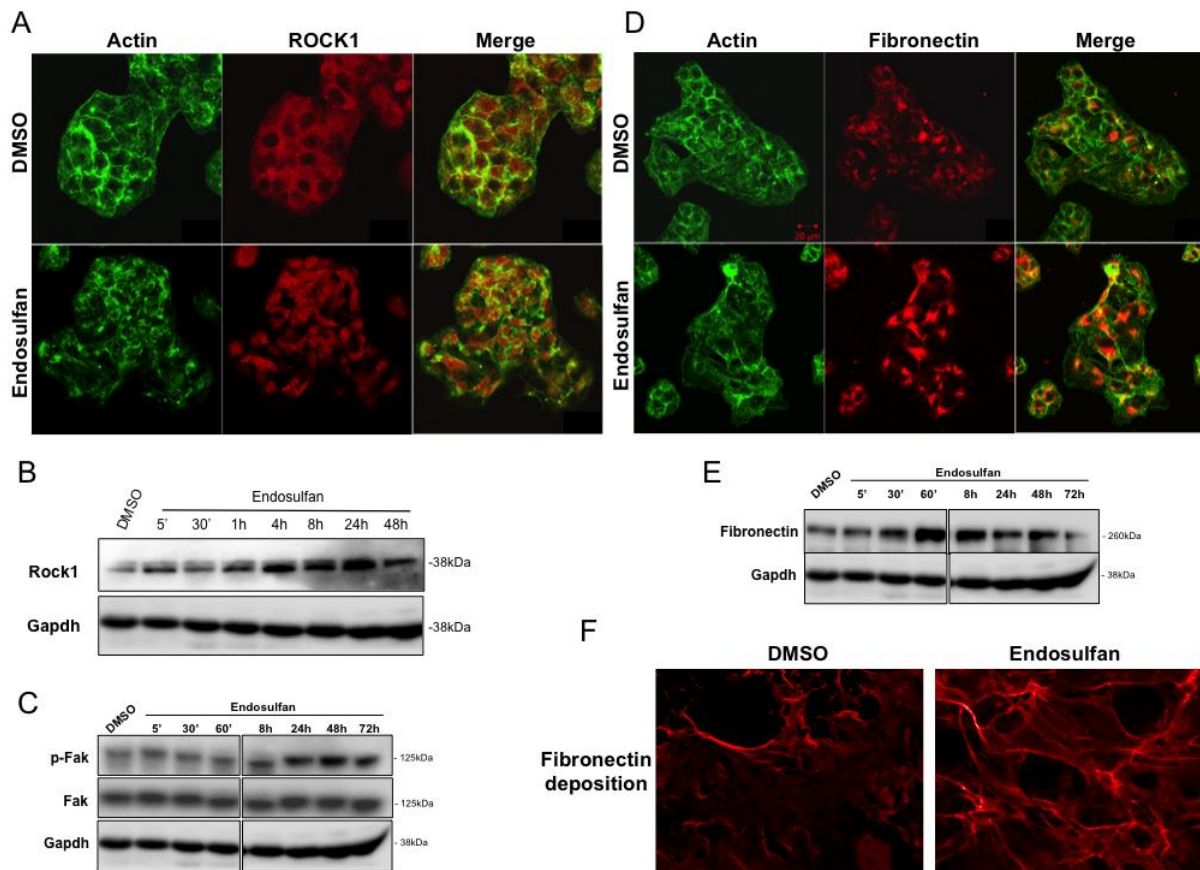


Figure 4: Endosulfan perturbs the cytoskeleton in HepG2 cells. A and B, Cells were grown on coverslips and treated either with DMSO (0.25%) or 20 μ M endosulfan. 48 h later, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence for the detection of actin (A and B, green), ROCK1 (A, red) and fibronectin (B, red). Colocalization was indicated by the yellow color in the merged image. Representative of three separate experiments. C and D, HepG2 cells were treated with 20 μ M endosulfan. At the indicated time, cells were lysed and protein levels of fibronectin, phospho-Fak, Fak (C) and phospho-P120 (D) analyzed by western blotting. As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against Gapdh. The western results are representative of three independent repeats for each experiment.

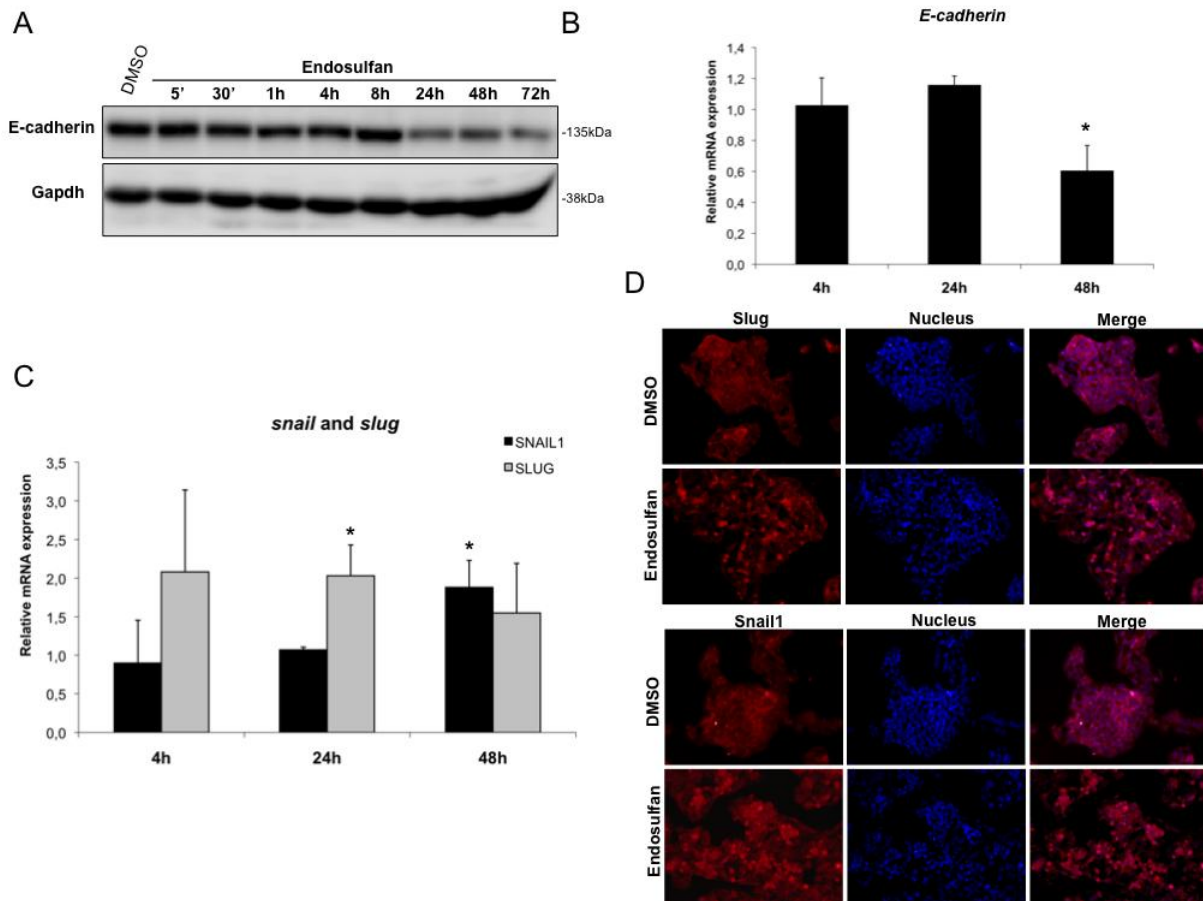


Figure 5: Endosulfan represses E-cadherin expression. A and C, E-cadherin (*CDH1*), Snail and Slug mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 4, 24 and 48 h of 20 μ M endosulfan treatment. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. B, At the indicated time, cells were lysed and E-cadherin protein levels were assessed by western blotting. B, Band intensities were assessed by densitometry after image acquisition with a CCD camera and the results are presented as the ratio of Gapdh-normalized results for treated cells to those for DMSO-treated cells (means \pm SD for three experiments). D, After 48h exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of slug or snail (red) and visualization of nuclei (DAPI, blue). The results shown are representative of three separate experiments. * P <0.05 and ** P <0.01.

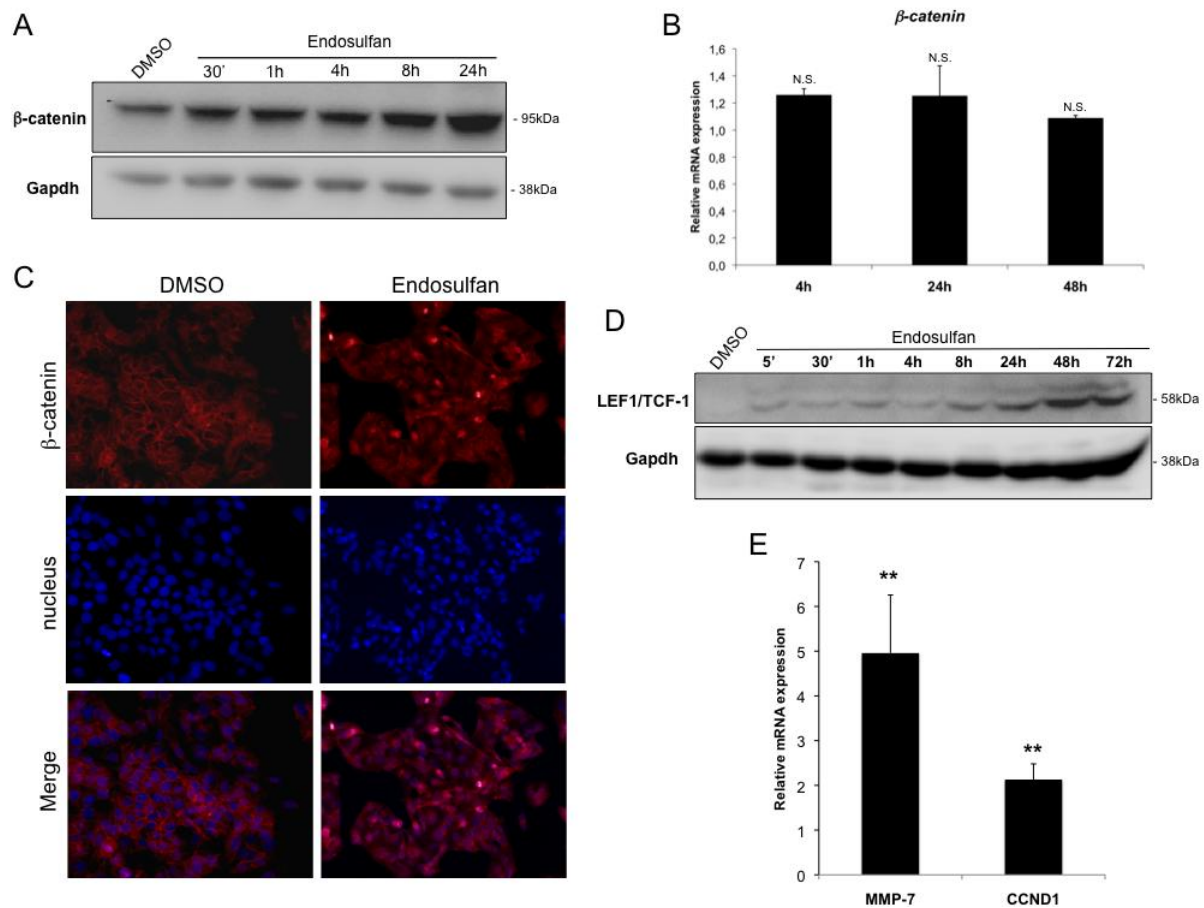


Figure 6: Endosulfan promotes activation of the β -catenin pathway. A and D, Cells were exposed to 20 μ M endosulfan. At the indicated time, cells were lysed and subjected to western blot for the detection of β -catenin (A) and LEF1/TCF-1 (D). As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against Gapdh. B, β -catenin mRNA level was assessed by real-time RT-PCR after 4, 24 and 48 h of 20 μ M endosulfan treatment. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. C, HepG2 cells were grown on coverslips and treated with 20 μ M endosulfan for 48 h. After exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of β -catenin (red) and visualization of nuclei (DAPI, blue). Colocalization is indicated by purple in the merged image. Note: N.S., Non specific.

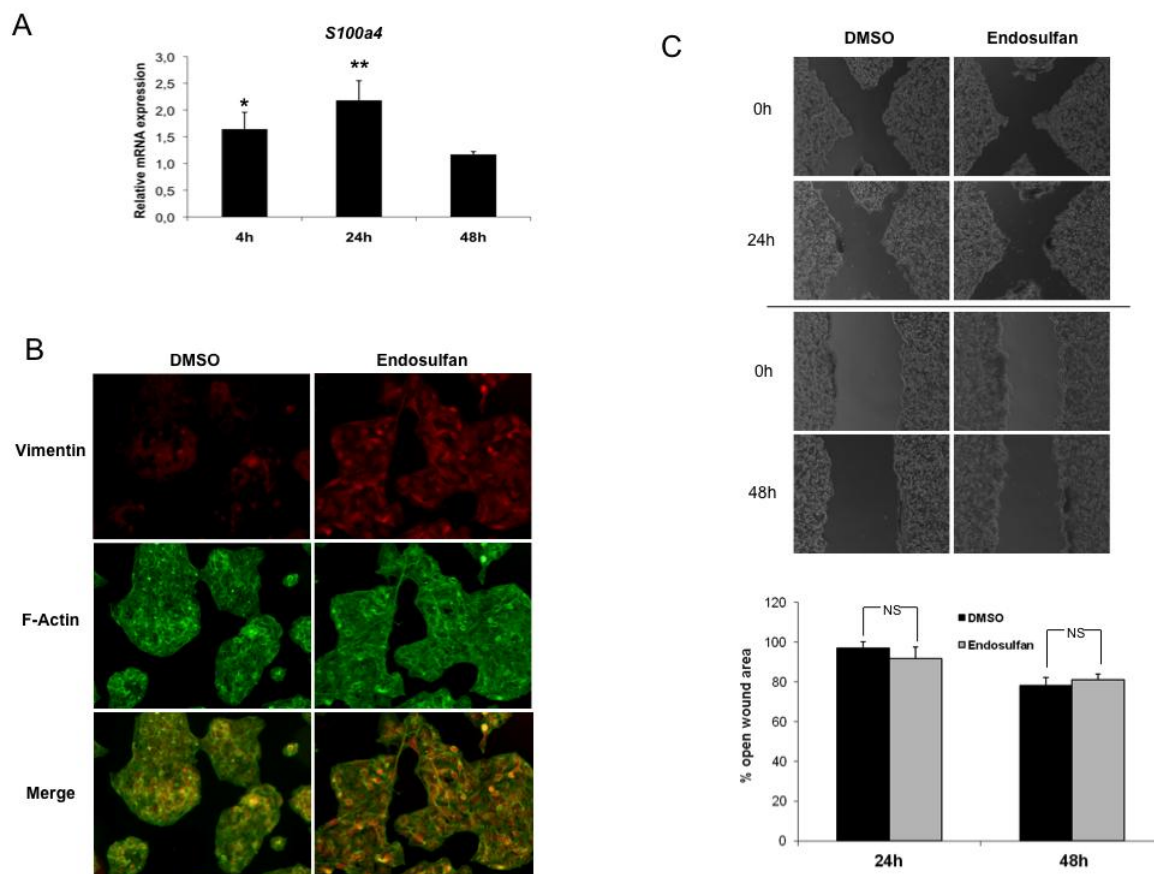


Figure 7: Endosulfan induces “mesenchymal” markers but fails to induce cell migration. A, *FSP1* mRNA level was assessed by real-time RT-PCR after 4, 24 and 48 h of 20 μ M endosulfan treatment. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. B, Cells were grown on coverslips and treated either with DMSO (0.25%) or with 20 μ M endosulfan. 48 h later, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence for the detection of vimentin (red) and visualization of the actin cytoskeleton (phalloidin, green) and nuclei (DAPI, blue). Colocalization was revealed in the merged image. C, The subconfluent HepG2 cells were wounded 48 h after plating and exposed to DMSO (0.25 %) or endosulfan. Images were obtained 24 h or 48 h after treatment. Percentages of open wound area at 24 h and 48 h, in each set of conditions, were plotted, with wound width normalized with respect to the initial value at 0 h. Note: N.S., Non specific.

Acknowledgments: The authors received a Public Institutional Funding from INRA and the French National Research Agency (ANR “ONCOPOP” 06SEST26). We gratefully acknowledge R. Barouki and X. Coumoul for helpful scientific discussion.

Conflict of interest: The authors declare to have no conflict of interests.

Highlights: endosulfan induces partial epithelial mesenchymal transition. Endosulfan permits a transient anoikis induction. HepG2 cells remain unable to acquire a motile phenotype after endosulfan treatment.

References

Aggarwal, M., Narahariseti, S.B., Dandapat, S., Degen, G.H. and Malik, J.K. (2008) Perturbations in immune responses induced by concurrent subchronic exposure to arsenic and endosulfan. *Toxicology* 251, 51-60.

Ahmed, T., Pathak, R., Mustafa, M.D., Kar, R., Tripathi, A.K., Ahmed, R.S. and Banerjee, B.D. (2011) Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin on pesticide-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ Monit Assess* 179, 293-299.

Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A.P., Lenormand, P., Caron, J.C. and Rahmani, R. (2007) Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol* 213, 177-186.

Bajpayee, M., Pandey, A.K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., Seth, P.K. and Dhawan, A. (2006) DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ Mol Mutagen* 47, 682-692.

Bedor, C.N., Morais, R.J., Cavalcanti, L.S., Ferreira, J.V. and Pavão, A.C. (2010) Carcinogenic potential of endosulfan and its metabolites based on a quantum chemical model. *Sci Total Environ* 408, 6281-6284.

Behrens, J. (1993) The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 24, 175-184.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Berezovskaya, O., Schimmer, A.D., Glinskii, A.B., Pinilla, C., Hoffman, R.M., Reed, J.C. and Glinsky, G.V. (2005) Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 65, 2378-2386.

Bianchi, A., Gervasi, M.E. and Bakin, A. (2010) Role of β 5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF- β . *Cell Cycle* 9, 1647-1659.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (1999) beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033-1038.

Briz, V., Molina-Molina, J.M., Sánchez-Redondo, S., Fernández, M.F., Grimalt, J.O., Olea, N., Rodríguez-Farré, E. and Suñol, C. (2011) Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicol Sci* 120, 413-427.

Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 118-132.

- Chan, M.P., Morisawa, S., Nakayama, A., Kawamoto, Y. and Yoneda, M. (2006) Development of an in vitro blood-brain barrier model to study the effects of endosulfan on the permeability of tight junctions and a comparative study of the cytotoxic effects of endosulfan on rat and human glial and neuronal cell cultures. *Environ Toxicol* 21, 223-235.
- Chatzizacharias, N.A., Kouraklis, G.P. and Theocharis, S.E. (2008) Clinical significance of FAK expression in human neoplasia. *Histol Histopathol* 23, 629-650.
- Chiarugi, P. and Giannoni, E. (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76, 1352-1364.
- Choudhary, N., Sharma, M., Verma, P. and Joshi, S.C. (2003) Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J Environ Biol* 24, 305-308.
- Christofori, G. and Semb, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Cicchini, C., Laudadio, I., Citarella, F., Corazzari, M., Steindler, C., Conigliaro, A., Fantoni, A., Amicone, L. and Tripodi, M. (2008) TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res* 314, 143-152.
- Cowin, P., Rowlands, T.M. and Hatsell, S.J. (2005) Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 17, 499-508.
- Deramautd, T.B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K. and Rondé, P. (2011) FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell* 22, 964-975.
- Ehrlich, H.P., Sun, B., Sagers, G.C. and Kromath, F. (2006) Gap junction communications influence upon fibroblast synthesis of Type I collagen and fibronectin. *J Cell Biochem* 98, 735-743.
- Fouquet, S., Lugo-Martínez, V.H., Chambaz, J., Cardot, P., Pinçon-Raymond, M. and Thenet, S. (2004) [Control of the survival/apoptosis balance by E-cadherin: role in enterocyte anoikis]. *J Soc Biol* 198, 379-383.
- Fransson-Steen, R., Flodström, S. and Wärngård, L. (1992) The insecticide endosulfan and its two stereoisomers promote the growth of altered hepatic foci in rats. *Carcinogenesis* 13, 2299-2303.
- Fransvea, E., Angelotti, U., Antonaci, S. and Giannelli, G. (2008) Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 47, 1557-1566.
- Frisch, S.M. and Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124, 619-626.
- Futterman, M.A., García, A.J. and Zamir, E.A. (2011) Evidence for partial epithelial-to-mesenchymal transition (pEMT) and recruitment of motile blastoderm edge cells during avian epiboly. *Dev Dyn* 240, 1502-1511.

- Gabarra-Niecko, V., Schaller, M.D. and Dunty, J.M. (2003) FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22, 359-374.
- Gao, Q., Wang, X.Y., Qiu, S.J., Zhou, J., Shi, Y.H., Zhang, B.H. and Fan, J. (2011) Tumor stroma reaction-related gene signature predicts clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 102, 1522-1531.
- Grünert, S., Jechlinger, M. and Beug, H. (2003) Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 657-665.
- Guarino, M., Tosoni, A. and Nebuloni, M. (2009) Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 40, 1365-1376.
- Hardell, L. and Eriksson, M. (2003) Is the decline of the increasing incidence of non-Hodgkin lymphoma in Sweden and other countries a result of cancer preventive measures? *Environ Health Perspect* 111, 1704-1706.
- Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Uematsu, R., Matsumura, S., Chatani, F. and Oda, H. (2010) Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome p450 isoforms for genotoxicity examination. *Toxicol Sci* 116, 488-497.
- Huber, M.A., Kraut, N. and Beug, H. (2005a) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Huber, M.A., Kraut, N. and Beug, H. (2005b) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G. and Kemler, R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Høyer, A.P., Gerdes, A.M., Jørgensen, T., Rank, F. and Hartvig, H.B. (2002) Organochlorines, p53 mutations in relation to breast cancer risk and survival. A Danish cohort-nested case-controls study. *Breast Cancer Res Treat* 71, 59-65.
- Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M. and Yura, Y. (2010) Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 37, 1095-1103.
- Jou, J. and Diehl, A.M. (2010) Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 120, 1031-1034.
- Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Karatas, A.D., Aygun, D. and Baydin, A. (2006) Characteristics of endosulfan poisoning: a study of 23 cases. *Singapore Med J* 47, 1030-1032.

- Kim, H., Choi, G.H., Na, D.C., Ahn, E.Y., Kim, G.I., Lee, J.E., Cho, J.Y., Yoo, J.E., Choi, J.S. and Park, Y.N. (2011) Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 54, 1707-1717.
- Klymkowsky, M.W. and Savagner, P. (2009) Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 174, 1588-1593.
- Kozyraki, R., Scoazec, J.Y., Flejou, J.F., D'Errico, A., Bedossa, P., Terris, B., Fiorentino, M., Bringuier, A.F., Grigioni, W.F. and Feldmann, G. (1996) Expression of cadherins and alpha-catenin in primary epithelial tumors of the liver. *Gastroenterology* 110, 1137-1149.
- Kumar, S., Park, S.H., Cieply, B., Schupp, J., Killiam, E., Zhang, F., Rimm, D.L. and Frisch, S.M. (2011) A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 31, 4036-4051.
- Li, D., Liu, J. and Li, J. (2011) Genotoxic evaluation of the insecticide endosulfan based on the induced GADD153-GFP reporter gene expression. *Environ Monit Assess* 176, 251-258.
- Liotta, L.A. and Kohn, E. (2004) Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 430, 973-974.
- Liu, Z., Li, H., Wu, X., Yoo, B.H., Yan, S.R., Stadnyk, A.W., Sasazuki, T., Shirasawa, S., LaCasse, E.C., Korneluk, R.G. and Rosen, K.V. (2006) Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 25, 7680-7690.
- Lopez-Espinosa, M.J., Lopez-Navarrete, E., Rivas, A., Fernandez, M.F., Nogueras, M., Campoy, C., Olea-Serrano, F., Lardelli, P. and Olea, N. (2008) Organochlorine pesticide exposure in children living in southern Spain. *Environ Res* 106, 1-6.
- Matsuo, N., Shiraha, H., Fujikawa, T., Takaoka, N., Ueda, N., Tanaka, S., Nishina, S., Nakanishi, Y., Uemura, M., Takaki, A., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Nouse, K., Yagi, T. and Yamamoto, K. (2009) Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 9, 240.
- McLean, G.W., Carragher, N.O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V.G. and Frame, M.C. (2005) The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 5, 505-515.
- Medici, D., Hay, E.D. and Olsen, B.R. (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* 19, 4875-4887.
- Meredith, J.E., Fazeli, B. and Schwartz, M.A. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4, 953-961.
- Merhi, M., Demur, C., Racaud-Sultan, C., Bertrand, J., Canlet, C., Estrada, F.B. and Gamet-Payraastre, L. (2010) Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* 267, 80-90.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A. and Schlaepfer, D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.

- Moses, V. and Peter, J.V. (2010) Acute intentional toxicity: endosulfan and other organochlorines. *Clin Toxicol (Phila)* 48, 539-544.
- Ogunwobi, O.O. and Liu, C. (2011) Therapeutic and prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition in liver cancers: Insights from experimental models. *Crit Rev Oncol Hematol*.
- Papkoff, J., Rubinfeld, B., Schryver, B. and Polakis, P. (1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 16, 2128-2134.
- Peifer, M. and Polakis, P. (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606-1609.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-428.
- Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.
- Perez-Carreón, J.I., Dargent, C., Merhi, M., Fattel-Fazenda, S., Arce-Popoca, E., Villa-Treviño, S. and Rouimi, P. (2009) Tumor promoting and co-carcinogenic effects in medium-term rat hepatocarcinogenesis are not modified by co-administration of 12 pesticides in mixture at acceptable daily intake. *Food Chem Toxicol* 47, 540-546.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Polyak, K. and Weinberg, R.A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- Qin, L.X. and Tang, Z.Y. (2004) Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 497-513.
- Riento, K. and Ridley, A.J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 446-456.
- Roose, J. and Clevers, H. (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1424, M23-37.
- Ruch, R.J., Fransson, R., Flodstrom, S., Warngard, L. and Klaunig, J.E. (1990) Inhibition of hepatocyte gap junctional intercellular communication by endosulfan, chlordane and heptachlor. *Carcinogenesis* 11, 1097-1101.
- Satelli, A. and Li, S. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 68, 3033-3046.
- Schaller, M.D. (2010) Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123, 1007-1013.

Shi, Y.H., Ding, W.X., Zhou, J., He, J.Y., Xu, Y., Gambotto, A.A., Rabinowich, H., Fan, J. and Yin, X.M. (2008) Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology* 48, 497-507.

Silva, M.H. and Gammon, D. (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86, 1-28.

Smit, M.A., Geiger, T.R., Song, J.Y., Gitelman, I. and Peeper, D.S. (2009) A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol Cell Biol* 29, 3722-3737.

Takeichi, M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5, 806-811.

Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Trosko, J.E. (2011) The gap junction as a "Biological Rosetta Stone": implications of evolution, stem cells to homeostatic regulation of health and disease in the Barker hypothesis. *J Cell Commun Signal* 5, 53-66.

van Zijl, F., Mair, M., Csiszar, A., Schneller, D., Zulehner, G., Huber, H., Eferl, R., Beug, H., Dolznig, H. and Mikulits, W. (2009a) Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge. *Oncogene* 28, 4022-4033.

van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., Machat, G., Grubinger, M., Huber, H. and Mikulits, W. (2009b) Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 5, 1169-1179.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K. and Horwitz, A.R. (2009) Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* 122, 199-206.

Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., Hermanson, M., Hung, H. and Bidleman, T. (2010) Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci Total Environ* 408, 2966-2984.

Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H. and Pals, S.T. (1999) Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154, 515-523.

Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T. (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* 96, 379-386.

Yang, J. and Weinberg, R.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.

Yilmaz, M. and Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.

Zeisberg, M. and Neilson, E.G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429-1437.

Article 3: organochlorine pesticides induce epithelial to mesenchymal transition of human primary cultured hepatocytes

Comme beaucoup de nouvelles molécules de synthèse, les pesticides ont été largement disséminés dans le monde depuis une soixantaine d'années. Parmi eux, on retrouve les pesticides organochlorés (POCs), des biocides utilisés en agriculture depuis la fin de la seconde guerre mondiale pour lutter principalement contre les ravageurs des cultures. Ils ont pour caractéristiques d'être apolaires, persistants, volatiles et bioaccumulables, se retrouvant ainsi le long de la chaîne trophique. Pour ces raisons, ils sont considérés comme des polluants organiques persistants (POPs) d'après la convention de Stockholm de 2001. Leurs propriétés physico-chimiques font de leur présence et de leur usage une problématique majeure en termes d'environnement et de santé publique. Car nous sommes très largement exposés à ces composés chimiques, en particulier via notre alimentation. D'après un rapport européen de 2007, et pour illustrer ce point, le pourcentage d'échantillons (légumes, fruits et légumes) sur lesquels ont été retrouvés des résidus de pesticides a été augmenté de 15 à 25% entre 1997 et 2007. D'autres études rapportent que les POCs sont, de manière générale, capables d'induire une toxicité aiguë (ophtalmique, cutanée, neurologique...) et chronique (hépatotoxicité, tératogénèse, cancérogénèse...) chez les mammifères dont l'homme. Mais les données épidémiologiques restent insuffisantes à ce jour alors qu'en parallèle, des études indiquent qu'ils pourraient agir sur les processus de tumorigénèse. Or les phases tardives s'accompagnent généralement de l'acquisition de capacités migratoires et invasives. Elles conduisent à la formation de métastases. Un processus, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), est capable de rendre compte de ces modifications phénotypiques pouvant expliquer la perte des caractères épithéliaux originaux. Afin de mieux comprendre les impacts des POP sur les mécanismes de tumorigénèse, nous nous sommes penchés pour ce projet financé par l'agence française de recherche (ANR ONCOPOP), sur 3 pesticides organochlorés : le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), l'heptachlore et l'endosulfan.

Le DDT est un insecticide de contact à large spectre, persistant et bon marché. De 1946 à 1972, il était l'insecticide agricole le plus largement utilisé dans le monde. Il servait à la lutte contre les insectes dans les jardins, les vergers, les cultures agricoles et les forêts, ainsi que pour limiter les populations d'insectes hématophages et vecteurs de maladies. Dans ce cadre et compte tenu de son faible coût de fabrication, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en fait depuis 2006 l'outil principal de lutte des pays tropicaux pour contrôler la prolifération des

insectes vecteurs de maladies telles que la malaria, la fièvre jaune, la trypanosomiase et le typhus. Cependant, de nombreux insectes ont montré une résistance nouvellement acquise à cet insecticide. Le DDT est très persistant sur les surfaces solides. Sa demi-vie est de 2 à 15 ans dans les sols. Sa fraction peut même être immobile s'ils sont riches en matière organique. Il a une très faible solubilité dans l'eau. Sa demi-vie en milieu aqueux est de 56 jours en lac et de 28 jours en rivière. Il est lipophile et passe donc facilement dans les graisses animales, où l'on a mis en évidence sa bioaccumulation et sa bioconcentration. L'exposition par contacts cutanés (non toxique par cette voie), inhalation, ou ingestion via des aliments contaminés peut être également due aux pulvérisations des professionnels de la santé (traitements anti-paludisme). Ce composé est ubiquitaire dans l'environnement, ce qui le rend hautement disponible pour l'ensemble des organismes, en particulier ceux du sommet de la chaîne alimentaire. Le DDT et ses métabolites (DDD, DDE, DDA), parfois plus persistants que le composé parent, sont associés à une toxicité aquatique aiguë et chronique également valable chez les mammifères. Ces composés ont été de plus corrélés à des problèmes de tératogénicité, de mutagénicité et de cancérogénicité. Mais ces observations sont, à ce jour, contradictoires. En effet, le potentiel carcinogène est avéré chez l'animal, mais il est classé 2B par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), c'est à dire composé cancérogène potentiel chez l'homme. D'autres signes ont été mis en avant comme des problèmes de reproduction, des problèmes touchant au système nerveux, endocrinien et immunitaire. Chez l'homme, une exposition faible à modérée implique l'augmentation du poids et des activités enzymatiques du foie. Chez l'animal, le DDT provoque des dommages au foie ainsi qu'une modification de la physiologie des hépatocytes. Des données rapportent des cas de nécroses, de vacuolisation cytoplasmique et d'hyperplasie correspondant en fait à l'augmentation de la synthèse d'ADN et de l'activité mitotique. C'est une réponse régénérative du foie face à ce pesticide. Le DDT est un agent mitotique qui agit de manière dose dépendante et qui peut causer de l'aneuploïdie (augmentation anormale du nombre de chromosomes). Enfin, c'est un agoniste du récepteur aux œstrogènes et un antagoniste du récepteur aux androgènes (mimant les ligands naturels).

L'heptachlore est un insecticide à large spectre, dont beaucoup de pays ont interdit ou limité l'utilisation. Il a été largement employé dans les années 60 et 70, pour le traitement des sols et des semences, la protection du bois et la lutte contre les termites et les insectes domestiques. Son utilisation est interdite dans l'Union européenne depuis 1984. Actuellement, sa principale utilisation est la lutte contre les termites par injection dans le sol de subsurface. L'heptachlore y est en effet très persistant. Sa demi-vie est de 205 jours. Il y est transformé principalement

en époxyde d'heptachlore, qui résiste très longtemps à toute dégradation et qui est plus toxique que le composé mère. L'heptachlore et son métabolite l'époxyde se lient aux particules du sol et migrent très lentement. On a trouvé l'heptachlore dans l'eau de consommation courante où il est insoluble, à des concentrations se mesurant en nano grammes par litre. On estime que l'alimentation représente la principale source d'exposition à ce composé, mais l'inhalation constitue une autre source de contamination. Comme pour le DDT, il est lipophile et donc stocké dans les graisses avec ses métabolites pour être ensuite excrétés par les urines et les fèces. Cependant il est modérément à fortement toxique par voie orale et cutanée. L'exposition prolongée à l'heptachlore a été associée à des lésions hépatiques et à l'augmentation des activités enzymatiques, à des intoxications du système nerveux central, à des problèmes de reproduction, de tératogenèse et de cancérogenèse chez les rats seulement. L'heptachlore est donc un potentiel agent promoteur de tumeurs et il est, tout comme le DDT, classé 2B par le CIRC.

L'utilisation de l'endosulfan débuta au cours des années 1950. Il est utilisé comme insecticide pour la protection du bois, mais également pour protéger une grande variété de cultures alimentaires, dont le thé, le café, les fruits et les légumes, ainsi que le riz, les céréales, le maïs, et le sorgho. L'endosulfan est une substance fortement toxique. L'OMS l'a classée avec les substances présentant un danger modéré, et l'Environmental Protection Agency (EPA) avec les pesticides très dangereux. Sa toxicité à court terme est importante, et peut varier selon les divers solvants et émulsifiants utilisés dans les solutions. L'endosulfan est facilement absorbé par l'estomac, les poumons et la peau. Il se présente en solution technique sous forme de 2 isomères α et β , faiblement solubles, dans les proportions 2 : 1 à 7 : 3 en fonction de la solution du fabricant. Il est persistant dans les sols en condition acide, mais peut ne pas excéder 1 jour en condition alcaline. L' α endosulfan est le plus toxique des 2 isomères mais il est également le moins stable en condition neutre. Il n'est pas considéré contrairement au DDT et à l'heptachlore comme un carcinogène (IARC). Cependant il peut être mutagène. Il présente également des effets sur la reproduction, la tératogenèse, sur le système nerveux, immunitaire et endocrinien. Son métabolite principal, le sulfate d'endosulfan présente la même toxicité tout en étant plus persistant.

L'augmentation de l'incidence des cancers hépatiques est à ce jour considérée comme une préoccupation au niveau mondial. Bien que certaines pratiques (consommation d'alcool, mauvaise conservation des semences conduisant au développement des aflatoxines...) soient à l'origine du développement des hépatocarcinomes, la contamination par les pesticides est un

point très fortement suspecté comme pouvant être à l'origine du développement de cette pathologie. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets cellulaires et moléculaires des 3 POCs sélectionnés, sur le modèle de référence toxicologique qu'est l'hépatocyte humain en culture primaire (HHCP). Egalement considéré comme le « gold model », il représente l'unité fonctionnelle du foie, organe qui se veut la cible majeure pour la biotransformation et l'élimination des xénobiotiques environnementaux. En partenariat avec le service de chirurgie digestive et de transplantation hépatique dirigé par le professeur J. Gugenheim de l'hôpital l'Archet à Nice, nous avons eu accès à des biopsies hépatiques humaines. Après perfusion à la collagénase et dissociation des hépatocytes, nous avons utilisé les biomarqueurs de TEM. Car la TEM rendrait compte de la mise en place et des mécanismes de la fibrose hépatique, terrain de prédisposition au développement de la cirrhose et de l'hépatocarcinome. La TEM peut donc également intervenir de manière précoce dans les événements conduisant à l'hépatocarcinogénèse. Ces travaux s'appuient sur des données préliminaires acquises au sein du laboratoire. A partir de puces à ADN, nous avons montré une dérégulation de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire en réponse aux trois pesticides organochlorés. En parallèle, il a également été remarqué une inhibition de l'apoptose hépatocytaire spontanée en réponse aux POCs. Dans l'intérêt d'améliorer les connaissances sur les effets toxicologiques des POCs en cancérogénèse, et dans le but de caractériser leurs effets potentiels sur la TEM, nous avons conduit de plus amples investigations dans ce sens. Nous avons montré que les POCs induisaient des modifications morphologiques chez les HHCP, avec une tendance à l'individualisation, la formation de pseudopodes et de fibrilles de stress. Ils induisent de plus une réduction de l'expression génique et protéique de l'E-cadhérine accompagnée d'une perte du marqueur hépatocytaire qu'est l'albumine. La répression de l'E-cadhérine s'accompagne d'une augmentation du pool cytoplasmique de la β -caténine ainsi qu'une diminution de la co-localisation cadhérine/caténine au niveau périmembranaire. Les POCs enfin potentialisent l'établissement d'un phénotype mésenchymateux avec l'augmentation de l'expression de la Vimentine, de la Fibronectine, du collagène I $\alpha 1$, et de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$.

Il semble donc que les POCs soient capables de perturber le phénotype hépatocytaire. Cela implique l'initiation du processus de TEM en réponse aux POCs sur HHCP. Or les hépatocytes ont tendance à se différencier spontanément en culture primaire. Cela signifierait que les POCs sembleraient potentialiser ce phénomène. Cette étude a finalement

permis de développer de nouveaux biomarqueurs de tumorigénicité afin de mieux estimer les dangers sanitaires liés à cette classe de substances.

Organochlorine pesticides induce epithelial to mesenchymal transition of human primary cultured hepatocytes

Nathalie Zucchini-Pascal†*, Ludovic Peyre†, Georges, de Sousa, Roger Rahmani*

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, UMR 1331 TOXALIM (Research Center in Food Toxicology), 06903 Sophia Antipolis, France.

†These authors equally contributed to this work

*Correspondance should be addressed to Dr. Zucchini-Pascal or Dr. R. Rahmani

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, UMR 1331, 06903 Sophia Antipolis, France.

Phone: 33 4 92 38 65 48, Fax: 33 4 92 38 64 01

E-mail: zucchini@sophia.inra.fr; rahmani@sophia.inra.fr

Abstract

Persistent organic pollutants (POPs) are a group of organic, or carbon-based, chemicals that adversely affect human health and are persistent in the environment. These highly toxic compounds include industrial chemicals, pesticides such as organochlorines, and unwanted wastes such as dioxins. Although studies have described the general toxicity effects of organochlorine pesticides, the mechanisms underlying its potential carcinogenic effects in the liver are not known understood. In this study, we analyzed the effect of three organochlorine pesticides (dichlorodiphenyltrichloroethane, heptachlore and endosulfan) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in primary cultured human hepatocytes. We found that these compounds modified the hepatocyte phenotype, inducing cell spread, formation of lamellipodia structures and reorganization of the actin cytoskeleton in stress fibers. These morphological alterations were accompanied by disruption of cell-cell junctions, E-cadherin repression and albumin down-regulation. Interestingly, these characteristic features of dedifferentiating hepatocytes were correlated with the gain of expression of various mesenchymal genes, including *vimentin*, *fibronectin* and its receptor *itga5*. These various results show that organochlorines and TCDD accelerate cultured human hepatocyte dedifferentiation and EMT processes. These events could account, at least in part, for the carcinogenic and/or fibrogenic activities of these POPs.

Keywords: Persistent organic pollutants; Organochlorine pesticides; Epithelial to mesenchymal transition; Hepatocarcinogenesis

Abbreviations: Ab, antibody; DAPI, 4',6'-di-amidino-2-phenyl indole; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial to mesenchymal transition; FBS, foetal bovine serum; HCC, Hepatocellular carcinoma; .POP, persistent organic pollutants; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane

1. Introduction

A wide variety of chemicals are released every day into the environment from residential, commercial, agricultural and industrial sources. The exposure of organisms to these environmental contaminants is a major issue for public health policy. In particular, persistent organic pollutants (POPs) are toxic chemicals that adversely affect human health and the environment. The physico-chemical characteristics of these compounds are such that they persist in the environment for long periods of time and can accumulate through the food chain. Indeed, they can be accumulated and stored in fats where they persist in the body. Thus, POPs are toxic chemicals that adversely affect human health and the environment around the world. (El-Shahawi et al., 2009; Lim et al., 2010). Consequently, the Stockholm Convention in 2004 listed the first twelve POP chemicals (named the "Dirty Dozen"), including dioxins, DDT and heptachlor. In 2011, nine compounds, including endosulfan, were added to the Stockholm Convention list. Various *in vitro*, *in vivo* and epidemiological studies indicate that all these POPs present a carcinogenic potential for human. The liver is the tissue most sensitive to intoxication by POPs, and more generally xenobiotics, due to its role in metabolism. However, and despite numerous studies suggesting the hepatotoxicity of these compounds, the cellular and molecular mechanisms underlying the toxicity and carcinogenic effects of POPs in human hepatocytes remain poorly understood.

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a multistep process that is physiologically important in various processes, including embryonic development and tissue repair. It has also been implicated in a variety of diseases including fibrosis and the progression of carcinoma (Jou J. and A. M Diehl, 2010; Kalluri and Weinberg, 2009). EMT is the process by which a polarized epithelial cell undergoes multiple biochemical and molecular changes such that it assumes a mesenchymal cell phenotype. Epithelial cells are defined as polarized cells that adhere to a basal membrane, form cohesive cell layers through intercellular junctions (i.e. adherens junctions, desmosomes and tight junctions) and communicate with one another through gap junctions. These various interactions slow the motility of cells within the epithelium. By contrast, mesenchymal cells do not display intercellular interactions, and are characterized by their ability to move on an extracellular matrix (ECM). The EMT process involves major phenotypic modifications that occur as a sequence of steps, including loss of apico-basal polarity, disruption of intercellular junctions, modifications of cell surface proteins (E-cadherin and integrins) and reorganization of the cytoskeleton (Firincieli et al., 2010; Thiery, 2003; Ozdamar et al., 2005). All these events result in the fibroblastic-like

phenotype and the acquisition of migratory and invasive properties. However, a classification has been proposed involving three different biological subtypes depending on the biological context in which EMT occurs (Kaluri and Weinberg, 2009). Type 1 EMT leads to the apparition of cells with a mesenchymal phenotype to create new tissue. This subtype is associated with implantation, embryo formation and organogenesis. All EMT processes implicated with wound healing, tissue regeneration and fibrosis constitute type 2 EMT. In contrast to type 1, this subtype is associated with inflammation and can lead to organ destruction. Type 3 EMT occurs in neoplastic cells and allows the final steps of cancer progression causing invasion and metastasis. Despite this classification based upon distinct biological processes, all three EMT type share a common program based on common cellular and molecular events.

The purpose of this study was to investigate the effects of organochlorine pesticides (DDT, heptachlor and endosulfan) and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) on the EMT process in primary cultured human hepatocytes. Primary cultures of human hepatocytes are a very powerful *in vitro* model for investigating many aspects of liver physiopathology (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). We found that all POPs tested disrupted the phenotypes of human hepatocytes, as revealed by the loss of epithelial features. The organochlorines and TCDD disrupted cell-cell contacts, characterized by the loss of E-cadherin from adherens junctions as a consequence of repression of the expression of its gene. These compounds accelerated the dedifferentiation process in cultured hepatocytes and led to reorganization of the actin cytoskeleton and induction of the mesenchymal marker vimentin. All these events were associated with excessive ECM production: the mRNAs for $\alpha 1(I)$ collagen, fibronectin and its receptor $\alpha 5\beta 1$ integrin were all overproduced. Most importantly, we report the first data evidencing the effects of organochlorines on EMT, a process implicated in liver fibrosis and carcinogenesis.

2. Material and Methods

1.1. Cell culture and incubation experiments

All experiments on human tissue were in accordance with ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration. Hepatocytes from human liver were isolated and cultivated as previously described (Berry and Friends, 1969). Briefly, after isolation, cells were seeded onto type-1-collagen-coated dishes. Hepatocytes were cultured in medium I (William's medium E, 10% FBS, 50 UI/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 0.1 UI/ml insulin) for 18 h. Then, medium I was replaced by a similar one that did not contain serum and was supplemented with hydrocortisone hemisuccinate (1 µM) and bovine serum albumin (240 µg/ml).

1.2. Immunofluorescence staining

Human hepatocytes were grown on type-1-collagen-coated glass coverslips. After experimental procedures, the cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilised in PBS containing 0.1% Triton. After washing, cells were blocked with 3% BSA in PBS and incubated for 1 h with primary antibodies: E-cadherin (1/500), β-catenin (1/450) and vimentin (1/400). Goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG coupled to AlexaFluor 488 or 594 (Molecular Probes, Eugen, OR), respectively, were used as secondary Antibodies at a dilution of 1/500. After washing, slides were mounted and sealed in ProlongGold antifade reagent (Invitrogen). Images were acquired with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CCD camera (ORCA ER, Hamamatsu Photonics), at x 20 magnification.

1.3. Western blot analysis

The cells were treated for 72 h with increased concentrations of DDT, heptachlor and endosulfan (0.2, 2 and 20 µM). Hepatocytes were lysed in hypotonic buffer (25mM HEPES, pH 7.5, 5mM MgCl₂, 5mM EDTA, 5mM DTT, 2mM PMSF, 10µg/ml leupeptin, 10µg/ml pepstatin A) supplemented with 0.1% SDS. After concentration determination (BCA Protein Assay kit), proteins were loaded onto either 10% or 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membrane (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK). After blocking with 5% non-fat skimmed milk in TBS-T (10mMTris, pH 7.5, 140mMNaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at 37 °C, membranes were washed and incubated with the corresponding primary antibody in TBS-T containing 3% BSA. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse immunoglobulin G

or anti-rabbit immunoglobulin G, Promega, Madison, WI, USA). The signals were detected using ImmobilonWestern Detection Reagents (Millipore, Molsheim, France) and acquired using CCD camera (ChemiGenius2, SynGene). Then, semiquantification was performed using the analysis software GeneTools.

1.4. RNA isolation and real-time RT-PCR

RNAs were isolated and cDNA synthesized as previously described (Zucchini et al., 2009). Quantitative PCR analysis was carried out with LightCycler®480 Probes Master (Roche), according to the manufacturer's instructions, together with FAM-labeled hydrolysis probes from the Universal Human Probe Library Set (Roche). Intron-spanning primers were designed with Universal Probe Library Assay Design Center software (https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000). Calculations were carried out with *gapdh* as the endogenous control reference gene. Fold differences in gene expression were calculated with LightCycler software, taking into account the efficiency of amplification, determined from a standard curve obtained with the second-derivative maximum method.

3. Results

1.5. Organochlorine pesticides perturb the phenotype of primary cultured human hepatocytes

Primary human hepatocytes were cultured in sub-confluent conditions with and without 20 μM of DDT, heptachlor or endosulfan and were analyzed for morphological changes by phase-contrast microscopy after 72 h of treatment. TCDD (25 nM) and TGF- β (2 ng/ml) were used as positive controls for cell plasticity and EMT induction (Diry et al., 2006; Caja et al., 2011). In control (vehicle-treated) cultures, cells had polygonal shapes and formed islets establishing cell-to-cell contacts with distinct intercellular borders, and thus displayed features typical of mature and differentiated cells. Cultures exposed to organochlorine exhibited notable morphological alterations. In particular, DDT and Heptachlore led to the acquisition of a spindle-shape cell phenotype and to the apparition of individual cells exhibiting starry-shape morphology, similar to the effects of TGF- β and TCDD (Fig. 1). Narrowing of the cytoplasm and lamellipodia structures (arrows) were observed after treatment with all compounds tested. Cells treated with endosulfan and TCDD presented more refringent intercellular borders (arrowhead), suggesting that these compounds led to cell detachment.

These observations show that primary human hepatocytes exposed to organochlorine pesticides acquired phenotypic characteristics suggesting a mesenchymal-like phenotype.

1.6. Organochlorine pesticides induce loss of epithelial characteristics

Adherens junctions are a major type of cell-cell junctions and they contribute to the maintenance of endothelial monolayer integrity. E-cadherin plays a key role in these structures; its cytoplasmic domain recruits several molecules including α -catenin and β -catenin (Aberle et al., 1996; Kemler, 1993). β -catenin binds directly to the intracellular domain of E-cadherin and to α -catenin, which connects the adherens junction complex to the actin cytoskeleton (Aberle et al., 1994; Hulsken et al., 1994a; Jou et al., 1995). In view of the morphological features acquired by human hepatocytes following exposure to organochlorines, we visualized the E-cadherin/ β -catenin complex by immunofluorescence analysis (Fig. 2). Control (vehicle-treated) cells contained substantial amounts of E-cadherin that co-localized with β -catenin at the plasma membrane, evidence of functional adherens complexes. In contrast, human hepatocytes exposed to organochlorines contained much less,

and discontinuous, E-cadherin and β -catenin staining. These differences indicate that organochlorine treatment led to disassembly of the E-cadherin/beta-catenin complex.

The amounts of E-cadherin protein in the DDT-, heptachlor- and endosulfan-treated hepatocytes were reduced and were similar to that in hepatocytes exposed to TCDD and TGF- β (Fig. 3A and B). Similarly, E-cadherin transcript abundance was significantly reduced by organochlorine pesticides and positive control treatments (Fig. 3C). The total β -catenin level increased, in a dose-dependent manner, in cells exposed to DDT, heptachlore and positive controls (Fig. 3A and B), without mRNA induction (data not shown). These results are consistent with the treatments resulting in β -catenin stabilization.

We analyzed the expression of the *albumin* gene, encoding a protein that serves as a marker of mature and functional hepatocytes: the synthesis of albumin is an indicator of the differentiated state of cultured hepatocytes (de Juan et al., 1992). All chemical treatments resulted in a lower than control abundance of the albumin mRNA (Fig. 3C). Therefore, DDT, heptachlore, endosulfan and TCDD accelerate the dedifferentiation of primary cultured hepatocytes and appear to induce the EMT process.

1.7. Organochlorine pesticides induce gain of mesenchymal markers

We tested whether repression of E-cadherin and dedifferentiation by organochlorines were accompanied by the acquisition of the mesenchymal marker vimentin, an intermediate filament protein normally found in cells of mesenchymal origin or in migrating epithelial cells. Co-immunofluorescence staining experiments revealed a fibrillar rearrangement of vimentin in the cytoplasm of hepatocytes exposed for 72 h to organochlorines or TCDD (Fig. 4). These changes occurred in parallel to polarization of the F-actin stress fibers throughout the cells; in control conditions, actin was organized into a cortical pattern at the cell-to-cell junctions.

Control primary human hepatocytes cultured for 96 h (72 h mock-treatment tested 24 h post-plating) expressed vimentin mRNA and protein (Fig. 5A and B), consistent with the dedifferentiation of primary hepatocytes observed during cell culture (Godoy et al., 2010). Both organochlorines and positive controls increased the levels of vimentin mRNA and protein (Fig. 5A and B).

We tested whether the acquisition of the mesenchymal phenotype was accompanied by the production of ECM. We assayed the mRNA for $\alpha 1(I)$ collagen and the $\alpha 5$ transcripts encoding fibronectin receptor (*itga5*) after 72 h of treatment (Fig. 5C and D). DDT, Heptachlore and TGF- β significantly increased the amounts of the mRNAs for $\alpha 1(I)$ collagen and *itga5*. TCDD up-regulated *itga5* mRNA, but not $\alpha 1(I)$ collagen mRNA. Consistent with these findings, fibronectin protein was up-regulated by all organochlorines, TCDD and TGF- β (Fig. 5B), with endosulfan having the smallest effect (Fig. 5E).

Our various findings demonstrate that organochlorine pesticides induce an EMT program in primary cultured hepatocytes.

4. Discussion

In this study, we demonstrate that organochlorine pesticides considerably disrupt the phenotype of primary cultured human hepatocytes. We report that these pesticides cause the loss of epithelial features, characterized by the repression of E-cadherin expression, the dissociation of intercellular junctions and the decreased expression of albumin. This was accompanied by structural modifications with the apparition of lamellipodia and modifications of the actin cytoskeleton reorganized into stress fibers. All these events occurred in parallel to the gain of mesenchymal markers, notably vimentin, and the synthesis of the ECM proteins $\alpha 1(I)$ collagen, fibronectin and its receptor $\alpha 5$ integrin. This disrupted phenotype was closely related to EMT. Note however that hepatocytes cultured for 72 h acquired a modified morphology and expressed a mesenchymal marker: vimentin. This is suggestive of a dedifferentiation process. Indeed, it has been demonstrated that EMT is a process characteristic of the dedifferentiation of hepatocytes *in vitro* (Godoy et al., 2010); hepatocytes cultured in monolayers dedifferentiate, thereby losing their specialized liver functions, and die by apoptosis (Tuschl and Mueller, 2006; Bailly-Maitre et al.,). After a few days of culture in collagen-coated plates, rat hepatocytes spread and acquire a fibroblast-like shape (Tuschl and Mueller, 2006). Consequently, we conclude that DDT, heptachlore, TCDD and TGF- β accelerate the dedifferentiation process of primary cultured human hepatocytes, potentiating EMT.

Organochlorines, like TCDD and TGF- β , repressed E-cadherin expression. E-cadherin is a universal epithelial marker that plays a key role in the maintenance of cellular integrity, and its repression marks early EMT (Zeisberg and Kalluri, 2004; Li et al., 2003). The link between the loss of E-cadherin function and the occurrence of EMT in liver disease is well documented. For example, decreased E-cadherin expression has been observed in approximately 40% of hepatocellular carcinoma samples (Yang et al., 2009). E-cadherin loss of function is associated with invasion and metastasis of cancer cells, and other pathological conditions, such as fibrosis. Liver fibrosis is accompanied by the loss of E-cadherin, which promotes the process of EMT (Cho et al., 2010; Kaimori et al., 2007). Interestingly, we found that DDT and heptachlor induced the mRNAs for $\alpha 1(I)$ collagen and *itga5*, and up-regulated fibronectin. These two components of the ECM are the most ubiquitous and powerful mediators of fibrosis. Liver fibrosis is the liver's wound-healing response to various chronic injuries, including chronic hepatitis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and exposure to xenobiotics (for example alcohol, drugs, and pesticides) (Henderson

and Forbes, 2008; Bataller and Brenner, 2005). This state results from the excessive secretion of ECM components including $\alpha 1(I)$ collagen and fibronectin (Benyon and Iredale, 2000). The end-stage irreversible consequence of progressive liver fibrosis is cirrhosis associated with complications such as portal hypertension, hepatic encephalopathy and HCC. Indeed, cirrhosis is a major preneoplastic condition in the majority of HCCs because fibrotic or cirrhotic states may be a predisposing risk factor for HCC (Jeng et al., 2007) and may be the consequence of environmental chemical carcinogens including hydrocarbons, organochlorine pesticides, and plant toxins (Leong and Leong, 2005). Type 2 EMT is a major process involved in fibrosis. It has been suggested that the occurrence of EMT in fibrotic adult organs protects epithelial cells against injury and repairs tissue, promoting ECM production (Firincieli et al., 2010). The origin of fibrogenic cells or activated myofibroblasts responsible for the ECM in fibrotic liver is still unclear. Indeed, freshly isolated mouse hepatocytes exposed to transforming growth factor- β (TGF- β), a key mediator of the initiation and the progression of liver fibrosis, enter an EMT process, acquiring a mesenchymal phenotype and resulting in collagen deposition (Kaimori et al., 2007). This *in vitro* study was consistent with the finding *in vivo* that mouse hepatocytes can undergo EMT to contribute substantially to fibroblastic cells in CCl₄-induced liver fibrosis (Zeisberg et al., 2007). However, contradictory data support the idea that hepatocytes do not undergo EMT in liver fibrosis in mice (Taura et al., 2010). One explanation of these contradictory findings is that liver fibrosis may be a process regulated in time, in which liver cells engaged in EMT may subsequently pass through a mesenchymal to epithelial transition (MET).

Our results contribute to explaining the effects of some environmental contaminants on the liver. Indeed, chemicals including organochlorines are hepatotoxic and are potential carcinogens, as suggested by laboratory experiments (Leong and Leong, 2005). Few epidemiological studies have examined the possible relation between exposure to pesticides and the incidence of cancer. However, a link between water contaminated with DDT and increased death rates among Chinese farmers has been established. Moreover, significant excess incidence of liver cancer was reported after occupational exposure to DDT (Brown et al., 1993; Cocco et al., 1997). DDT also induces liver tumor in laboratory animals (Turusov et al., 1973; Tomatis and Turusov, 1975). DDT, heptachlor and endosulfan are classified as non-genotoxic hepatocarcinogens, like TCDD. This means that their carcinogenicity in the liver is attributed to dysregulation of various signaling pathways (those associated with apoptosis, proliferation, oxidative stress, or cytochrome P450 induction, for example). Mechanisms have

been proposed in which TCDD might be indirectly genotoxic, either through the induction of oxidative stress or by altering the DNA-damaging potential of some endogenous compounds (Park et al., 1996; Slezak et al., 1999; Graham et al., 1998). Other data from rat models suggest that the pro-carcinogenic potential of TCDD could be ascribed to suppression of apoptosis liver (Stinchcombe et al., 1995; Luebeck et al., 2000). Activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by TCDD triggers a signaling cascade responsible for cell plasticity and cell motility (Diry et al., 2006). Moreover, a common signature of non-genotoxic carcinogens seems to be the alteration of Gap junctional intercellular communications (GJIC). Indeed, such disruption is one of the principal disorders observed during carcinogenesis (Krutovskikh and Yamasaki, 1997; Cronier et al., 2009). Several lines of evidence indicate that various non-genotoxic carcinogens (including TCDD, endosulfan, DDT and heptachlore) inhibit connexin-mediated GJIC hydrocarbons and organochlorine compounds, including TCDD and endosulfan (Bager et al., 1997; Wärngård et al., 1996; Cowles et al., 2007; Ruch et al., 1990). This disorder is also observed during EMT, as the loss of cell-to-cell adhesion with the disintegration of tight, adherens, and gap junctions characterize this process. The EMT process is central to liver carcinogenesis because it is involved in both early-stage (i.e. participating in the establishment of fibrosis which constitutes a pre-neoplastic lesion) and late-stage (i.e. regulating invasiveness and metastasis) events.

In conclusion, our study demonstrates that organochlorines perturb the phenotype of primary cultured hepatocytes, potentiating the dedifferentiation of cells and inducing an EMT program. These findings provide further insight into the carcinogenic action of environmental contaminants in the human liver.

References

- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., Hoschuetzky, H., 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3655-3663.
- Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R., 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61, 514-523.
- Bager, Y., Lindebro, M.C., Martel, P., Chaumontet, C., Wörndler, L., 1997. Altered function, localization and phosphorylation of gap junctions in rat liver epithelial, IAR 20, cells after treatment with PCBs or TCDD. *Environ Toxicol Pharmacol* 3, 257-266.
- Bailly-Maitre, B., de Sousa, G., Zucchini, N., Gugenheim, J., Boulukos, K.E., Rahmani, R., 2002. Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. *Cell Death Differ* 9, 945-955.
- Bataller, R., Brenner, D.A., 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209-218.
- Benyon, R.C., Iredale, J.P., 2000. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 46, 443-446.
- Berry, M.N., Friend, D.S., 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43, 506-520.
- Brown, G.V., 1993. Chemoprophylaxis of malaria. *Med J Aust* 159, 187-196.
- Caja, L., Bertran, E., Campbell, J., Fausto, N., Fabregat, I., 2011. The transforming growth factor-beta (TGF- β) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J Cell Physiol* 226, 1214-1223.
- Cho, I.J., Kim, Y.W., Han, C.Y., Kim, E.H., Anderson, R.A., Lee, Y.S., Lee, C.H., Hwang, S.J., Kim, S.G., 2010. E-cadherin antagonizes transforming growth factor β 1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology* 52, 2053-2064.
- Cocco, P., Blair, A., Congia, P., Saba, G., Ecça, A.R., Palmas, C., 1997. Long-term health effects of the occupational exposure to DDT. A preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 837, 246-256.
- Cowles, C., Mally, A., Chipman, J.K., 2007. Different mechanisms of modulation of gap junction communication by non-genotoxic carcinogens in rat liver in vivo. *Toxicology* 238, 49-59.
- Cronier, L., Crespin, S., Strale, P.O., Defamie, N., Mesnil, M., 2009. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11, 323-338.
- de Juan, C., Benito, M., Fabregat, I., 1992. Regulation of albumin expression in fetal rat hepatocytes cultured under proliferative conditions: role of epidermal growth factor and hormones. *J Cell Physiol* 152, 95-101.

- Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K.W., Barouki, R., Transy, C., 2006. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 5570-5574.
- El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bashammakh, A.S., Al-Saggaf, W.T., 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80, 1587-1597.
- Firringioli, D., Boissan, M., Chignard, N., 2010a. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol* 34, 523-528.
- Firringioli, D., Boissan, M., Chignard, N., 2010b. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol* 34, 523-528.
- Godoy, P., Lakkapamu, S., Schug, M., Bauer, A., Stewart, J.D., Bedawi, E., Hammad, S., Amin, J., Marchan, R., Schormann, W., Maccoux, L., von Recklinghausen, I., Reif, R., Hengstler, J.G., 2010. Dexamethasone-dependent versus -independent markers of epithelial to mesenchymal transition in primary hepatocytes. *Biol Chem* 391, 73-83.
- Graham, M.J., Lucier, G.W., Linko, P., Maronpot, R.R., Goldstein, J.A., 1988. Increases in cytochrome P-450 mediated 17 beta-estradiol 2-hydroxylase activity in rat liver microsomes after both acute administration and subchronic administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis* 9, 1935-1941.
- Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2010. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640, 1-40.
- Henderson, N.C., Forbes, S.J., 2008. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology* 254, 130-135.
- Hv^olsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J., 1994. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127, 2061-2069.
- Jeng, J.E., Tsai, J.F., Chuang, L.Y., Ho, M.S., Lin, Z.Y., Hsieh, M.Y., Chen, S.C., Chuang, W.L., Wang, L.Y., Yu, M.L., Dai, C.Y., Chang, J.G., 2007. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 9, 987-992.
- Jiao, W., Miyazaki, K., Kitajima, Y., 2002. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 86, 98-101.
- Jou, J., Diehl, A.M., 2010. Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 120, 1031-1034.
- Jou, T.S., Stewart, D.B., Stappert, J., Nelson, W.J., MARRS, J.A., 1995. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5067-5071.

- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J.Y., Wang, C., Mezey, E., Koteish, A., 2007. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 282, 22089-22101.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Kemler, R., 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9, 317-321.
- Krutovskikh, V., Yamasaki, H., 1997. The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 12, 761-768.
- Leong, T.Y., Leong, A.S., 2005. Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 7, 5-15.
- Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C., Liu, Y., 2003. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* 112, 503-516.
- Lim, S., Cho, Y.M., Park, K.S., Lee, H.K., 2010. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 166-176.
- Luebeck, E.G., Buchmann, A., Stinchcombe, S., Moolgavkar, S.H., Schwarz, M., 2000. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on initiation and promotion of GST-P-positive foci in rat liver: A quantitative analysis of experimental data using a stochastic model. *Toxicol Appl Pharmacol* 167, 63-73.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., Wrana, J.L., 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603-1609.
- Park, J.Y., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., 1996. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2322-2327.
- Ruch, R.J., Fransson, R., Flodstrom, S., Warngard, L., Klaunig, J.E., 1990. Inhibition of hepatocyte gap junctional intercellular communication by endosulfan, chlordane and heptachlor. *Carcinogenesis* 11, 1097-1101.
- Slezak, B.P., Diliberto, J.J., Birnbaum, L.S., 1999. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated oxidative stress in CYP1A2 knockout (CYP1A2^{-/-}) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 376-379.
- Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K.W., Schwarz, M., 1995. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 16, 1271-1275.
- Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M., Brenner, D.A., 2010. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51, 1027-1036.

Thiery, J.P., 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.

Tomatis, L., Turusov, V., Charles, R.T., Boiocchi, M., Gati, E., 1974. Liver tumours in CF-1 mice exposed for limited periods to technical DDT. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 82, 25-35.

Turusov, V.S., Day, N.E., Tomatis, L., Gati, E., Charles, R.T., 1973a. Tumors in CF-1 mice exposed for six consecutive generations to DDT. *J Natl Cancer Inst* 51, 983-997.

Turusov, V.S., Day, N.E., Tomatis, L., Gati, E., Charles, R.T., 1973b. Tumors in CF-1 mice exposed for six consecutive generations to DDT. *J Natl Cancer Inst* 51, 983-997.

Tuschl, G., Mueller, S.O., 2006. Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. *Toxicology* 218, 205-215.

Ward, L., Bager, Y., Kato, Y., Kenne, K., Ahlborg, U.G., 1996. Mechanistical studies of the inhibition of intercellular communication by organochlorine compounds. *Arch Toxicol Suppl* 18, 149-159.

Yang, M.H., Chen, C.L., Chau, G.Y., Chiou, S.H., Su, C.W., Chou, T.Y., Peng, W.L., Wu, J.C., 2009. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 50, 1464-1474.

Zeisberg, M., Kalluri, R., 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 82, 175-181.

Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., Kalluri, R., 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 23337-23347.

Figure legends

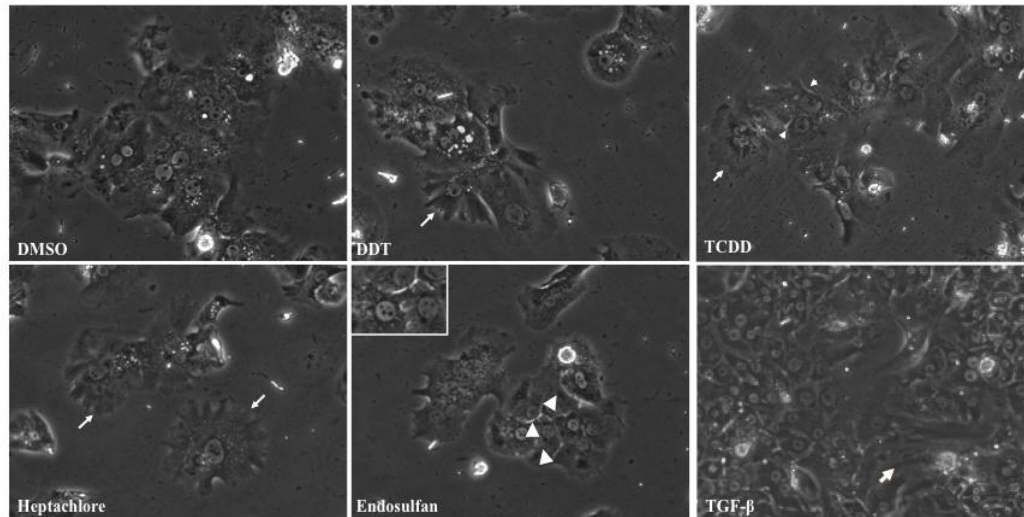


Figure 1: Effects of organochlorines and TCDD on primary cultured human morphology. Cells were exposed to 20 μ M organochlorines (DDT, heptachlor and endosulfan), 25 nM TCDD and 2 ng/ml TGF- β for 72 h. Cells morphology was examined under a light microscope. Chemicals induced lamellipodia structures (arrows) and more refringent intercellular borders (arrowhead). The results shown are those from a single experiment representative of three independent experiments.

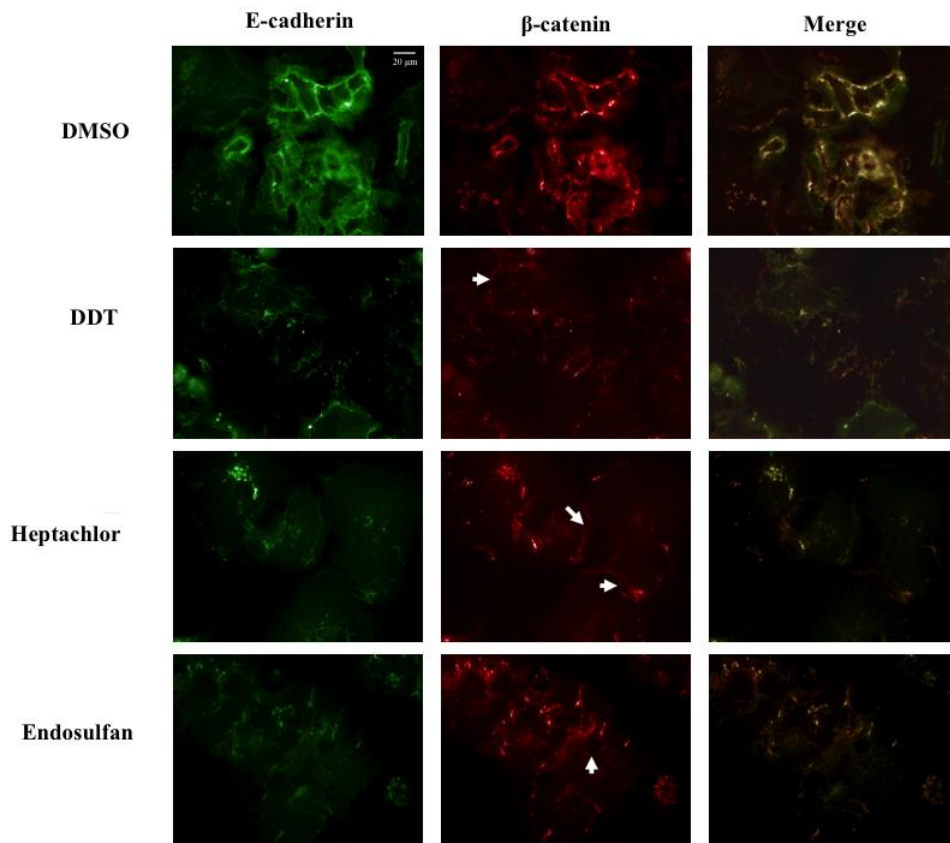


Figure 2: Organochlorines disrupts adherens junctions. Human hepatocytes were grown on coverslips and treated either with DMSO (0.25%) or 20 μ M organochlorines (DDT, Heptachlor, Endosulfan). 72 h later, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence for the detection of the E-cadherin (green) / β -catenin (red) complex. Colocalisation was done in the merge column in yellow colour. Representative of three separate experiments.

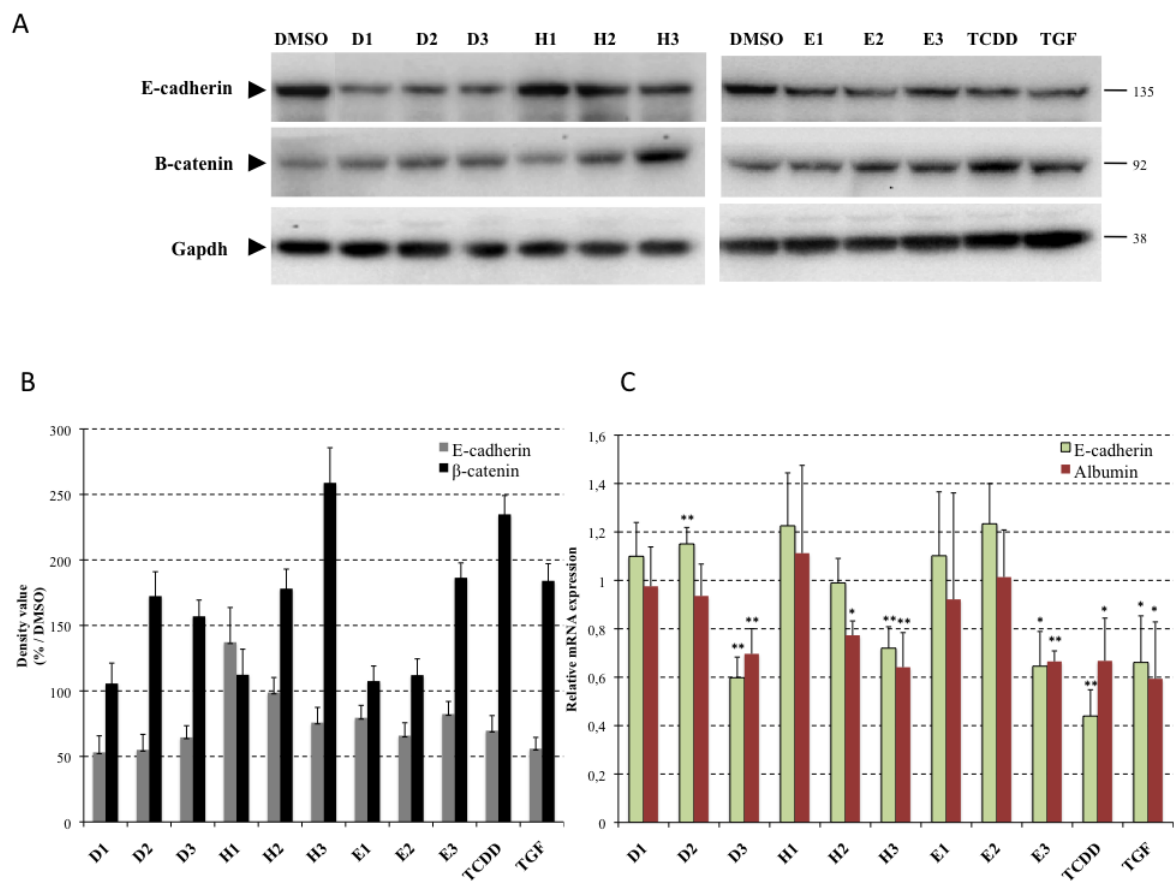


Figure 3: Effect of organochlorines and TCDD on epithelial hallmarks of human hepatocytes. Hepatocytes were treated with 0.2, 2 and 20 μ M organochlorines (DDT, heptachlor and endosulfan), 25 nM TCDD and 2 ng/ml TGF- β for 72 h. (A) Cells were lysed and E-cadherin (E-Cadh) and β -catenin 1 (β -cat) protein levels were analyzed by Western blotting. (B) Band densitometry was performed after the acquisition with a CCD camera and the results are defined as the ratio between treated cells versus DMSO-treated cells normalized by Gapdh. (C) Real-time quantitative PCR was used to quantify the mRNA of E-cadherin and albumin in human hepatocytes exposed to organochlorines, TCDD and TGF- β for 48 h. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated cells were set to 1. Error bars indicate the means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01.

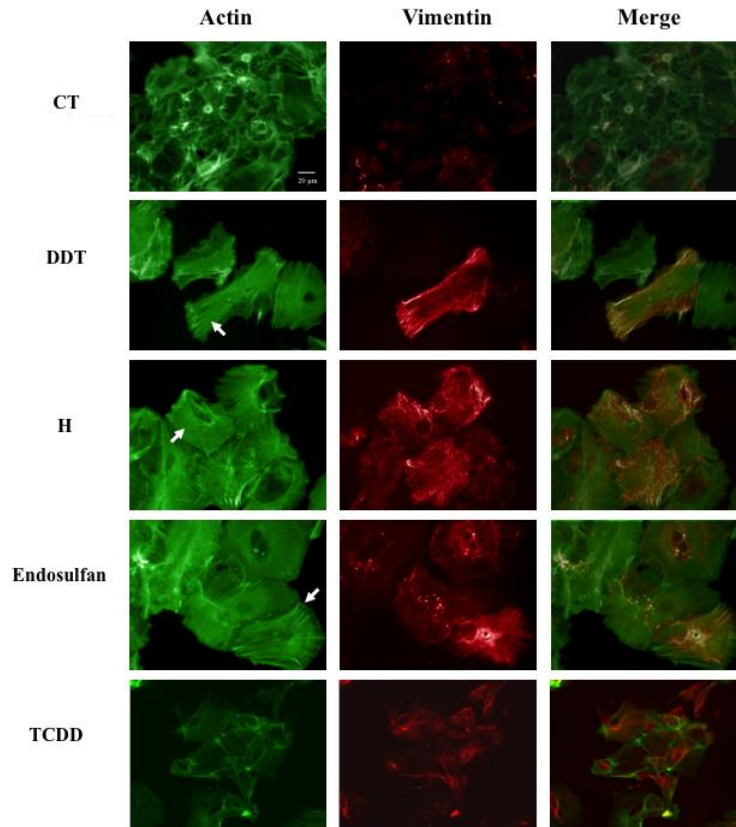


Figure 4: Organochlorines and TCDD disorganize the actin cytoskeleton increases the expression of vimentin in human hepatocytes. (A) Cells were exposed to 20 μ M organochlorines (DDT, heptachlor and endosulfan), 25 nM TCDD and 2 ng/ml TGF- β for 72 h. Then, cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence for the detection of F-actin by AlexaFluor 488-conjugated phalloidin staining (green) and vimentin (red). Colocalisation was done in the merge column in yellow colour. Representative of three separate experiments. (B, C) Hepatocytes were treated with 0.2, 2 and 20 μ M organochlorines (DDT, heptachlor and endosulfan), 25 nM TCDD and 2 ng/ml TGF- β for 72 h. Protein and mRNA levels were analyzed by Western blotting and real-time quantitative PCR, respectively. The relative amount of *vimentin* was expressed as a ratio to *gapdh*, and the *vimentin* level in DMSO-treated cells was set to 1. Data are expressed as the mean \pm S.D. * P <0.05 and ** P <0.01 obtained by analysis of variance ANOVA followed by post hoc multiple comparison testing.

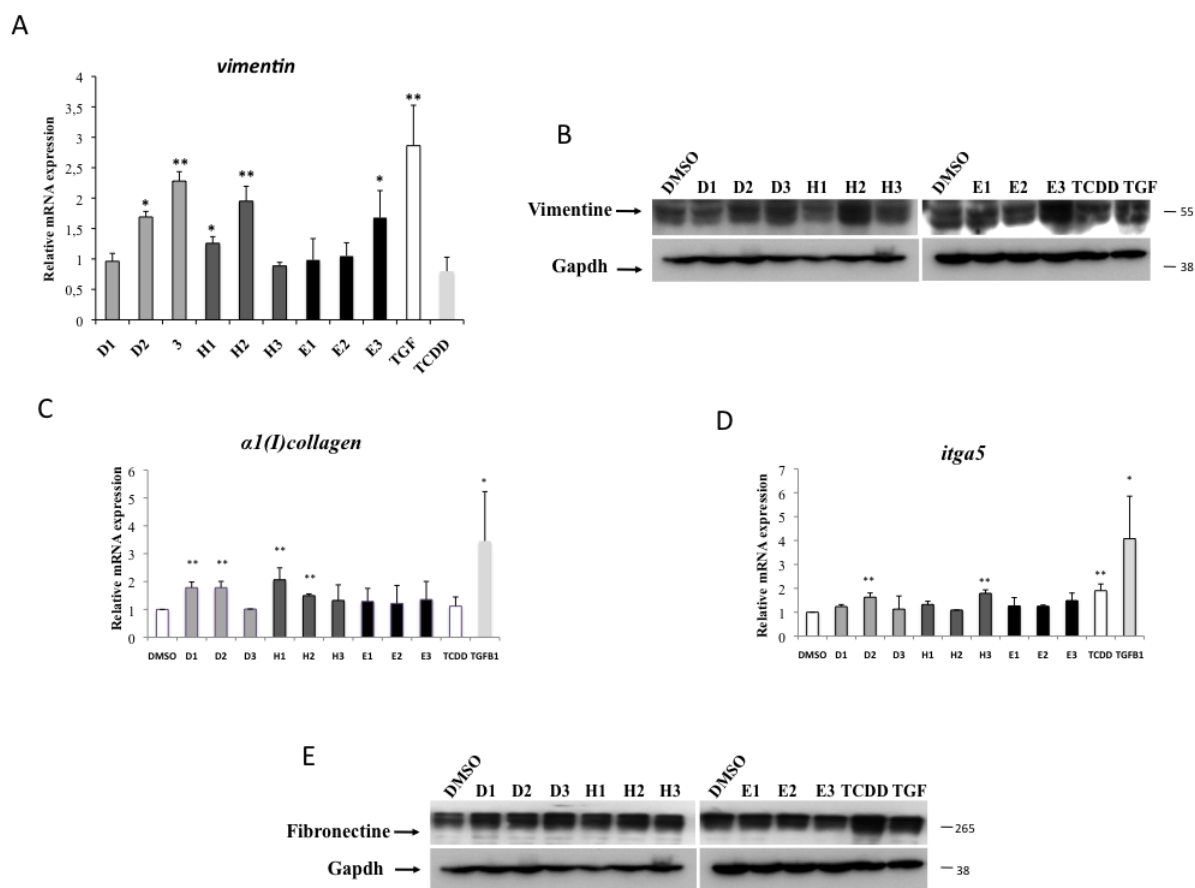


Figure 5: Effects of organochlorines and TCDD on the ECM. (A) Hepatocytes were treated with 0.2, 2 and 20 μM organochlorines (DDT, heptachlor and endosulfan), 25 nM TCDD and 2 ng/ml TGF- β for 72 h. (A) The relative amounts *α1(I)collagen* and *itga5* genes were assessed by real-time RT-PCR and were expressed as a ratio to *gapdh* with the *α1(I)collagen* and *itga5* levels in DMSO-treated cells set to 1. Data are expressed as the mean \pm S.D. * P <0.05 and ** P <0.01 obtained by analysis of variance ANOVA followed by post hoc multiple comparison testing. (B) Cells were lysed and fibronectin protein level was analyzed by Western blotting.

Acknowledgments: The authors received a Public Institutional Funding from INRA and the French National Research Agency (ANR “ONCOPOP” 06SEST26). We gratefully acknowledge R. Barouki and X. Coumoul for helpful scientific discussion.

Conflict of interest: The authors declare to have no conflict of interests.

Highlights: POPs perturb the cell morphology of primary cultured human hepatocytes; Organochlorine pesticides and TCDD disrupt cell-cell junctions; POPs lead to loss of epithelial and gain of mesenchymal features; Organochlorine pesticides and TCDD induce EMT in primary cultured human hepatocytes.

Article 4: atrazine represses *S100A4* gene expression and TPA-induced motility in HepG2 cells

Durant mon travail sur la problématique des biomarqueurs *in vitro* de cancérogenèse avec Galderma R&D, l'Atrazine avait été sélectionnée, dans une première étape, en temps que cancérogène génotoxique. Cependant cette classification est ambiguë car l'atrazine seule n'est pas génotoxique sur lymphocytes humains mais seulement en solution commerciale avec un adjuvant (D. Zeljezic et al., 2006). D'autres études soulignent cette absence de dommages à l'ADN (G. Ribas et al., 1998 ; M. J. Ruiz et D. Marzin, 1997) en contradiction avec certaines données (M. B. Lioi et al., 1998). Il semble cependant que les études récentes réalisées sur la faune ou via des nouveaux outils de détection vont dans le sens du caractère génotoxique de l'atrazine (A. M. Nowicka et al., 2010 ; M Singh et al., 2008 ; L. S. Zhu et al., 2011). Pour ce caractère contradictoire, il fut donc écarté de l'étude.

Cependant, de même que les autres composés sélectionnés, l'atrazine a subi au préalable une série de tests toxicologiques comprenant l'utilisation des biomarqueurs de TEM, les marqueurs du cycle cellulaire, les marqueurs apoptotiques, ainsi que les principales voies de transduction pouvant être impliquées durant la cancérogenèse. D'après des tests de viabilité, et en accord avec les résultats de A. Jondeau et al., 2006, l'Atrazine n'induit pas de cytotoxicité même à forte dose, 500µM étant la limite de solubilité du composé dans le DMSO. A cette même concentration, nous avons tout d'abord été alertés par son potentiel apoptotique. En effet, nous avons noté l'augmentation de l'activité Caspases-3/-9 à 48h, et de manière plus précoce une tendance pro-apoptotique avec le net accroissement de l'expression de la protéine Bax dès 4h de traitement. Mais le résultat le plus marquant, hormis l'augmentation de l'expression de la protéine régulatrice du cycle cellulaire P21^{waf1} déjà observée par E. R. Powell (2011) sur ce même modèle biologique, était la quasi-totale répression de l'expression génique de *S100A4*. Durant les derniers mois de ma thèse, j'ai donc effectué des tests complémentaires sur cet herbicide dans le but d'avoir une idée plus claire quant à ses effets sur les mécanismes de tumorigénicité.

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) est un herbicide de la famille des triazines utilisé massivement depuis les années 1950 pour combattre les adventices dans de nombreuses cultures. Son utilisation intensive car peu coûteux, associée à sa solubilité

modérée en milieu aqueux a pour conséquence la contamination des principaux cours d'eau et des nappes phréatiques américaines. Cette substance est interdite en Europe depuis 2004 principalement à cause des risques de pollution des eaux souterraines. Il est assimilable par voies orale, dermique et par inhalation. Mais sa faible perméabilité au niveau de la peau fait de l'inhalation et de l'ingestion les deux principales voies d'assimilation par l'organisme. Des études épidémiologiques ont montré qu'il pouvait être associé à des leucémies, des cancers du cerveau, des testicules, de l'estomac et du sein. A contrario, d'autres données n'ont pas montré de corrélations significatives entre cancer et utilisation de cet herbicide (N. Sathiakumar et al., 2011). A ce titre, il est répertorié comme « inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » (groupe 3 CIRC). Cet herbicide est cependant clairement associé à des problèmes endocriniens via entre autre l'augmentation de l'expression des aromatasés, des enzymes responsables du métabolisme hormonal, et ce à concentrations très faibles de l'ordre du micro molaire (N. Laville et al., 2006). Il diminue la qualité du sperme et provoque des malformations congénitales. On suspecte des effets sur le système immunitaire d'être à l'origine de l'augmentation des risques d'infection et de cancers. De manière intéressante, il a été retrouvé dans des tissus hépatiques, ce qui renseigne sur ses capacités à être stocké et bio accumulé. Il est capable d'inhiber l'activité phosphodiesterase induisant alors l'augmentation des niveaux d'AMPc chez les cellules H295R (W. Fan et al., 2007). Il potentialise les effets cytotoxiques de l'Arsenic sur cellules HepG2 et module l'expression des gènes GSTYa, XRE, HMTIIA, CRE, GADD153, GADD45, p53RE, c-fos, GRP78 et RARE, gènes impliqués pour la plupart dans la réparation et la détoxification (Tchounwou et al., 2001). Une étude récente montre que l'Atrazine induit l'augmentation des activités des enzymes du métabolisme CYP3A4, CYP2B6 (mécanisme indépendant de CAR), CYP2A6, CYP1A2 à des concentrations de 10 et 50µM, et le PXR à 50µM seulement et ce sur HepaRG (K. Abass et al., 2012).

Au regard des ses effets répertoriés, peu de données mécanistiques sont cependant disponibles. Dans l'intérêt de faire la lumière sur les impacts moléculaires et cellulaires de cet herbicide sur modèle *in vitro*, et dans le but de soumettre les biomarqueurs de TEM développés sur modèle HCC durant cette thèse à de nouveaux contaminants environnementaux, nous avons choisi de confronter l'atrazine seule au TPA et à une condition TPA + Atrazine. Il s'agit donc de mesurer l'action inhibitrice dirigée contre S100A4 de l'Atrazine sur les processus de migration cellulaire induits par le TPA. Nous avons ainsi montré que l'Atrazine empêchait la phosphorylation de Fak, l'expression de la fibronectine et

de son récepteur l'Itga5, tous induits par le phorbol. De plus, nous avons montré que ces évènements étaient indépendants de l'activation de la voie Erk1/2, normalement nécessaire à la migration cellulaire de la lignée HepG2.

ATRAZINE REPRESSES S100A4 GENE EXPRESSION AND TPA-INDUCED MOTILITY IN HEPG2 CELLS

Ludovic Peyre, Nathalie Zucchini-Pascal and Roger Rahmani.

*Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire des xénobiotiques, INRA, UMR 1331 TOXALIM Sophia Antipolis, 06903 Sophia Antipolis, France.

Correspondence should be addressed to Dr. R. Rahmani

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire et Génomique, INRA, UMR 1331

400 route des Chappes, BP167

06903 Sophia Antipolis, France.

Phone: 33 4 92 38 65 48, Fax: 33 4 92 38 64 01

Email: rahmani@sophia.inra.fr

Abstract: Atrazine (ATZ) is an herbicide still commonly used in the USA. However, this triazine was banned in the EU in 2004 because of many doubts over its effects on the environment and on public health. Our investigations on the role of pesticides in liver dysfunction have led us to detect an inhibition of *FSP1* expression. This gene encodes the protein S100A4 and is a clinical biomarker of epithelial-mesenchymal transition (EMT), a key step in the metastatic process. Here we investigated the possible effect of ATZ on cell migration and noticed that it prevents the EMT and motility of the HepG2 cells induced by the phorbol ester TPA. ATZ seems to affect Fak pathway activation but has no effect on the Erk1/2 pathway known to be involved in metastasis in this cell line. These results suggest that ATZ could be involved in cell homeostasis perturbation potentially through a S100a4-dependant mechanism.

Keywords: Atrazine, S100a4, EMT, migration, HepG2

Abbreviations: Ab, antibody; ATZ, atrazine; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial to mesenchymal transition; Erk1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2; Fak: focal adhesion kinase; FBS, foetal bovine serum; *FNI*, fibronectine; *FSP1*, fibroblast specific protein 1; HCC, Hepatocellular carcinoma; *ITGA5*, integrin $\alpha 5$; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

1. Introduction

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine, ATZ) is a selective triazine herbicide that is slightly soluble in water. In the USA, this xenobiotic is used mainly in corn and sorghum farms to protect crops from broadleaf and grassy weeds. ATZ is the most heavily used pesticide in this nation and can be found at high concentrations in surface and ground water sources as well as in the soil of many agricultural lands (E. R. Powell et al., 2011). ATZ is stable at pH 7 in aqueous media and volatilization from water is minimal. In addition, it is poorly absorbed by suspended solids and sediment. Such physical and chemical properties make ATZ a serious contaminant of surface and ground water (INERIS, technical and economic data on chemicals in France, 2007). ATZ can be absorbed into the blood stream through oral, dermal and inhalation exposure. It is considered as a possible human carcinogen (group C) based on evidence of induction of mammary gland tumor growth in laboratory animals, however data on its carcinogenic potential in humans is lacking (P. B. Tchounwou et al., 2001). In vitro studies have shown an increase in DNA damage induced by atrazine-based herbicide in lymphocytes (D. Zeljezic et al., 2006), endocrine disruption resulting in an increased aromatase expression (N. Laville et al., 2006; J. T. Sanderson et al., 2001), arsenic-dependant potentiation of cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes (P. B. Tchounwou et al., 2001), and growth inhibition of the HepG2 cells at low doses (E. R. Powell et al., 2011). ATZ also induces reproductive effects such as decreased sperm motility and birth defects (M. Betancourt et al., 2006; P. D. Winchester et al., 2009), as well as developmental (D. W. Gammon et al., 2005) and immune perturbations (M. M. Whalen et al., 2003). Some epidemiological studies have linked ATZ to ovarian, prostate, brain, testicular and breast cancer as well as to leukemia and non-Hodgkin's lymphoma (M. C. Alavanja et al., 2003; A. Donna et al., 1989; L. S. Engel et al., 2005; A. J. De Roos et al., 2003; P. K. Mills, 1998; J. C. Schroeder et al., 2001) however other authors believe that more consistent and scientifically convincing evidence is required to support such a causal relationship between exposure to ATZ and human cancers (L. E. Freeman et al., 2011; P. A. Hessel et al., 2004; J. A. Rusiecki et al., 2004; N. Sathiakumar et al., 2011; J. W. Simpkins et al., 2011).

Cell migration is a multistep process that requires stimuli such as cytokines or growth factors to enhance cell movement. Transduction of such a message from the cell receptors inwards increases the activity of the cellular machinery leading to a succession of changes including

the cyclic formation of cytoplasmic protrusions and focal adhesions disruptions, and induction of contractions mainly orchestrated by the RhoGTPases Cdc42, Rac and Rho (F. Entschladen et al., 2011). The Src/Fak pathway is known to be involved in the transduction of the signal from the extracellular matrix to the cytoskeleton. Indeed, it allows the phosphorylation of the PKC proteins and the activation of the RhoGTPases downstream (M. D. Schaller, 2010). Focal adhesion kinase (FAK) also plays a role in adhesion, invasion, proliferation, apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) through the activation of ERK/MAPK and the AKT pathway (J. W. Yam et al., 2009). To allow EMT and facilitate cell movement, an increase in the recycling of integrins occurs (M. Pinzani, 2011) as well as the repression of E-cadherin and the loss of cell-cell adhesions. In such cases, migration is individual and is called amoeboid or mesenchymal (M. Yilmaz and G. Christofori, 2010).

S100a4 is a calcium-dependent protein that is used as a clinical marker of fibrosis and metastasis. Increases in expression of this protein are strongly correlated with an aggressive malignant phenotype but also with inflammatory disease. S100a4 has a large number of partners including cytoskeletal proteins (NMMHC, actin, tropomyosin) or other proteins (S100a1, P53, septins, CCN3, liprin β 1, MetAP2, P37) with which it interacts by heterodimerization. It affects motility through its direct regulation of myosin IIA assembly. Indeed, S100a4 contributes to the dismantling of myosin filaments at the ends of cytoplasmic protrusions which results in the local enrichment of myosin monomers required for the formation of neo protrusions during migration (U. Sack and U. Stein, 2009). S100a4 is also known to affect the function of the LAR family of transmembrane protein-tyrosine phosphatases by binding to liprin β 1 and thereby modulating its cellular adhesion leading to the establishment of a migratory phenotype. It also plays a role in invasion by regulating metalloproteases (MMPs) positively and TIMPs (MMPs inhibitors) negatively both of which involve extracellular matrix (ECM) remodeling. Finally, S100A4 also regulates apoptosis through its effects on p53, a protein involved in modulating the expression of genes such as *Bax* and *P21^{Waf1}* (D. M. Helfman et al., 2005; S. C. Garrett et al., 2006). S100a4 can inhibit the activation by phosphorylation of p53 through PKC as well as physically interact with p53 thereby modulating its regulatory activity (M. Grigorian et al., 2001). On cancer cells, suppression of *S100A4* can however lead to the arrest of cell growth (B. Grum-Schwensen et al., 2005) or to anoikis initiation (W. Shen et al., 2011). S100a4 can also play the role of extracellular paracrine factor thus participating in invasion and angiogenesis. It has an affinity for various unidentified receptors, including the receptor RAGE. Once linked to this receptor,

S100a4 induces the activation of NF κ B and the MAPK pathway, leading to the regulation of target genes involved in angiogenesis and tumor progression (K. Boye et al., 2010). S100a4 expression can be controlled by activation of the TGF β pathway during EMT and by FGF-2 and its transcription level is modulated by β -catenin/Tcf complex activation (M. Schneider et al., 2008).

In this study, high concentrations of atrazine have been used to highlight the molecular events whereas low doses have been used to emulate as much as possible the environmental conditions and demonstrate the major effects of atrazine on the cell phenotype. The aim of this study was to improve our understanding of the molecular events involved and provide evidence to support the link between atrazine and tumorigenesis. Among all EMT biomarkers tested, S100A4 was the only one that was strongly modulated by ATZ and that presented an interest in terms of its role in migration, invasion, angiogenesis and metastasis. To work in metastable conditions, we used the HepG2 cell line and the phorbol ester TPA which has been described as a potent EMT inducer able to initiate migration of HCC cells (C. T. Hu et al., 2008; K. Murata et al., 2009; W. S. Wu et al., 2006). In this way we observed that the herbicide prevented the TPA-induced migration of the HepG2 cells without affecting MAPK/ERK signaling. ATZ appeared to modulate only Fak pathway activation as well as fibronectin and its receptor Itga5.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution, sodium pyruvate and Eagle's non-essential amino acids were from BioWhittaker (Cambrex Company, Walkersville, USA). DMSO (dimethylsulfoxide) and chemicals were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesne, Saint Quentin Fallavier, France). Protein assay materials were from Bio-Rad. All fluorescence reagents were from Molecular Probes (Eugene, OR). The herbicide atrazine was from Sigma Aldrich. The antibodies Fak, p-Fak, Erk2 and p-Erk1/2 used for western blotting experiments were from Cell Signaling. Cells were visualized with a Nikon Eclipse TE2000 phase contrast microscope.

2.2 Cell culture and drug treatments

HepG2 cells were maintained in DMEM with 1% penicillin/streptomycin, 1% non essential amino acids and sodium pyruvate, and 10% FBS, in humidified atmosphere at 37°C containing 95% O₂ and 5% CO₂. After washing with sterile phosphate buffer saline (PBS), cells were detached by trypsinization (trypsin/EDTA) and plated at a concentration of 0.5 - 2 X 10⁶ cells in 6-well plates depending on the experiment. For all experimental conditions, FBS was reduced to 5% in DMEM medium.

2.3 Western blot

HepG2 cells were scraped into a hypotonic buffer (20mM HEPES pH7.5, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.25mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 10µg/ml pepstatin A, 10µg/ml leupeptin, and a phosphatase inhibitory cocktail –PhosphoSTOP, Roche-). The protein concentration in each cell lysate was measured with a BCA Protein Assay Kit (Pierce), with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal protein amounts were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels before being transferred to PVDF membranes. The membranes were then immunoblotted with antibodies

for 1h at room temperature or overnight at 4°C. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G; Promega, Madison, WI, USA) for 2h at room temperature. After washing, the blot was reacted using an ECL detection kit. A signal was acquired using a CDD camera (ChemiGenius2, Syngene) and semi-quantitative analysis was then performed using GeneTools software.

2.4 Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated by acid phenol extraction. One microgram of total RNA was reverse transcribed using a kit (SuperScript II; Invitrogen Corp, Carlsbad, California) following the manufacturer's instructions. The resultant complementary DNA was diluted 100-fold (conditions set to obtain 98% efficacy), and for each gene (target genes *S100A4*, *ITGA5*, *FNI*, *P21^{waf1}* and *ALBUMIN*, or reference gene *GAPDH*) and each condition (DMSO, atrazine, TPA, TPA+atrazine), a mixture of Taq polymerase, 6.4 mmol/L of magnesium chloride, deoxynucleotide triphosphate, primer, and the probe (<https://www.roche-applied-science.com>) was added. The cDNA was then amplified in a thermocycler (LightCycler 480; Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) for 45 cycles using conditions of 95°C and 60°C for 10 seconds each. Commercially available software (LightCycler 480; Roche Applied Science) was used for relative quantitative analysis.

2.5 Cell migration assay

At 90 % confluence HepG2 cells were trypsinized and 3×10^6 of cells per well were added to a 6 well plate. After 24h of incubation, the confluent tissue formed was scratched 4 times per well with a sterile pipette tip. Cells were washed twice with PBS medium then treated with 0.25% DMSO, 100 nM TPA, 25 or 250 μ M atrazine and cotreatment TPA+atrazine at the same concentrations in a DMEM medium depleted with 5% FBS. Images were taken immediately with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CDD camera (ORCA-ER Hamamatsu Photonics) via NIS-Elements AR 2.30 software at 4x magnification. Twenty-four hours later, the cell migration progress was photographed in the same conditions and all data

were treated with the TScratch software tool developed for automated analysis of monolayer wound healing assays as described by T.Gebäck et al., 2009.

2.6 Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times. Data shown are an average \pm standard deviation (SD). Statistical analysis of *in vitro* studies was performed using a Student's t test. Levels of probability are indicated as *P<0.05 or **P<0.01.

3. Results

3.1 Atrazine represses TPA-induced phenotype changes and modulates *S100A4* gene expression

We firstly observed by microscopic analysis morphological changes in HepG2 cells after 24h of 100 nM TPA, with the apparition of characteristic fibroblast-shaped cells not detectable in the control condition with DMSO (fig 1A). We also tested two non toxic concentrations of the herbicide atrazine (50 and 250 μ M) and detected no major changes in cell shape. However, when cells were co-treated with 100 nM TPA and 50 or 250 μ M atrazine, they displayed a less well-defined mesenchymal shape in contrast with those treated with TPA alone, leading us to suspect that atrazine may repress its action. Interestingly, atrazine also prevented the TPA-induced decrease in gene expression of *ALBUMIN*, a hepatocyte marker for differentiation.

A preliminary transcriptomic analysis focusing on EMT biomarkers, revealed a dose-response inhibition in the gene expression of the clinical and metastasis marker *S100A4*. This down regulation was significant at 48h with 50 μ M atrazine and repression was almost total at high concentration (500 μ M).

3.2 Atrazine represses *S100A4* overexpression and migration induced by TPA

S100a4 has been implicated in the migration of cancer cells where it is found overexpressed. We therefore wondered whether atrazine was able to prevent the TPA-induced modification of *S100A4* expression. While 24h of TPA 100 nM led to a strong 9 fold increase in levels of *S100A4*, co-treatment of TPA and the herbicide limited this increase to 2 and 2.5 fold depending on the concentration of atrazine: 250 and 50 μ M respectively.

Based on these findings we hypothesized that atrazine may be able to prevent TPA-induced cell migration. To investigate this, we used the wound healing assay and observed that a low concentration of the herbicide (50 μ M) reduced by 50% the TPA-induced migration of the HepG2 cells. A high concentration (250 μ M) was sufficient to significantly abrogate the effect of TPA on HepG2 cell migration.

3.3 Atrazine decreases the phosphorylation of Fak but does not alter the activation of Erk1/2 induced by TPA

During cell migration, activation of the Fak pathway can lead to the downstream activation of the ERK/MAPK pathway. HepG2 cell migration has also been shown to be mainly governed by the early activation of the Erk1/2 pathway (S. Kodama and M. Negishi, 2011; R. G. Romanelli et al., 2006; M. K. Song et al., 2011).

With this in mind, we decided to investigate the modulations of Erk1/2 and Fak phosphorylation on tyrosine 925 and thus verify whether the observed effects of atrazine were ERK-dependant. While 100 nM TPA alone was sufficient to activate both pathways, 4h co-treatment with atrazine (25 and 250 μ M) only affected Fak phosphorylation. Indeed, as shown on densitometry, the atrazine repressed the TPA-induced increase in Fak phosphorylation without affecting the Erk pathway thus indicating a ERK/MAPK pathway independent mechanism of action.

3.4 Atrazine limits the TPA-dependant increase of *ITGA5* and *FNI* gene expression and potentiates the overexpression of *P21^{waf1}*.

During EMT and cancer cell migration, the overexpression of mesenchymal extracellular compounds, such as fibronectin, is linked to an upregulation of their specific integrin receptors, in this case *Itga5*.

We noticed that TPA was able to induce both *FNI* and *ITGA5* overexpression. Interestingly, atrazine partially though nevertheless significantly repressed this overexpression at 48h and at a high concentration (500 μ M). Indeed, we noticed a much reduced moderate overexpression (6 fold) of the *ITGA5* gene when HepG2 cells were co-treated with TPA and atrazine by comparison with the expression levels following treatment with TPA alone (10 fold). In the same way, the overexpression of *FNI* induced by TPA alone (2.0 fold) was repressed following co-treatment with atrazine to 1.4 fold.

The repressor of Cdk proteins *P21^{waf1}* acts as a cell cycle inhibitor and induces cell growth arrest. Atrazine has been shown to induce such an event by increasing the *P21^{waf1}* expression in HepG2 cells (E. R. Powell et al., 2011). In concordance with this observation, we found that at a high concentration (500 μ M) atrazine increased *P21^{waf1}* expression by 3.6 fold. TPA alone was found to do the same by increasing *P21^{waf1}* expression by 6.1 fold. Co-treatment led to a strong increase of 16.5 fold in *P21^{waf1}* expression, suggesting a possible consequential arrest of cell growth following contact with the two chemicals.

4. Conclusion

An increase in *S100A4* expression levels has previously been correlated with cell migration (S. R. Jenkinson et al., 2004), invasion of hepatocellular carcinoma (H. Y. Zhang et al., 2012), metastasis in vitro (J. F. Cui et al., 2006) and poor prognosis in patients with HCC (H. Kim et al., 2011). Complementary data have shown that *S100A4* down regulation or repression suppresses cell growth and invasion in different types of cancer (M. Fujiwara et al., 2011; B. Grum-Schwensen et al., 2005; L. Huang et al., 2012; T. Tabata et al., 2009). In the present study, *S100A4* was shown to be modulated by ATZ in a dose-dependent manner. While the exact mechanisms behind its genic regulation remain obscure, *S100A4* is reported to be involved in several diseases such as rheumatoid arthritis, kidney and liver fibrosis or neural disease. Since it is also involved in metastasis where it is highly expressed (S. K. Mishra et al., 2011) we investigated the effect of ATZ on *S100A4* gene expression and on HepG2 cell phenotype and their ability to migrate. For the first time, we have revealed an original *in vitro* relationship between the herbicide atrazine suspected as being a risk to human health, and inhibition of *S100A4* expression positively correlated with human cancer progression.

TPA dedifferentiated HepG2 cells as demonstrated by their fibroblastic-like shape revealed by microscopy and through the downregulation of *ALBUMIN* gene expression. This marker is only expressed in the liver by hepatocyte cells and closely correlates its differentiation (J. G. Hengstler et al., 2005). HepG2 cancer cells maintain many of their original epithelial characteristics and function similarly to well-differentiated hepatocytes (J. H. Kelly and G. J. Darlington, 1989). Modulation of *ALBUMIN* gene expression seems to be a good indicator of HepG2 dedifferentiation. Interestingly, ATZ was able to prevent the morphological changes induced by TPA. It also had an inhibitory effect on HepG2 cell migration, Fak activation and overexpression of the mesenchymal markers *S100A4*, *FNI* and its specific receptor *ITGA5*. This would suggest that ATZ could act as a potential repressor of the EMT process by an as yet unknown mechanism. ATZ has been shown to interact with biomembranes and to induce lipid peroxidation as well as an increase of the expression of three connexins Cx26, Cx32 and Cx43 (F. D. Campos-Pereira et al., 2012). We postulate that the observed increase in expression of connexins in this study in response to ATZ-dependent liver damage could protect cells from loss of intercellular junctions and EMT.

Moreover, the increase of connexins could result in an increase in calcium transport across the membrane (E. Decrock et al., 2011) ultimately leading to the arrest of cell growth (C. L. Liu et al., 2009). In the present study, we investigated the possible role of ATZ in cell cycle arrest. Indeed, many studies have linked ATZ with inhibition of cell growth (S. O. Abarikwu et al., 2011; M. K. Manske et al., 2004), also on HepG2 cell line (E. R. Powell et al., 2011). We identified a strong overexpression of *P21^{waf1}* when cells were co-treated with TPA and ATZ compared to lower levels of upregulation found in single conditions (ATZ or TPA). This overexpression could lead to higher levels of cell growth inhibition to those observed in such single conditions (W. Wen-Sheng, 2003 and 2006; W. S. Wu et al., 2001). In cancer cells, suppression of *S100A4* may lead to cell growth arrest (B. Grum-Schwensen et al., 2005) or to the initiation of anoikis (W. Shen et al., 2011). In a previous study, we showed that HepG2 cells are resistant to anoikis (L. Peyre et al., in preparation). *S100A4* repression and *P21^{waf1}* upregulation could be two additional events that lead to HepG2 cell growth arrest in response to ATZ.

S100a4 has been shown to interact with different cytoskeleton partners such as F-actin, tropomyosin and the heavy chain of the nonmuscle myosin II (K. Boye and G. M. Maelandsmo, 2010). These interactions are crucial for cytoskeleton rearrangement and cell motility during metastasis (S. C. Garret et al., 2006). Indeed, *S100a4* activity has been reported to promote disassembly of myosin-II filament, to increase directional motility and to affect actin–myosin contractility by direct binding to F-actin (D. M. Helfman et al., 2005). Repression of this calcium dependent protein by ATZ would be expected to have negative consequences on all of these events and thus on the motility of HepG2 and other cancer cells (M. F. Olson and E. Sahai, 2009). Additional data showed that ATZ can deregulate the expression of *ACTB* coding for cytoskeleton proteins Actins and involved in various types of cell motility (J. P. Lasserre et al., 2009). Actin interacts with *S100a4* suggesting that its downregulation could be a supplementary point in favor of the repression of cell migration when hepG2 cells are co-treated with TPA and ATZ.

Integrins are transmembrane heterodimeric receptors that promote interactions between cytoskeleton proteins and the ECM, and allow signal transduction between cells and their microenvironment (J. W. Yam et al., 2009). We found that co-treatment with TPA and ATZ prevent the overexpression of *ITGA5* observed following treatment with TPA only. In gastric cancer cells, repression of *S100A4* results in a decrease in integrin $\alpha 5$ expression (W. Shen et

al., 2011). Here we observed the same correlation between *S100A4* and *ITGA5* thus indicating the involvement of the same interaction. This integrin plays a key role in the EMT process (S. Maschler et al., 2005; E. H. Nam et al., 2012). Its increased expression is linked to an increase in levels of its natural ligand fibronectin, and correlates with the initiation of the cellular migration process (A. Bianchi et al., 2010). Here we also observed when cells are co-treated with TPA and ATZ, a significant repression of the *FNI* upregulation induced by TPA alone. Moreover, integrins mediate the transduction signal via focal adhesion protein (Fak). Phosphorylation of Y925 is associated with integrin adhesion and E-cadherin deregulation during Src-induced epithelial mesenchymal transition in colon cancer cells (V. G. Brunton et al., 2005) and with Erk activation in human 293 kidney epithelial cells (D. D. Schlaepfer and T. Hunter, 1997). Apart from the ATZ-induced increase in the basal levels of total protein Fak as compared to the DMSO control condition, we noted that ATZ decreased the activation of this pathway when co-treated with TPA. ATZ thus seems to perturb the expression of key proteins necessary for cancer cell migration. It prevents the effects of TPA on *FNI*, *ITGA5* and p-Fak overexpression.

Finally, *S100A4*^{-/-} knockout mice have been shown to develop spontaneous tumors including non-metastatic hepatocellular carcinoma (C. El Naaman et al., 2004). The proposed explanation is based on the fact that *S100A4*^{-/-} tissue tumors are P53 positive, but the function of P53 is altered. Under genotoxic stress, such mutated cells are not eliminated by apoptosis thus allowing their selection and leading to the formation of cancer. Here ATZ could have an important role: by repressing *S100A4* gene expression, ATZ could induce such a selection harmful to the organism by promoting the development of spontaneous tumors. Although we have demonstrated the non-metastatic effects of ATZ, repression of *S100A4* induced by this herbicide is a concern that warrants further investigation.

5. Figure legends

Fig. 1

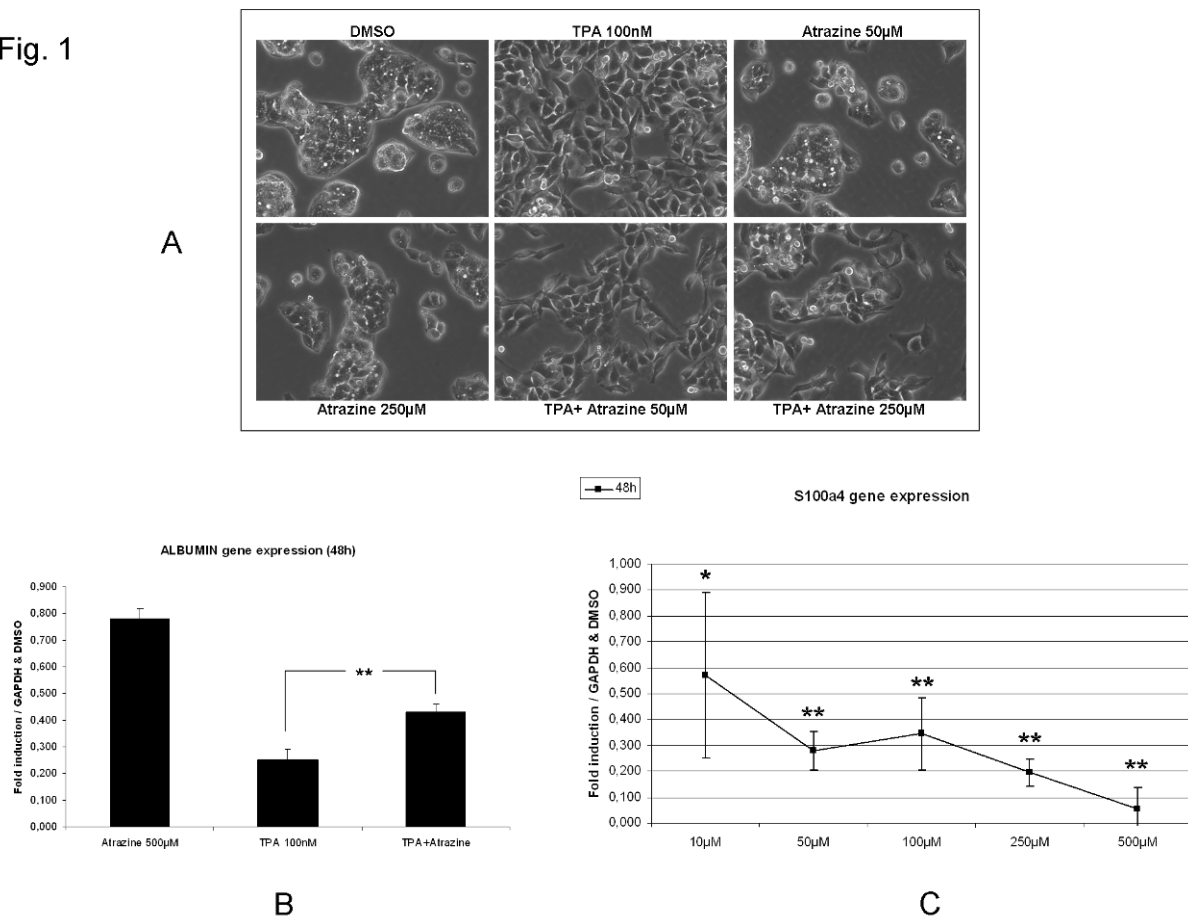


Figure 1. Atrazine represses the TPA-induced phenotype changes and modulates S100A4 gene expression. A, HepG2 cells exposed to 100 nM TPA alone, 50 or 250 µM atrazine alone, and co-treatment with 100 nM TPA and 50 or 250 µM atrazine for 24h. Cell morphology was examined under a light microscope. B and C, changes in mRNA levels for the EMT-related *S100a4* and the hepatocyte biomarker *albumin* genes were assessed by real-time RT-PCR. Cells were treated 48h with 100 nM TPA with or without 500µM atrazine (B), and 48h with increasing concentrations of atrazine from 10 to 500µM (C).

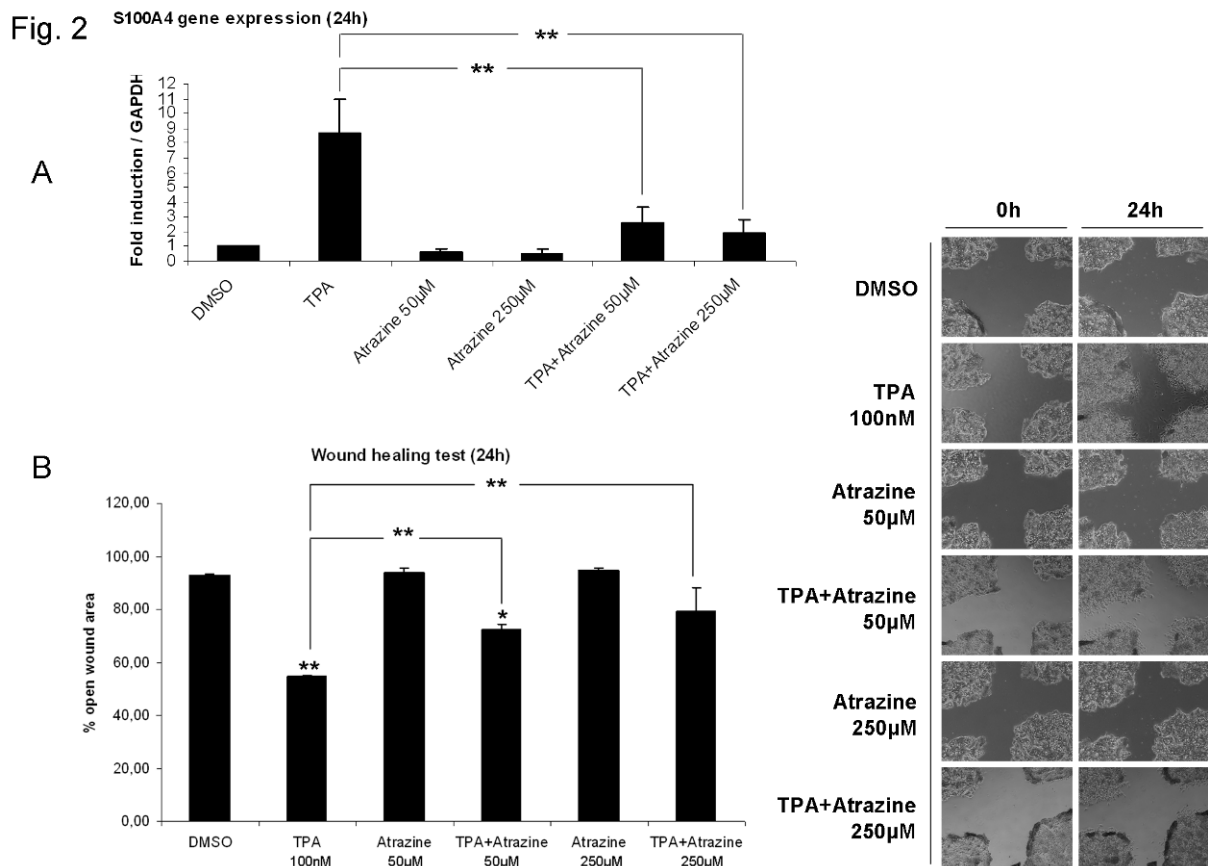


Figure 2. Atrazine represses S100A4 overexpression and TPA-induced migration in HepG2 cells. A, S100A4 (FSP1) mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 24h of TPA treatment, with or without atrazine (50 and 250µM). Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated condition were set to 1. B, percentages of open wound area at 24h, in each condition set, as in A, were plotted, with wound width normalized with respect to the initial value 0h. Error bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Fig. 3

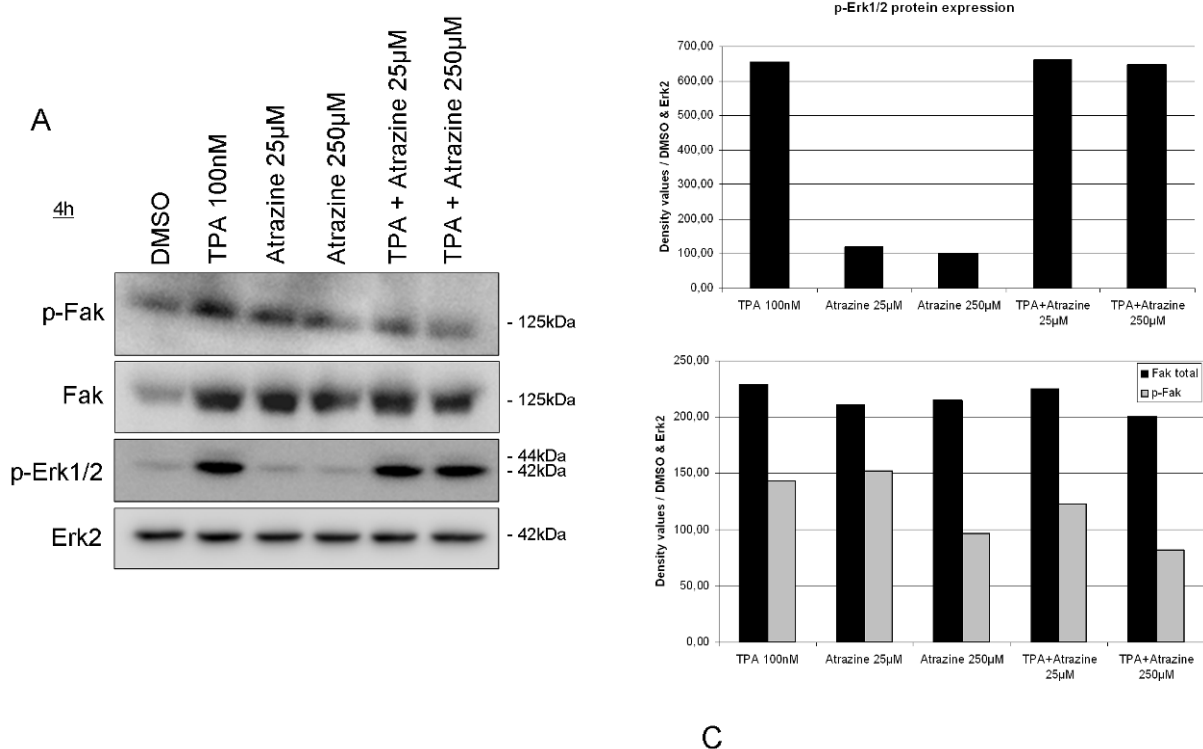


Figure 3. Atrazine decreases the Fak phosphorylation but has no effect on the Erk1/2 activation induced by TPA. A, HepG2 cells were exposed to 100 nM TPA alone, 25 or 250 µM atrazine alone and co-treatments of TPA 100 nM and atrazine (25 or 250 µM) for 4h. Cells were lysed and subjected to western blotting, as described in section 2. The Fak and the Erk1/2 signaling pathways were studied by analyzing the phosphorylation of Fak on tyrosine 925 and Erk1/2 on threonine 202 / tyrosine 204 respectively, together with total Fak and Erk2 protein levels. B and C, band intensities were assessed by densitometry after image acquisition with a CDD camera and the results are presented as the ratio between the values for treated cells to that for DMSO-treated cells, both values being normalized according to Erk2. The data presented is representative of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Fig. 4

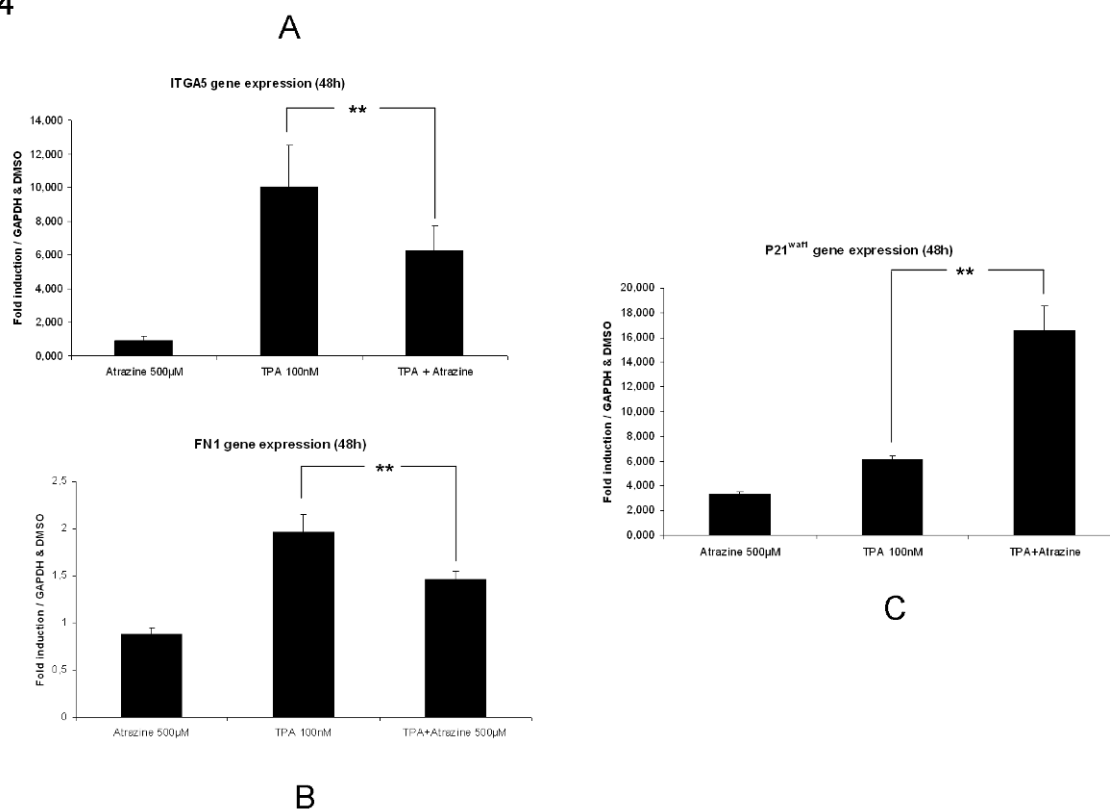


Figure 4. Atrazine limits the TPA-dependant increase of ITGA5 and FN1 gene expression and potentiates the P21^{waf1} overexpression. *Itga5* (A), *Fibronectin* (B) and *P21^{waf1}* (C) mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48h of TPA 100 nM alone, atrazine 500 µM alone and co-treatment with TPA and atrazine at the indicated concentrations. Relative mRNA expression levels (normalized with respect to *gapdh*) were determined and mRNA levels in DMSO-treated condition were set to 1. Error bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

6- References

Abarikwu, S.O., Farombi, E.O. and Pant, A.B. (2011) Biflavanone-kolaviron protects human dopaminergic SH-SY5Y cells against atrazine induced toxic insult. *Toxicol In Vitro* 25, 848-858.

Alavanja, M.C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C.F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J.A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D.P. and Blair, A. (2003) Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* 157, 800-814.

Betancourt, M., Reséndiz, A. and Fierro, E.C. (2006) Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol* 22, 508-512.

Bianchi, A., Gervasi, M.E. and Bakin, A. (2010) Role of β 5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF- β . *Cell Cycle* 9, 1647-1659.

Boye, K. and Maeldandsmo, G.M. (2010b) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol* 176, 528-535.

Brunton, V.G., Avizienyte, E., Fincham, V.J., Serrels, B., Metcalf, C.A., Sawyer, T.K. and Frame, M.C. (2005) Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 65, 1335-1342.

Campos-Pereira, F.D., Oliveira, C.A., Pigoso, A.A., Silva-Zacarin, E.C., Barbieri, R., Spatti, E.F., Marin-Morales, M.A. and Severi-Aguiar, G.D. (2012) Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. *Ecotoxicol Environ Saf* 78, 170-177.

Cui, J.F., Liu, Y.K., Zhang, L.J., Shen, H.L., Song, H.Y., Dai, Z., Yu, Y.L., Zhang, Y., Sun, R.X., Chen, J., Tang, Z.Y. and Yang, P.Y. (2006) Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro. *Proteomics* 6, 5953-5961.

De Roos, A.J., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Holmes, F.F., Burmeister, L.F. and Blair, A. (2003) Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup Environ Med* 60, E11.

Decrock, E., Vinken, M., Bol, M., D'Herde, K., Rogiers, V., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Bultynck, G. and Leybaert, L. (2011) Calcium and connexin-based intercellular communication, a deadly catch? *Cell Calcium* 50, 310-321.

Donna, A., Crosignani, P., Robutti, F., Betta, P.G., Bocca, R., Mariani, N., Ferrario, F., Fissi, R. and Berrino, F. (1989) Triazine herbicides and ovarian epithelial neoplasms. *Scand J Work Environ Health* 15, 47-53.

EL Naaman, C., Grum-Schwensen, B., Mansouri, A., Grigorian, M., Santoni-Rugiu, E., Hansen, T., Kriajevska, M., Schafer, B.W., Heizmann, C.W., Lukanidin, E. and Ambartsumian, N. (2004) Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene* 23, 3670-3680.

Engel, L.S., Hill, D.A., Hoppin, J.A., Lubin, J.H., Lynch, C.F., Pierce, J., Samanic, C., Sandler, D.P., Blair, A. and Alavanja, M.C. (2005) Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. *Am J Epidemiol* 161, 121-135.

Entschladen, F., Zänker, K.S. and Powe, D.G. (2011) Heterotrimeric G protein signaling in cancer cells with regard to metastasis formation. *Cell Cycle* 10, 1086-1091.

Freeman, L.E., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., Lubin, J.H., Koutros, S., Andreotti, G., Zahm,

S.H., Hines, C.J., Coble, J.B., Barone-Adesi, F., Sloan, J., Sandler, D.P., Blair, A. and Alavanja, M.C. (2011) Atrazine and cancer incidence among pesticide applicators in the agricultural health study (1994-2007). *Environ Health Perspect* 119, 1253-1259.

Fujiwara, M., Kashima, T.G., Kunita, A., Kii, I., Komura, D., Grigoriadis, A.E., Kudo, A., Aburatani, H. and Fukayama, M. (2011) Stable knockdown of S100A4 suppresses cell migration and metastasis of osteosarcoma. *Tumour Biol* 32, 611-622.

Gammon, D.W., Aldous, C.N., Carr, W.C., Sanborn, J.R. and Pfeifer, K.F. (2005) A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag Sci* 61, 331-355.

Garrett, S.C., Varney, K.M., Weber, D.J. and Bresnick, A.R. (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281, 677-680.

Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G. and Lukanidin, E. (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276, 22699-22708.

Grum-Schwensen, B., Klingelhofer, J., Berg, C.H., El-Naaman, C., Grigorian, M., Lukanidin, E. and Ambartsumian, N. (2005) Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* 65, 3772-3780.

Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E. and Grigorian, M. (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92, 1955-1958.

Hengstler, J.G., Brulport, M., Schormann, W., Bauer, A., Hermes, M., Nussler, A.K., Fandrich, F., Ruhnke, M., Ungefroren, H., Griffin, L., Bockamp, E., Oesch, F. and von Mach, M.A. (2005) Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 61-74.

Hessel, P.A., Kalmes, R., Smith, T.J., Lau, E., Mink, P.J. and Mandel, J. (2004) A nested case-control study of prostate cancer and atrazine exposure. *J Occup Environ Med* 46, 379-385.

Hu, C.T., Wu, J.R., Chang, T.Y., Cheng, C.C. and Wu, W.S. (2008) The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2. *J Biomed Sci* 15, 343-355.

Huang, L., Xu, Y., Cai, G., Guan, Z. and Cai, S. (2012) Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 27, 917-922.

Jenkinson, S.R., Barraclough, R., West, C.R. and Rudland, P.S. (2004) S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer* 90, 253-262.

Kelly, J.H. and Darlington, G.J. (1989) Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line Hep G2. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 217-222.

Kim, H., Choi, G.H., Na, D.C., Ahn, E.Y., Kim, G.I., Lee, J.E., Cho, J.Y., Yoo, J.E., Choi, J.S. and Park, Y.N. (2011) Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 54, 1707-1717.

Kodama, S. and Negishi, M. (2011) Pregnane X receptor PXR activates the GADD45beta gene, eliciting the p38 MAPK signal and cell migration. *J Biol Chem* 286, 3570-3578.

Lasserre, J.P., Fack, F., Revets, D., Planchon, S., Renaut, J., Hoffmann, L., Gutleb, A.C., Muller, C.P. and Bohn, T. (2009) Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. *J Proteome Res* 8, 5485-5496.

Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.M. and Aït-Aïssa, S. (2006) Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98-108.

Liu, C.L., Huang, Y.S., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Hu, M.L. (2009) Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chem Biol Interact* 182, 165-172.

Manske, M.K., Beltz, L.A. and Dhanwada, K.R. (2004) Low-level atrazine exposure decreases cell proliferation in human fibroblasts. *Arch Environ Contam Toxicol* 46, 438-444.

Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D.V., Sordat, I., Beug, H. and Reichmann, E. (2005) Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* 24, 2032-2041.

Mills, P.K. (1998) Correlation analysis of pesticide use data and cancer incidence rates in California counties. *Arch Environ Health* 53, 410-413.

Mishra, S.K., Siddique, H.R. and Saleem, M. (2011) S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev.*

Murata, K., Suzuki, H., Okano, H., Oyamada, T., Yasuda, Y. and Sakamoto, A. (2009) Cytoskeletal changes during epithelial-to-fibroblastoid conversion as a crucial mechanism of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 35, 1005-1014.

Nam, E.H., Lee, Y., Park, Y.K., Lee, J.W. and Kim, S. (2012) ZEB2 upregulates integrin $\alpha 5$ expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis* 33, 563-571.

Olson, M.F. and Sahai, E. (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 26, 273-287.

Pinzani, M. (2011) Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? *J Hepatol* 55, 459-465.

Powell, E.R., Faldladdin, N., Rand, A.D., Pelzer, D., Schrunck, E.M. and Dhanwada, K.R.

(2011) Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 25, 644-651.

Romanelli, R.G., Petrai, I., Robino, G., Efsen, E., Novo, E., Bonacchi, A., Pagliai, G., Grossi, A., Parola, M., Navari, N., Delogu, W., Vizzutti, F., Rombouts, K., Gentilini, P., Laffi, G. and Marra, F. (2006) Thrombopoietin stimulates migration and activates multiple signaling pathways in hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G120-128.

Rusiecki, J.A., De Roos, A., Lee, W.J., Dosemeci, M., Lubin, J.H., Hoppin, J.A., Blair, A. and Alavanja, M.C. (2004) Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst* 96, 1375-1382.

Sack, U. and Stein, U. (2009) Wnt up your mind - intervention strategies for S100A4-induced metastasis in colon cancer. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus, F55-64.

Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P. and van den Berg, M. (2001) Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect* 109, 1027-1031.

Sathiakumar, N., MacLennan, P.A., Mandel, J. and Delzell, E. (2011) A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Crit Rev Toxicol* 41 Suppl 1, 1-34.

Schaller, M.D. (2010) Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123, 1007-1013.

Schlaepfer, D.D. and Hunter, T. (1997) Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* 272, 13189-13195.

Schneider, M., Hansen, J.L. and Sheikh, S.P. (2008) S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)* 86, 507-522.

Schroeder, J.C., Olshan, A.F., Baric, R., Dent, G.A., Weinberg, C.R., Yount, B., Cerhan, J.R., Lynch, C.F., Schuman, L.M., Tolbert, P.E., Rothman, N., Cantor, K.P. and Blair, A. (2001) Agricultural risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology* 12, 701-709.

Shen, W., Chen, D., Fu, H., Liu, S., Sun, K. and Sun, X. (2011) S100A4 protects gastric cancer cells from anoikis through regulation of α v and α 5 integrin. *Cancer Sci* 102, 1014-1018.

Simpkins, J.W., Swenberg, J.A., Weiss, N., Brusick, D., Eldridge, J.C., Stevens, J.T., Handa, R.J., Hovey, R.C., Plant, T.M., Pastoor, T.P. and Breckenridge, C.B. (2011) Atrazine and breast cancer: a framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence. *Toxicol Sci* 123, 441-459.

Song, M.K., Kim, Y.J., Song, M., Choi, H.S., Park, Y.K. and Ryu, J.C. (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2)

through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction. *Cancer Sci* 102, 1636-1644.

Tabata, T., Tsukamoto, N., Fooladi, A.A., Yamanaka, S., Furukawa, T., Ishida, M., Sato, D., Gu, Z., Nagase, H., Egawa, S., Sunamura, M. and Horii, A. (2009) RNA interference targeting against S100A4 suppresses cell growth and motility and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 475-480.

Tchounwou, P.B., Wilson, B.A., Ishaque, A.B. and Schneider, J. (2001) Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 222, 49-59.

Wen-Sheng, W. (2003) ERK signaling pathway is involved in p15INK4b/p16INK4a expression and HepG2 growth inhibition triggered by TPA and Saikosaponin a. *Oncogene* 22, 955-963.

Whalen, M.M., Loganathan, B.G., Yamashita, N. and Saito, T. (2003) Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chem Biol Interact* 145, 311-319.

Winchester, P.D., Huskins, J. and Ying, J. (2009) Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. *Acta Paediatr* 98, 664-669.

Wu, W.S. and Hsu, H.Y. (2001) Involvement of p-15(INK4b) and p-16(INK4a) gene expression in saikosaponin a and TPA-induced growth inhibition of HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 183-187.

Wu, W.S., Tsai, R.K., Chang, C.H., Wang, S., Wu, J.R. and Chang, Y.X. (2006) Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. *Mol Cancer Res* 4, 747-758.

Yam, J.W., Tse, E.Y. and Ng, I.O. (2009) Role and significance of focal adhesion proteins in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 24, 520-530.

Yilmaz, M. and Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.

Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V. and Perkovic, P. (2006) Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicol In Vitro* 20, 923-935.

Zhang, H.Y., Zheng, X.Z., Wang, X.H., Xuan, X.Y., Wang, F. and Li, S.S. (2012) S100A4 mediated cell invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via the regulation of MMP-2 and E-cadherin activity. *Mol Biol Rep* 39, 199-208.

Impédance et TEM : des nouveaux outils en toxicologie

Article 5: real time cellular impedance and metastasis biomarkers for the toxicological evaluation of chemicals effects on human cancer cells

Un grand nombre de nouvelles molécules voient le jour chaque année dans le monde. Elles sont généralement destinées à un usage agricole (fongicides, herbicides...), médical (contraceptifs, anti-cancéreux...), domestique (produits ménagers, alimentaires, cosmétiques...), industriel (solvants ...), ou font parti tout simplement de nouveaux matériaux que l'on retrouve dans notre quotidien (retardateurs de flammes polybromés, BPA, PCB, Phtalates, dérivés de matières plastiques...). Malgré les longues années de tests et les contraintes imposées avant leur mise sur le marché, les effets néfastes car inattendus de ces composés peuvent échapper aux contrôles des fabricants et des hautes autorités sanitaires. Ils constituent alors sur le long terme un danger en termes de santé publique et de risque environnemental. La mise en place de nouvelles techniques de détection rapides et fiables en toxicologie représente donc un intérêt majeur tant pour les consommateurs que pour les producteurs. En effet, un produit mis sur le marché et pouvant se révéler nocif avec le temps constitue un simple risque de développement pour le concepteur. Il n'est pas préjudiciable pour ce dernier à condition qu'il prévienne ses utilisateurs et le retire du marché. Cependant, développer de nouvelles méthodes robustes pourrait ainsi permettre au fabricant de commercialiser des composés plus sûrs.

En collaboration avec Galderma R&D, nous avons mené une étude qui vise à développer des biomarqueurs d'effet et d'exposition, suffisamment fiables et prédictifs pour détecter précocement le possible caractère carcinogène des xénobiotiques. Cette étude a été menée *in vitro* sur le modèle biologique humain HepG2, correspondant à une cible majeur d'exposition et d'effet. Nous avons souhaité intégrer à l'expertise toxicologique traditionnelle un nouvel outil innovant mesurant l'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence[®], Roche). Cette technologie mesure de manière non invasive (aucun effet délétère de la technique de détection sur les cellules) l'opposition du tissu cellulaire au passage d'un courant. De manière très sensible, il permet la collecte d'informations en temps réel. Ces données se basent sur des modifications de la morphologie cellulaire, conséquence de l'action de composés sur différents paramètres (activation de récepteurs, perte des adhérences, différenciation,

migration ...). Elles ont été couplées à l'utilisation des biomarqueurs de TEM présélectionnés. Onze composés avaient été choisis pour leur caractère cancérigène génotoxique (Hydroquinone, Carbaryl, Carbendazime, Endosulfan et Atrazine) ou cancérigène non génotoxique (TCDD, p,p'DDE). Les promoteurs tumoraux TPA et BPO ont été utilisés comme contrôle positif et la Dexaméthasone ainsi que le D-mannitol comme contrôles négatifs. Il convenait donc, dans un premier temps, de discriminer les 4 classes grâce à la technologie d'impédance cellulaire en temps réel. Cependant, en l'absence de signatures d'impédance spécifiques à chaque groupe, et de données fiables de génotoxicité (tests incomplets et réalisés à des doses souvent trop élevées), nous avons dû modifier l'étude et le protocole en éliminant 5 composés de la liste originelle (D-mannitol, Dexaméthasone, Atrazine, TPA et BPO) pour ne garder que l'Endosulfan, le Carbaryl, le Carbendazime, le TCDD (Dioxine), l'Hydroquinone et le p,p'DDE.

Dans l'intérêt de rester sur la même problématique, consistant à développer des tests précoces et fiables de cancérogenèse pour l'expertise toxicologique standard, de nouveaux paramètres se sont ajoutés à ce travail, tels que l'utilisation de marqueurs du cycle cellulaire, de marqueurs apoptotiques, et l'intégration de l'activation des principales voies de transduction impliquées dans les événements de cancérogenèse (ERK/MAPK, PI3K/AKT, SMAD/TGF β et STAT3). Cette approche se veut être déterminante dans la discrimination des composés carcinogènes en conditions *in vitro* et à faibles doses. C'est une méthode globale qui prend en compte la modulation de nombreux paramètres durant le HCC, tels que la dérégulation des processus apoptotiques, la modulation des acteurs principaux du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire à travers le processus de TEM. Ces événements peuvent en effet conduire à la progression tumorale et à la formation de métastases. Nous nous sommes focalisées sur les 6 molécules retenues, toutes considérées comme des polluants environnementaux avérés.

La mesure de l'impédance cellulaire nous a permis de dégager avec l'aide de la microscopie et d'un test courant de cytotoxicité (MTT), une dose efficace pour chaque composé. En plus d'être non toxique, elle est la plus faible concentration possible pour laquelle a été observée une modification de l'impédance cellulaire. Sur ce principe, seules trois molécules, l'Endosulfan (20 μ M), le Carbendazime (2.5 μ M) et la Dioxine (10nM) ont montré des modifications dans l'expression génique (E-cadhérine, S100a4, Fibronectine ou ILK) et/ou protéique (Snail1, β -caténine, p-Fak ou Hif-1 α) de biomarqueurs de TEM. Pour autant, seules

l'Endosulfan et la Dioxine présentent une modulation de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire p21^{waf1} et Cycline D1, marqueurs utilisés lors de l'aggravation du HCC. De manière intéressante, ils auraient également d'après le ratio Bcl-x1 / Bax un effet pro-apoptotique. La résistance à l'apoptose peut partiellement s'expliquer via l'expression de XIAP, un inhibiteur caspase également utilisé comme marqueur de la progression tumorale, qui se trouve surexprimé après traitement par l'Endosulfan et le Carbendazime mais pas en condition TCDD. Enfin, ces trois composés chimiques modulent l'activation précoce de certaines voies pro-tumorales. L'Endosulfan est capable d'activer les voies MAPK/ERK, PI3K/AKT, TGF/SMAD et STAT3, de la même manière que le Carbendazime à l'exception de la voie MAPK. Enfin le TCDD n'induirait qu'une activation de la voie PI3K/AKT. Les trois autres composés (Carbaryl, p,p'DDE et Hydroquinone) ne présentent que des conséquences moindres par rapport aux trois précédents, à savoir un effet pro-apoptotique du Carbaryl (10µM) avec l'activation des voies TGF/SMAD et STAT3, un effet également pro-apoptotique du p,p'DDE (5µM) avec la modulation des marqueurs p21^{waf1} et Cycline D1, et un effet anti-apoptotique de l'hydroquinone (10µM) avec la modulation seule de p21^{waf1}.

A partir de ces résultats, nous avons sélectionnés l'Endosulfan et le TCDD. Ces deux composés ont montré le plus de dérégulation concernant les principaux processus impliqués dans la progression tumorale. Ils ont également adopté un phénotype fibroblastique et/ou migratoire en réponse à ces composés. Après utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques à savoir l'U0126 dirigé contre la voie MAPK/ERK1-2, le LY294002 contre la voie PI3K/AKT et le SB431542 contre la voie TGF/SMAD, les résultats indiquent que l'inhibition de la voie ERK abolit la signature spécifique en impédance cellulaire des deux contaminants chimiques. De plus, dans les deux cas, l'inhibiteur empêche l'augmentation de l'expression génique du marqueur Cycline D1. Ces données permettent de mettre en évidence le rôle possible de la voie ERK1/2 lors de la progression tumorale sur HCC en réponse à l'Endosulfan et à la Dioxine. De manière intéressante, cette voie signalétique n'avait pas été détectée comme activée en réponse au TCDD au temps précoce de 4h via la technique de westernblot.

L'utilisation combinée des biomarqueurs de TEM, de marqueurs apoptotiques, de régulateurs du cycle cellulaire, des principales voies pro-tumorales et de la nouvelle technologie d'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence®, Roche) a permis d'estimer de manière originale les effets à faible dose de contaminants environnementaux sur l'aggravation du

cancer hépatique en condition *in vitro*. L'impédance cellulaire s'est avérée être une bonne approche dans le choix des concentrations utiles, permettant ainsi d'écartier des données trop volumineuses et inutiles, et de « screener » un plus grand nombre de molécules d'intérêt.

Real time cellular impedance and metastasis biomarkers for the toxicological evaluation of chemicals effects on human cancer cells

Ludovic Peyre*, Nathalie Zucchini-Pascal*, Anne-Pascale Luzy⁺, Guy Bouvier⁺, Sylvie Barcellini[#] and Roger Rahmani*.

*Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire des xénobiotiques, INRA, UMR 1331 TOXALIM (Research Center in Food Toxicology), 06903 Sophia Antipolis, France.

⁺Galderma R&D, early admet, 06902 Sophia Antipolis, France.

[#]Neomah RT, 400 route des Chappes, 06903 Sophia Antipolis, France.

Correspondence should be addressed to Dr. R. Rahmani

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire des xénobiotiques, INRA, UMR 1331

400 route des Chappes, BP167

06903 Sophia Antipolis, France.

Phone: 33 4 92 38 65 48, Fax: 33 4 92 38 64 01

Email: rahmani@sophia.inra.fr

Abstract

Alongside the continuing rise in use of chemicals in the environment, improvements in the techniques employed to detect or predict the impact of xenobiotics on human health should be used to challenge existing data. We selected six chemicals present in food and environment to gain further insight into their damaging effects on human health. The aim of this work was to combine common protocols used in toxicology with clinical biomarkers of metastasis and the new technology of real time cellular impedance. This comprehensive approach is needed to understand the cellular and molecular processes induced by chemicals during tumor progression and that lead to metastasis. All the biomarkers used in this study are recognized as playing a role in promoting hepatocellular carcinoma (HCC) metastasis. Among them, we used biomarkers of epithelial-mesenchymal transition (EMT), apoptosis and cell cycle regulation, and finally transduction pathways known to play a central role in liver cancer progression. In this work, we wondered whether endosulfan, TCDD, carbendazim, carbaryl, p,p'DDE and hydroquinone were able to induce such a process in the hepatoblastoma cell line HepG2. Using the new technology of real-time cellular impedance we were able to easily determine a low and non toxic concentration of each chemical that had a detrimental effect on cell morphology. Endosulfan seems to deregulate the major key cellular functions. It has been found to modulate all the EMT biomarkers tested such as downregulation of CDH1 gene expression, the gain in expression of the mesenchymal markers S100a4 and ILK, and the activation of the Hif-1 α and Fak pathway. It is followed by carbendazim and TCDD which share fewer but equivalent modulations. Similar to carbaryl, endosulfan and TCDD also induced changes in the apoptotic balance. Among these three chemicals, only endosulfan and TCDD showed changes in the transcription of the cell cycle regulators P21^{waf1} and cyclin D1. Transduction pathways have been activated in response to endosulfan (AKT, ERK, SMAD,

and STAT), carbendazim (AKT, SMAD, and STAT), TCDD (AKT) and carbaryl (SMAD, STAT). Only few cellular modifications were detected with p,p'DDE and hydroquinone that concerned the apoptotic balance and cell cycle regulators. Using pharmacological inhibitors, we also found that the ERK1/2 pathway could be involved in the endosulfan and TCDD effects on HCC cells as observed with the real-time cellular impedance technology. This overview has enabled us to estimate the effects of environmental pollutants on liver cancer aggravation.

Keywords: real-time cellular impedance, hepatocellular carcinoma, metastasis, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis, signal transduction, environmental pollutants.

Abbreviations: Ab, Antibody; DAPI, 4',6'-di-amidino-2-phenyl indole; DMSO, Dimethyl sulfoxide; ECM, Extracellular Matrix; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; EMT, Epithelial to Mesenchymal Transition; ERK1/2, Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2; Fak, Focal adhesion kinase; FBS, Fetal Bovine Serum; HCC, Hepatocellular Carcinoma; Hif-1 α , Hypoxia-inducible factor 1 alpha; IgG, Immunoglobulin G; ILK, Integrin-Linked Kinase; NCI, Normalized Cell Index; PI3K/AKT, Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT; p,p'DDE, *p,p*-dichlorodiphenyldichloroethylene; STAT3, Signal Transducer and Activator of Transcription 3; TCDD, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin; TGF- β , [Transforming Growth Factor](#) beta; XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein.

1. Introduction

The number of xenobiotics such as drugs, pesticides or other persistent pollutants present in the environment continues to rise all over the world. Yet, toxicological assessments are becoming more and more difficult due to the complexity of targeting the chemical(s) responsible for the disease concerned. The first and main problem faced when assessing the effect *in vitro* of a chemical alone or in combination concerns the choice of the concentration. Based on the available epidemiological data, this concentration must reflect as closely as possible that encountered in reality. When such data do not exist, toxicologists usually use cytotoxic assays to estimate concentration ranges of interest by choosing concentrations that fall within the sub-toxic zone. However, such concentrations may be far from those associated with an expected effect and the subtle phenotypic effects observed in response to the chemical may go unnoticed. The aim of the present work was to address these issues and introduce into our standard protocol a new technology based on the measurement of real-time cellular impedance. This tool represents an ideal and complementary approach to solving the abovementioned problems in toxicological assessment thanks to its ability to detect morphologic changes and perturbations in cell junctions or adhesion. It gives a rapidly obtainable overview of the hypothetical effects of each dose and also allows us to select a small number of representative concentrations when the assessment of so many chemicals can be long, expensive and difficult. In addition, this approach permits the observation of early events involving pathway or receptor specific activation. Interestingly, these punctual events would not be observable without such molecular techniques (A. Denelavas et al., 2011).

To address the problems faced when assessing the detrimental effects of chemicals found in the environment on human health, we chose 6 chemicals still routinely used by humans in agriculture or in industry: TCDD, endosulfan, carbendazim, p,p'DDE, hydroquinone and

carbaryl. Some of these chemicals can accumulate up the food chain and are bio accumulated in human tissue. In parallel, we investigated whether these chemicals are able to deregulate apoptosis and cell cycle homeostasis in hepatocellular carcinoma cells, and their ability to induce an epithelial-mesenchymal transition (EMT), three processes involved in carcinoma progression leading to metastasis (J. M. Schattenberg et al., 2011; F. Van Zijl et al., 2011).

The EMT is a complex process comprising a succession of events leading to the loss of epithelial characteristics, in particular the degradation of adherent junctions with the down regulation of E-cadherin following the activation of transcription factors such as Snail1, and the stabilization of β -catenin inducing Wnt/ β -catenin pathway activation (F. Van Zijl et al., 2009). The breakdown of epithelial cell adhesion during EMT is followed by the loss of basolateral polarity (Y. Jing et al., 2011) and by the activation of a survival program. The consequential inhibition of apoptosis requires the intervention of antioxidant genes and survival pathways such as PI3K/AKT and RAS / ERK pathways (I. Fabregat, 2009). Cell survival plays an important role in tumor cell progression and is required for their dissemination via lymphatic and blood system invasion (Y. H. Shi et al., 2008). It requires a double interaction: between the cell and the ECM, and between the same cell and its neighbors. This is possible via the involvement of integrins on the one hand, and of cadherins on the other. The contact between cells and the ECM allows the activation of the ERK pathway and the master survival AKT pathway under the control of Fak and ILK respectively. AKT controls the expression and activation of anti and pro-apoptotic proteins. The acquisition of mesenchymal characteristics (S100a4, fibronectin...) that follows is closely related to a reorganization of the cytoskeleton (stress fibril formation and rearrangement of focal adhesion kinases –FAKs-), with new interactions between cells and the microenvironment (tissue and extracellular matrix) and a gain of migratory and invasive potential through the upregulation of metalloproteinases. Activation of the TGF- β pathway plays a dual role in cancer cells,

allowing maintenance of EMT, migration and angiogenesis (A. Benetti et al., 2008; E. Fransvea et al., 2011). In vitro, among all liver cells, only hepatocytes, cholangiocytes and Stell Hepatic cells (HSC) can initiate an EMT. Since liver is the main target for xenobiotics we chose hepatoblastoma cells and in particular the well-defined epithelial characteristics of HepG2 cells for their high expression levels of the protein markers E-cadherin, Akt and Stat3 (Bryan C. Fuchs et al., 2008).







During metastasis, changes also occur in cell cycle regulation. The increase of P21^{Cip1/WAF1}, an inhibitor of the cyclin dependent kinases (Cdks), promotes cell cycle arrest. P21^{Cip1/WAF1} is known to inhibit the activity of the Cyclin D/CDK4 complex (M. Yamamoto et al., 2006) but it also regulates cell proliferation, differentiation and apoptosis. Activation of P21^{Cip1/WAF1} can be directed by S100a4 or by its target the P53 protein and leads to repression of Cyclin D1 protein expression (D. M. Helfman 2005). In concordance with the link between EMT and the cell cycle, the EMT transcription factor Snail1 in cooperation with Twist has been shown to down regulate P21 protein expression (E. Takahashi et al., 2004). P21 is found over expressed in most HCC and its upregulation was found to positively correlate with tumor grade, invasiveness, aggressiveness, and poor prognosis (S. Xu et al., 2011), making P21 a good marker of late stage hepatocarcinogenesis (M. F. Zhang et al., 2009).

Fak protein is also used as a biomarker of EMT. Alongside the complex TCF/LEF/ β -catenin, it regulates the expression of Cyclin D1 via cellular adhesion (J. Van Nimwegen et al. 2006). The activation of Fak through its phosphorylation combined with the increase of Cyclin D1 are linked with fibrosis (C. J. Parsons et al., 2007) making Cyclin D1 a marker of malignancy correlated with recurrence and poor prognosis in HCC (L. X. Qin et al., 2004).

To introduce each xenobiotic, a summary of the major toxicological effects known on human (in vivo and in vitro) have been compiled in the following table 1:

Table 1

resume of major effects induced by the 6 chemicals chose on human health.

| Molecule | Name | Class | Geno-toxicity | Receptors or other proteins affinity | Stress oxydant | Metabolism | Known effects |
|---|---------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------|---|
|  | TCDD | polychlorinated dibenzo dioxin | neg | AhR | pos | CYP1A1 - CYP1A2 - CYP1B1 | inflammatory - Estrogen mimicker - carcinogen - chloracne - teratogenicity - immunotoxicity - neurotoxicity - |
|  | Endosulfan | organo-chlorine pesticide | pos | PXR - RXR - CAR - ER - AR | pos | CYP2B6 - CYP3A4 - CYP3A5 | Estrogen mimicker -neurotoxic - induce intra-cellular calcium influx (malformation, cancer, system disturbances...) |
|  | Carbendazime | benzimidazole fungicid | pos | β -tubuline | ND | CYP2D6 | ECOD inducer - CYP2B6 inhibitor - inhibitor tubulin polymerization - aneugene - anti-proliferator in cancer lines (G2/M arrest) |
|  | Carbaryl | carbamate insecticide | pos | ER - AhR - TR | pos | CYP1A1 - CYP1B1 | hER inhibitor - cholinesterase inhibitor |
|  | p,p'DDE | DDT metabolite | neg | PXR - ER | ND | CYP3A4 - MDR1 | Estrogen blocker |
|  | Hydroquinone | aromatic organic compound -phenol | pos | - | pos | NQO1, MPO | clastogen - carcinogen - haematotoxic |

2. Materials and methods

2.1 Materials

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin solution, sodium pyruvate and Eagle's non-essential amino acids were from BioWhittaker (Cambrex company, Walkersville, MD, USA). DMSO (dimethylsulfoxide), endosulfan, carbaryl, carbendazim and hydroquinone were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesne, Saint Quentin Fallavier, France), p,p'DDE from Chem Service (West Chester, USA) and TCDD from AccuStandard, USA. Protein assay materials were purchased from Bio-Rad, all fluorescence reagents from Molecular Probes (Eugene, OR) and the antibodies used for western blotting and immunodetection experiments from Cell Signaling, Epitomics and Neomarkers (Table 2). Cells were visualized using a Nikon Eclipse TE2000 phase contrast microscope.

2.2 Cell culture and drug treatments

HepG2 cells were maintained in DMEM with 1% penicillin/streptomycin, 1% non essential amino acids, 1% sodium pyruvate and 10% FBS, in humidified atmosphere at 37°C containing 95% O₂ and 5% CO₂. After washing with sterile phosphate buffer saline (PBS), cells were detached by trypsinization (Trypsine/EDTA) and plated at a concentration of 0.5-2 X 10⁶ cells in 6-well plates depending on the experiment. For all experimental conditions, FBS was reduced to 5% in DMEM medium. The mitogen-activated protein kinase (MEK) 1/2 inhibitor U0126 was added at a concentration of 5 μM. All chemicals and pharmacological

inhibitors were prepared as stock solutions in DMSO. The final concentration of DMSO in the medium was 0.25% in all conditions.

2.3 Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using Trizol extraction. One microgram of total RNA was reverse transcribed using SuperScript II (Invitrogen Corp, Carlsbad, California) following the manufacturer's instructions. The resultant complementary DNA was diluted 100-fold (conditions set to obtain 98% efficacy), and for each gene (target genes *CCND1*, *CDH1*, *FNI*, *FSP1*, *ILK*, *P21^{waf1}*, *XIAP* or reference gene *GAPDH*) and each condition, a mixture of Taq polymerase, 6.4 mmol/L of magnesium chloride, deoxynucleotide triphosphate, primer, and probe (<https://www.roche-applied-science.com>) was added. The cDNA was then amplified in a thermocycler (LightCycler 480; Roche Applied Science, Penzburg, Upper Bavaria, Germany) for 45 cycles using conditions of 95°C and 60°C for 10 seconds each. Commercially available software (LightCycler 480; Roche Applied Science) was used for relative quantitative analysis.

2.4 Western blot

Cells were scraped into hypotonic buffer (20mM HEPES pH7.5, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.25mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 10µg/ml pepstatin A, 10µg/ml leupeptin, and a phosphatase inhibitory cocktail –PhosphoSTOP, Roche-). The protein concentration in each cell lysate was measured with a BCA Protein Assay Kit (Pierce), with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal protein amounts were

separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10 or 12% gels and were transferred to PVDF membranes. The membranes were immunoblotted with antibodies (cf. Table 2 for names, origins and concentrations) for 1h at room temperature or over night at 4°C. The membranes were then reacted with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G; Promega, Madison, WI, USA) for 2h at room temperature. After washing, the blot was reacted using an ECL detection kit. The signal was acquired with a CDD camera (ChemiGenius2, Syngene) and semi-quantitative analysis was then carried out with GeneTools software.

Table 2
Primary antibodies used for Western blot and Immunofluorescence staining.

¹: mAb, monoclonal antibody
²: pAb, polyclonal antibody

| Antigen | Phosphorylation site | Source / Type | Manufacturer | Dilution WB | Dilution IF |
|--------------------|----------------------|-------------------------|----------------|-------------|-------------|
| pErk1/2 | Thr202/Tyr204 | Rabbit mAb ¹ | Cell signaling | 1:2000 | |
| Erk2 | | Rabbit pAb ² | Cell signaling | 1:5000 | |
| pGsk3β | Ser9 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| pAkt | Thr308 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Akt | | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| pSmad1/5 | Ser463/465 | Rabbit mAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| pSmad2 | Ser465/467 | Rabbit mAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Smad5 | | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| pStat3 | Tyr705 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Cyclin D1 | | Rabbit pAb | NeoMarkers | 1:2000 | |
| P21waf1 | | Mouse mAb | NeoMarkers | 1:2000 | |
| Bax | | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Bcl-xl | | Rabbit mAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Hif-1α | | Rabbit mAb | Epitomics | 1:2500 | 1:300 |
| pFak | Tyr925 | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Fak | | Rabbit pAb | Cell signaling | 1:2000 | |
| Gapdh | | Rabbit mAb | Cell signaling | 1:15000 | |
| E-cadherin | | Rabbit mAb | Epitomics | 1:5000 | |
| β-catenin | | Mouse mAb | Santa Cruz | 1:2000 | 1:300 |
| Fibronectin | | Rabbit mAb | Epitomics | 1:1000 | |
| Snail1 | | Rabbit pAb | Santa Cruz | 1:1000 | |

2.5 Immunofluorescence

Cells were seeded onto glass slides in 12-well plates (4×10^5 cells per well) and were treated as described in the figure legends. For Hif-1 α , the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with 0.5% saponin. For the structural protein β -catenin, cells were fixed in -20°C methanol and permeabilized with 0.25% triton. In both cases, slides were incubated with antibodies (Table 2) for 1h at room temperature. After washing with PBS, goat anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to AlexaFluor® 594 or 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were added to the slides before incubation in a dark room for 1h at room temperature. Actin cytoskeleton was observed after incubation with phalloidin coupled with AlexaFluor 488 for 5 minutes. Slides were mounted and sealed in ProlongGold antifade reagent (Invitrogen). Observations were performed with an inverted fluorescence microscope (Nikon) equipped with a CDD camera (ORCA-ER Hamamatsu Photonics).

2.6 Real-time cellular impedance

The xCELLigence® system was used according to the manufacturers' instructions (Roche Applied Science (Mannheim, Germany) and ACEA Biosciences (San Diego, CA, USA) ([Roche, 2008](#))). Briefly, $1-2 \times 10^4$ cells/well were added to the 96-well E-plates before being treated 24 hours later with chemicals and/or pharmacological inhibitors in a 5% FBS DMEM medium. Real-time cellular impedance is measured in each well (Cell Index values) and the signal observed via the integrated software (RTCA analyzer). To compare the influence of chemicals on cells, the Normalized Cell Index (NCI_{ti}) was used.

2.7 Enzymatic assays for caspase activity

Caspase activity was assessed by measuring fluorophore (7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (AFC)) release from caspase tetrapeptide substrate *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp (Ac-DEVD) for caspase-3-like activity. Briefly, cells grown in 6-well culture dishes were scraped into ice-cold hypotonic buffer. Cells were lysed by being subjected to three cycles of freezing and thawing. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and equal amounts were mixed with buffer B (312.5mM HEPES, pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3125% CHAPS, and 50 M of relative substrate enzymes). The fluorometric assay detects the shift in AFC fluorescence emission following cleavage from tetrapeptide-AFC, as measured in a fluorometer ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530\text{nm}$).

2.8 Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times. Data shown are an average \pm standard deviation (SD). Statistical analysis of *in vitro* studies was performed using a Student's t test. Levels of probability are indicated: * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$

3. Results

3.1 Real time cellular impedance and microscopy

We first investigated the impact of each compound on HepG2 cell viability to define a sub-toxic concentration range and to avoid any possible proliferation or death process at the used doses (data not shown). Then we chose two non-toxic concentrations for each of our 6 xenobiotics, and finally selected one dose that led to interesting effects on real-time cellular impedance and/or microscopy. We observed an increase in NCI when HepG2 cells were treated with TCDD in contrast with the DMSO condition control (fig.1 A). The results were quite similar between 10 nM and 25 nM, though a greater increase in NCI was observed at 10 nM. Using microscopy, we also noticed changes in cell shape at 10 nM TCDD, a plasticity which could explain the effects observed on real-time cellular impedance. Concerning the pesticide endosulfan, we noticed no phenotypic or cellular impedance changes at a concentration of 2 μ M (fig.1 B). However, at 20 μ M we observed a significant increase in NCI from 30h after treatment. By phase contrast microscopy, we noticed a loss of adherence of many cells, some of which were found partially attached to tissue while others had acquired a fibroblast-like shape with protrusions suggesting that endosulfan, like TCDD, may induce plasticity of HepG2 cells. Whatever the dose of carbaryl used (10 and 75 μ M), the effects were similar according to real-time cellular impedance with an increase of the NCI detected from 24h after treatment (fig.1 C). Carbaryl tended to provoke pro-epithelial effects on HepG2 cells when observed on microscopy. Indeed, with 10 μ M carbaryl we noticed a more organized growth of the HepG2 cells with stronger cell-cell adherence. Since carbaryl had already been tested on HepG2 cells at 10, 50 and 100 μ M for its endocrine disrupting activity (H. Sun et al., 2008) and at 100 and 250 μ M for its metabolic and oxidative stress

activity (C. Delescluse et al., 2001), we concluded that 10 μ M should be used throughout rest of our investigation consistent with our commitment to work at low doses. Concerning carbendazim, we chose the concentration of 2.5 μ M for our investigation because the transitory dose of 10 μ M between toxicity and non toxicity induced a decrease in NCI comparable to that with DMSO (fig.1 D), indicating a possible and transient arrest of cell growth or the induction of a death process none observed before with the viability test. This point is emphasized by the microscopic observations of floating cells at 10 μ M that are absent at 2.5 μ M carbendazim, arguing in favor of using the lower dose for our later experiments. Indeed, we observed an increase in the NCI at this lower dose suggesting an effect on cell shape in response to the fungicide. p,p'DDE, a metabolite of the DDT, was also tested at the non toxic concentrations of 5 and 50 μ M. At 48h after treatment with p,p'DDE, NCI increased to a level higher at the lower concentration, with no well defined phenotypical changes in HepG2 cells (fig.1 E). Finally, two doses of hydroquinone were tested using real-time cellular impedance and microscopy (fig.1 F). At 10 μ M, no changes in NCI were observed whereas an increase was noticed for a concentration of 50 μ M. We decided to use the first and lower dose as a negative control for our following investigation to connect possible modulations of biomarkers with changes in NCI.

3.2 Modulation of transduction signals and cell cycle regulators

Having chosen a single concentration for each compound of interest through a combination of impedance and cell viability tests as well as phase contrast microscopy, our investigations then concerned the involvement of the major signaling pathways potentially associated with major responses to xenobiotics. Pathways chosen have already been shown as involved in angiogenesis, inflammation, survival or differentiation processed leading to tumor progression

and metastasis. We treated HepG2 cells for 4h and 48h and studied any responses generally observed early in the Erk, Akt, Smads and Stat3 pathways (fig.2 A). While endosulfan induced a transient activation of the Erk pathway, surprisingly, no modulation of the Erk pathway was observed under treatment with TCDD. Both these xenobiotics as well as carbendazim also induced an increase in Akt phosphorylation on threonine 308. This observation was confirmed by the phosphorylation of Gsk3 β , also increased when treated with carbaryl, p,p'DDE and hydroquinone suggesting another pathway involved in the inhibition of the protein Gsk3 β . Endosulfan, carbendazim and carbaryl activated the TGF- β pathway early on through the phosphorylation of Smad1/5 and Smad2. Finally, endosulfan, carbendazim and carbaryl activated the inflammatory pathway Stat3 through its phosphorylation at 4h on tyrosine 705.

Using western blotting (fig.2 B) and quantitative PCR (fig.2 C and D), we next wished to observe the effects of the 6 xenobiotics on the cell cycle regulators P21 and Cyclin D1. These two proteins are also involved in cancer progression and act as biomarkers of cancer prognosis. The expression of cyclin D1 both at the gene and at the protein level was upregulated with TCDD, endosulfan and p,p'DDE. In parallel, we observed the upregulation of P21^{waf1} gene and protein expression after treatment with endosulfan, p,p'DDE and hydroquinone.

3.3 Dysregulation of the apoptotic pathway

In the previous section, we have shown that some transduction pathways may be activated early on in response to the chemical compounds tested. Some of these pathways such as AKT and TGF- β are involved in the regulation of apoptosis. Only TCDD, endosulfan and hydroquinone were able to induce Caspase-3 like activity (fig.3 A). To provide evidence to

support this observation in terms of apoptotic tendency, we analyzed the ratio Bcl-x1/Bax., previously shown to reflect well the extent of cell apoptosis in HCC (Duan X. X. et al., 2005). Among the compounds tested, TCDD and endosulfan showed a pro-apoptotic tendency at 4h, while hydroquinone induced an anti-apoptotic pattern at 4h and at 48h (fig.3 C and D). At 48h, endosulfan, carbaryl and p,p'DDE displayed pro-apoptotic activity (fig.3 D). We decided to illustrate the apoptotic dysregulation potentially induced by the chemicals by monitoring the modulation of two caspase inhibitors, the protein XIAP (fig.3 B) and survivin (data not shown). No modulation of *survivin* gene expression was observed in contrast to *XIAP*, an anti-apoptotic gene and also a HCC marker associated with a higher metastatic potential and cancer recurrence in patients. We only noticed the increase of the *XIAP* gene expression at 48h when HepG2 cells were treated with endosulfan and carbendazim. Interestingly, neither of these two pesticides showed dysregulation of the apoptotic balance at this time point.

3.4 Effect of xenobiotics on epithelial-mesenchymal transition

Epithelial mesenchymal transition results in a loss of epithelial markers through the activation of specific pathways and transcription factors, and in a gain of mesenchymal characteristics ultimately giving cells the capacity to migrate and invade the surrounding tissue. Firstly using quantitative PCR, we noticed the downregulation of *CDH1* after treatment with TCDD, endosulfan and carbendazim, as well as that of a gene coding for the epithelial marker E-cadherin, the main protein of the adherent junctions (fig.4 A). Endosulfan, carbendazim, carbaryl and hydroquinone also induced early stabilization of β -catenin yet activation and translocation of β -catenin into the nucleus was only detected with endosulfan using immunofluorescence (fig.4 C). We noticed stabilization of HIF-1a with TCDD, endosulfan, carbendazim and carbaryl (fig.4 B) though its activation and translocation into the nucleus

again with endosulfan only (fig.4 C). Finally, we observed an increase of Snail1 protein expression at 4h after endosulfan treatment only (fig.4 B), a phenomenon that could explain the down regulation of CDH1 gene expression.

Using quantitative PCR, we then observed the modulation of three mesenchymal genes involved in the process of EMT: the *FSP1* gene encoding the clinical marker S100A4 (fig.5 A), *FNI* gene encoding the extracellular matrix protein fibronectin (fig.5 B) and *ILK* gene, encoding the integrin-linked kinase which participates in Akt activation through integrin engagement (fig.5 C). Endosulfan at 24h (data not shown) and carbendazim modulated gene expression of *FSP1*, whereas fibronectin was induced by endosulfan only. Regarding the ILK gene expression, it appears that both endosulfan and carbendazim induced its increase. Finally, we investigated whether the compounds could induce the activation of the Fak pathway involved in the EMT process and essential for cell migration (fig.5 D and E). To this end, we decided to compare the level of total Fak protein with its phosphorylated form. We noticed an increase in the activation when HepG2 cells were treated with TCDD and endosulfan whereas p,p'DDE and hydroquinone were associated with low levels of phosphorylation.

3.5 Pharmacological inhibitors and cellular impedance

Finally, we tried to determine whether the pathways involved in the response to xenobiotic treatment were specific to the impedance profile observed. We selected endosulfan, carbendazim and TCDD. The three compounds found to activate the pathways involved in cancer progression and enhance detection of biomarkers of EMT and cell cycle. We made the hypothesis that by inhibiting the cellular transduction pathways with a specific inhibitor, we could both repress the cell impedance profile and block the dependent modulations of

associated markers. We first verified that each specific inhibitor, 5 μ M U0126 for the ERK/MEK pathway, 10 μ M LY294002 for the PI3K/AKT pathway and 10 μ M SB431542 for the TGF- β pathway, had no effect during the first 48h of treatment on the HepG2 cells (data not shown). Then, focusing on the ERK pathway, we were able to inhibit the TCDD and endosulfan impedance profiles of HepG2 with the ERK/MEK inhibitor (fig 6 A and C) whereas no effect was detected following co-treatment with carbendazim and inhibitors (data not shown). Interestingly, the real-time cellular impedance under the influence of the pharmacological inhibitor allowed us to detect the activation of the ERK pathway with TCDD whereas it was undetected at 4h via western blot. Supplementary data showed that the U0126 prevents the increase of the *CCND1* gene in response to TCDD and endosulfan (fig.6 B and D), suggesting the deregulation of its expression induced by the two chemicals could be Erk1/2 dependant.

4. Discussion

Here we used for the first time the combination of EMT biomarkers, apoptotic proteins, cell cycle regulators and the new technology xCELLigence® (Roche) based on cellular impedance to investigate the effect of xenobiotics at low and non toxic doses. The aim of this work was to introduce to the classic toxicologic protocol new tools to predict possible tumor promoting effects leading to metastasis. To validate this work we used cellular impedance as an indicator of cellular and morphologic changes in response to six compounds. We chose a range of EMT biomarkers commonly used in HCC and corroborating *in vitro* cell culture. To further validate our findings we also studied cell cycle regulators (P21^{waf1} and cyclin D1), caspase-3 activity and pro- and anti-apoptotic proteins (Bax, Bcl-x1, XIAP), known to be deregulated during cancer progression.

We have shown that endosulfan, TCDD and carbendazim induce similar molecular and/or cellular changes to HepG2 cells, in terms of plasticity and dysregulation of cell homeostasis, leading to us propose that these compounds may be involved in cancer progression or at least permit an increase in the carcinogenic potential. Among these three compounds, only endosulfan seemed to be able to activate both the SMAD and ERK pathways. Interestingly, the cooperation between TGF- β and MAPK was shown to be crucial for EMT induction and hepatocyte survival (F. V. Zijl et al., 2009). Generally, the activation of the SMAD pathway on cancer cells, such as that observed after endosulfan, carbendazim and carbaryl treatment on HCC, is linked to the deregulation of homeostasis and the promotion of cancer progression through EMT induction (S. Jain et al., 2010). We also noted that endosulfan, carbendazim and carbaryl were able to activate the Stat3 pathway involved in the production of cytokines responsible for tumor maintenance and progression, while TCDD, endosulfan and carbendazim increased the level of Akt phosphorylation. As each of these compounds

activates either the ERK or the AKT pathway, and as we know already that activation of the JAK/STAT pathway may activate either ERK or AKT pathways with pro-inflammatory consequences (J. Radtke et al., 2010), we can hypothesize that endosulfan, carbendazim and carbaryl may be involved in liver inflammation leading to cancer progression. Together, these results allowed us to distinguish among the six chemicals tested that four of them (TCDD, endosulfan, carbendazim and carbaryl) are able to deregulate the cellular homeostasis of HepG2 cells at non-toxic concentrations.

Concerning the cell cycle regulators P21 and cyclin D1, and the apoptotic balance, we observed that p,p'DDE and hydroquinone had effects on these processes. By deregulating the apoptotic homeostasis, they may be able to perturb the cell cycle through modulation of P21. However endosulfan and TCDD treatment has similar effects on the cell cycle and apoptosis as that shown following treatment with p,p'DDE and hydroquinone. Endosulfan and carbendazim also induce the increase of *XIAP* gene expression which in HCC cells is correlated with metastasis and resistance to apoptosis (Y. H. Shi et al., 2008). *XIAP* also inhibits caspases activities, which perhaps helps explain the absence of apoptosis at 48h following treatment of HepG2 cells with endosulfan considering the upregulation in *XIAP* noticed at 4h.

With the use of EMT biomarkers, we were able to confirm a major deregulation induced by the chemicals tested. Indeed, we noted a downregulation in expression of the *CDH1* gene coding for E-cadherin following treatment with TCDD, endosulfan and carbendazim. With regards the endosulfan and carbendazim treatment effects, this loss of cadherin expression is probably linked to the stabilization and activation of the β -catenin protein. Both compounds are able to induce the overexpression of *FSP1* and *ILK* whereas endosulfan alone can increase *FNI* gene expression. *FSP1* coding for S100a4 protein is implicated in proliferation, differentiation, cytoskeleton dynamics, angiogenesis, inflammation and apoptosis (C. El

Naaman et al., 2004) and its expression is strongly associated with metastasis (S. C. Garrett et al., 2006) thus suggesting that the increase we observed with xenobiotics could lead to the progression of cancer. ILK and/or Ras activation–induced inhibition of GSK3 β can also stabilize the level of β -catenin, as we observed with endosulfan, and facilitate EMT (R. Kalluri et al., 2003). Finally we noticed an overexpression of HIF-1 α when HepG2 cells were treated with TCDD, endosulfan, carbendazim and carbaryl suggesting a possible stabilization of the protein. Under normal conditions, HIF-1 α is rapidly degraded due to continuous ubiquitination but under hypoxic conditions, inhibition of such proteasomal degradation is observed (C. D. Mann et al., 2007). However, we only observed a nuclear translocation of HIF-1 α following endosulfan treatment, suggesting that inhibition of its degradation is not sufficient for its activation. The main mechanisms involved in its activation could be the activation of the PI3K/AKT pathway observed both with endosulfan and carbendazim. Concerning TCDD, the question remains open. But with the loss of E-cadherin and the activation of the Fak pathway, both TCDD and endosulfan are two possible candidates for the induction of the EMT process.

Using the real-time cellular impedance technology (xCELLigence, Roche), we were able to introduce pertinent data to our common protocol. This innovative approach enhances the sensitivity of detection and could be crucial for future toxicological investigations when combined with pertinent tools such as EMT biomarkers and a powerful microscope. Impedance curves were generally positive for each compound used in non toxic doses, indicating that the observed effects were the result of cell resistance through possible changes in shape, adherence, membrane transport or cell junctions (S. Diemert et al., 2012; N. Ke et al., 2011; S. Rahim and A. Üren, 2011). Among the six chemicals tested, we choose three of them for the end of our investigation. Endosulfan was banned in Europe following the discovery of a relationship between human disease and its effects on the nervous and

endocrine systems (M. H. Silva and D. Gammon, 2009). However, little information exists concerning its implication in cancer development. Similarly, while TCDD has been classified as a class 1 carcinogen by the IARC, there remain doubts over its effects on human health, in particular since it shows opposite effects depending on its concentration and because most of the studies and available data are based on animal experiments (J. A. Popp et al., 2006; K Steenland et al., 2004). Finally carbendazim is a fungicide that acts on the cell cycle by blocking mitosis via its interaction with microtubules. For these properties, it is under clinical investigation and could be a serious candidate for breast cancer treatment (M. Yenjerla et al., 2009). Here we attempted to provide new evidence concerning endosulfan, TCDD and carbendazim and the risk of cancer aggravation when human cells are exposed to these chemicals at low doses. The effect of the U0126 on the NCI inhibition when HepG2 cells were treated with TCDD and with endosulfan showed a possible involvement of the Erk1/2 pathway in the EMT process in response to these xenobiotics. However, we were not able to detect phosphorylation of the Erk1/2 proteins at 4h when HepG2 cells were treated with TCDD. Nevertheless, 25 nM TCDD stimulates Ras activity and ERK1/2 phosphorylation through the induction of SOS1 (S. Pierre et al., 2011). We worked with a lower concentration (10 nM), then it is possible that the activation of the ERK pathway fell below the limit of detection. It is also possible we missed the activation at 4 hours, a point outside of the activation kinetic. Despite this, the concentration used was sufficient to modulate the Erk1/2-dependant cellular impedance profile and in parallel to induce the Erk1/2-dependant overexpression of *CCND1*. The link between Erk1/2 pathway and the regulation of *CCND1* gene expression has already been shown (C. Jin et al., 2011). We can say that TCDD and endosulfan are two chemicals able to modulate the *CCND1* gene expression through the activation of the ERK/MAPK pathway.

To conclude, we have highlighted the protumorigenic effects of endosulfan, TCDD, carbendazim and carbaryl by demonstrating the dysregulation of the TGF- β pathway through Smads activation and β -catenin cytoplasm stabilization or loss. These two events in HCC could together lead to the induction of EMT and cancer cell survival (I. Fabregat, 2009). Secondly, the phosphorylation of STAT-3 and AKT after treatment with all 4 of these compounds is evidence in favor of a conferred resistance to apoptosis, an event associated with the development and progression of tumors in the liver (I. Fabregat et al., 2007). The induction of caspase activity and the modulation of the expression of apoptotic proteins (XIAP, Bcl-xl, Bax) is a third point allowing us to reasonably presume that these chemicals can alter the function of apoptosis and contribute to resistance to chemotherapy. All four compounds confer a higher carcinogenic potential to HepG2 cells. Endosulfan, TCDD and p,p'DDE also increase cyclin D1 protein expression. This cell cycle regulator correlates with tumor relapse and is an independent predictive marker for recurrence and prognosis of HCC (L. X. Qin et al., 2004). This holds true for P21 protein overexpression induced by the same chemicals and hydroquinone. We have gathered here much evidence to support the pro-tumor effects that could result in EMT after chronic exposure to chemicals. At the very least we can conclude that a full induction of EMT occurs with endosulfan, TCDD and carbendazim. Some doubt does exist over some, e.g. carbendazim, which does show ambiguous results which depending on the concentration used. Because endosulfan, TCDD, carbaryl and carbendazim have been linked with hepatic disorders (M. S. Denison et al., 1998; J. H. Lee et al., 2010; N. E. McCarroll et al., 2002; J. M. Moon and B. J. Chun, 2009), we can say that the combined use of all these biomarkers with real-time cellular impedance could be a reliable and realistic approach to determine impacts of xenobiotics on liver. Further investigations on the deregulation of key hepatic functions by food chemicals should now be conducted using this new *in vitro* approach.

Conflict of interest statement

No potential conflicts of interest are reported for any of the authors.

Acknowledgments

The authors wish to thank Roche for the real-time cellular impedance technology (xCELLigence®), Nicolas Orsini and group leaders of Galderma R&D for their contribution to this work.

This study has been supported by The Antiope toxicological network and by the INERIS. The authors are grateful for their financial support.

Legends to figures

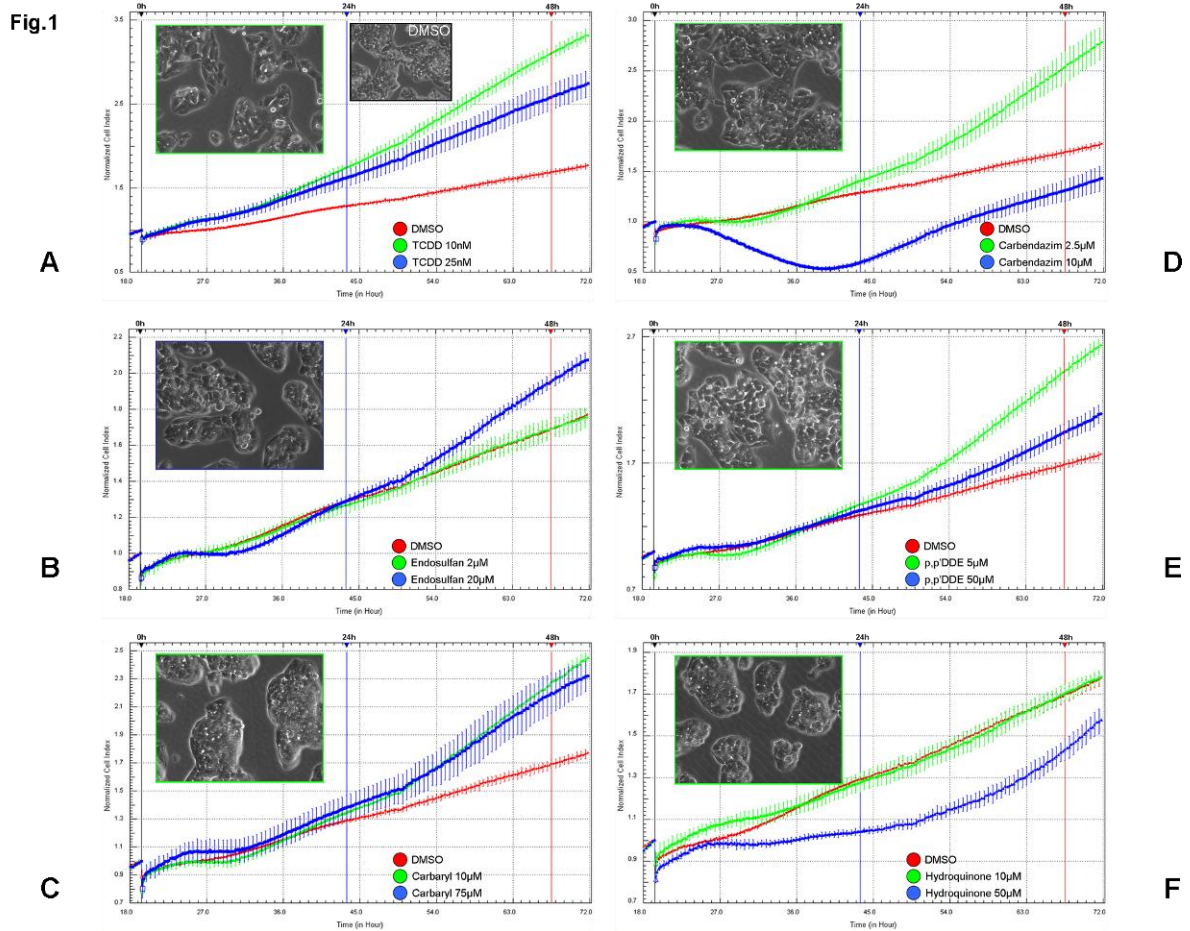


Fig.1: the effects of chemicals on HepG2 cell morphology leading to specific impedance profile. HepG2 cells were treated for 48h with 10 and 25 nM TCDD (A), 2 and 20 μ M endosulfan (B), 10 and 75 μ M carbaryl (C), 2.5 and 10 μ M carbendazim (D), 5 and 50 μ M p,p'DDE (E), 10 and 50 μ M hydroquinone (F). In parallel, HepG2 cells were observed with an inverted microscope 48h after their treatment at the lower dose except for endosulfan, and all were compared to the control DMSO.

Fig.2

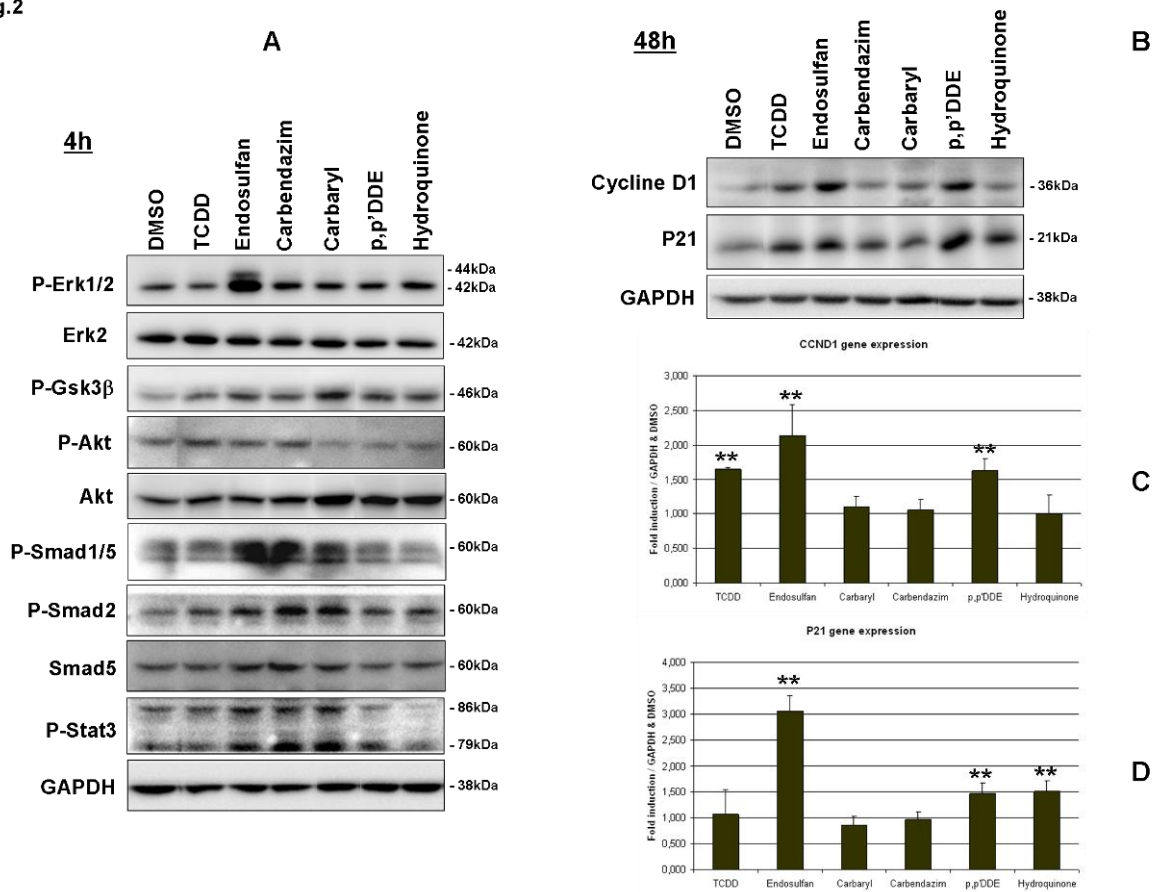


Fig.2: early effect of compounds on transduction pathways and their later consequences on cell cycle regulators. A, HepG2 cells were exposed to 10 nM TCDD, 20 μ M endosulfan, 2.5 μ M carbendazim, 10 μ M carbaryl, 5 μ M p,p'DDE and 10 μ M hydroquinone. After 4h of treatment, cells were lysed and subjected to western blotting, as described in section 2. The ERK1/2 signaling pathway was studied by analyzing the phosphorylation of Erk1/2 and Erk2 total levels. The AKT/PI3K pathway was studied by analyzing the phosphorylation of Gsk3 β and Akt, together with Akt total levels. The TGF- β pathway was studied by analyzing the phosphorylation of Smad1/2/5 and Smad5 total levels, and the STAT pathway was studied by analyzing the phosphorylation of Stat3. As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against GAPDH. B, HepG2 cells were treated with the same concentration for 48h. Cells were lysed and cyclin D1 and P21^{waf1} protein levels were assessed by western blotting. C and D, *CCND1* and *P21* mRNA levels were assessed by real-

time RT-PCR after 48 h treatment with each compound. For all real-time RT-PCR experiments (C and D), relative mRNA levels with respect to *GAPDH* mRNA levels are given, and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Errors bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

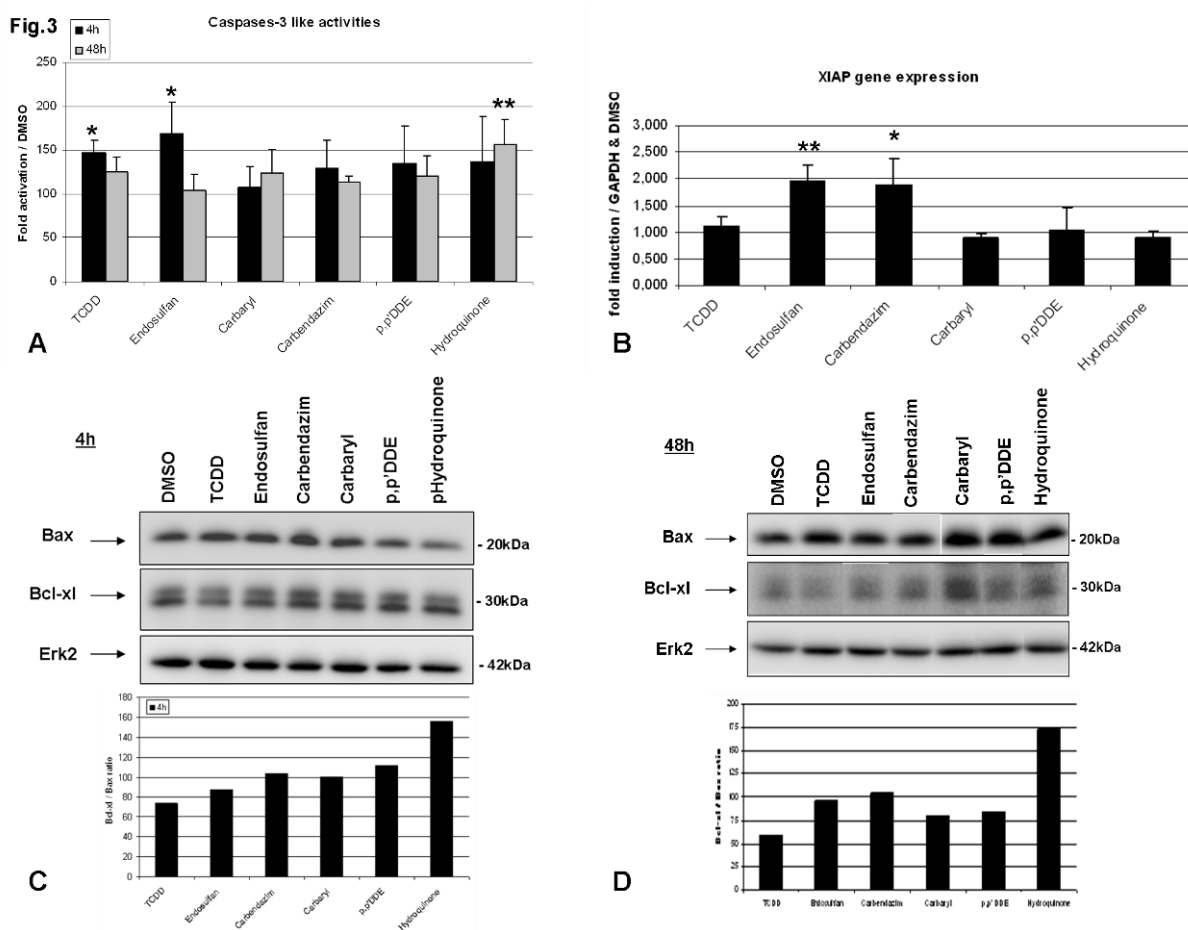
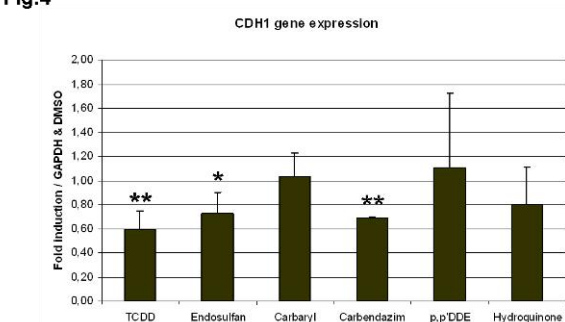


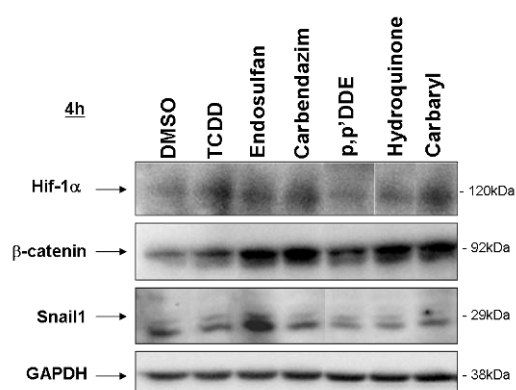
Fig.3: effects of chemicals on the apoptosis balance. A, HepG2 cells were treated with 10 nM TCDD, 20 μ M endosulfan, 10 μ M carbaryl, 2.5 μ M carbendazim, 5 μ M p,p'DDE and 10 μ M hydroquinone for 48 h. The cells were then lysed and caspase-3 activity assayed. Results are expressed as a percentage of DMSO-treated cells, designated as 100%. Data are means \pm SD of four independent experiments (note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). B, *XIAP* mRNA levels were

assessed by real-time RT-PCR after 48 h treatment with each compound. For all real-time RT-PCR experiments, relative mRNA levels with respect to *GAPDH* mRNA levels are given, and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Error bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. C and D, HepG2 cells were treated with the same concentration of chemicals as outlined above, for 4 and 48 h. Bcl-xL and Bax protein levels were evaluated by western blot analysis. Erk2 protein detection was included as a control for equal loading and membrane transfer. Chemiluminescence was quantified after image acquisition with a CCD camera and the ratios obtained (means \pm SD for three independent experiments). The Bcl-xL/Bax ratio was calculated from band densitometry measured in three independent experiments (means \pm S.D. for three experiments) after normalization against the value of DMSO-control cell and Erk2 (Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

Fig.4



A



B

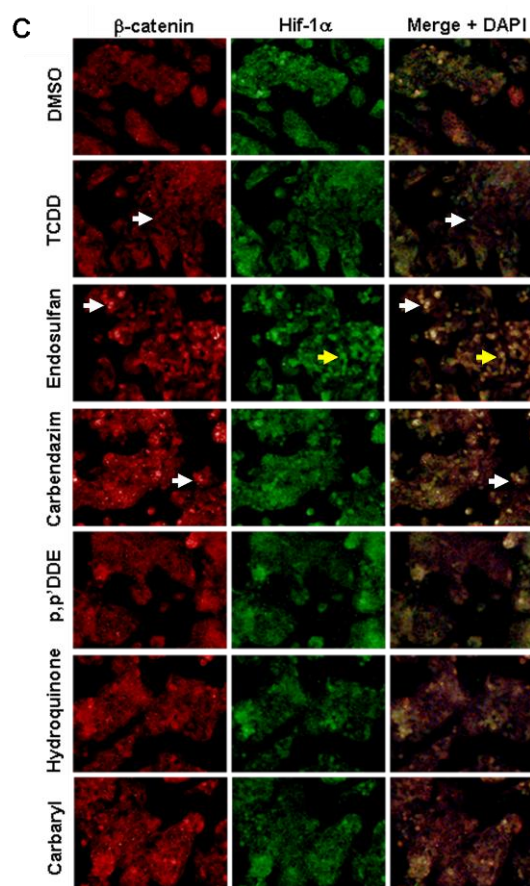


Fig.4: use of EMT biomarkers to evaluate the effect of chemicals on cancer liver progression. A, HepG2 cells were treated with 10 nM TCDD, 20 μ M endosulfan, 10 μ M carbaryl, 2.5 μ M carbendazim, 5 μ M p,p'DDE and 10 μ M hydroquinone. CDH1 mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h treatment with each compound. For all real-time RT-PCR experiments, relative mRNA levels with respect to *GAPDH* mRNA levels are given and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Error bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01. B, Cells were treated as outlined above for 4h or 48h. They were then lysed and Hif-1 α , β -catenin, and Snail1 protein levels were assessed by western blotting (results representative of three experiments). As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against GAPDH. C, HepG2 cells were grown on coverslips and treated with each compound for 48 h. After exposure, the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence analysis for the detection of β -catenin (red), Hif-1 α (green) and visualization of the nuclei (DAPI, blue). The results shown are representative of three independent experiments.

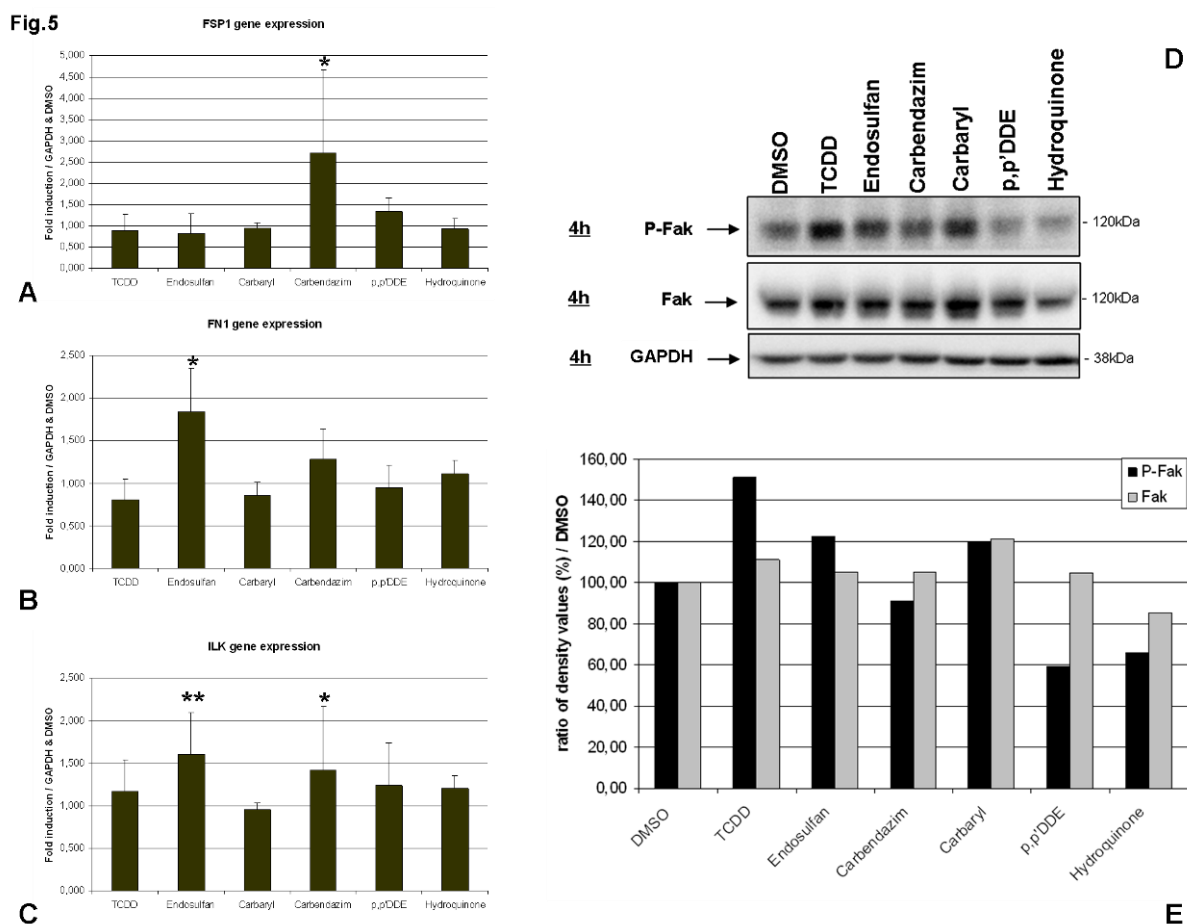


Fig.5: gain of mesenchymal markers after chemical treatment is a first indicator of cancer metastasis development. A, B and C, HepG2 cells were treated with 10 nM TCDD, 20 μ M endosulfan, 10 μ M carbaryl, 2.5 μ M carbendazim, 5 μ M p,p'DDE and 10 μ M hydroquinone. *FSP1*, *FN1* and *ILK* mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h of treatment with each compound. For all real-time RT-PCR experiments relative mRNA levels with respect to *GAPDH* mRNA levels are given, and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Errors bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01. D, Cells were treated as described above for 4h. They were then lysed and Fak and its phosphorylated form p-Fak protein levels were assessed by western blotting (results representative of three experiments). As a control, the same membranes were also probed with an antibody directed against GAPDH. E, Band

densitometry corresponding to immunoblots shown in (D) was performed after the acquisition with a CCD camera. The results are defined as the ratio between treated cells versus DMSO-treated cells normalized by Gapdh (means \pm S.D. for three experiments).

Fig.6

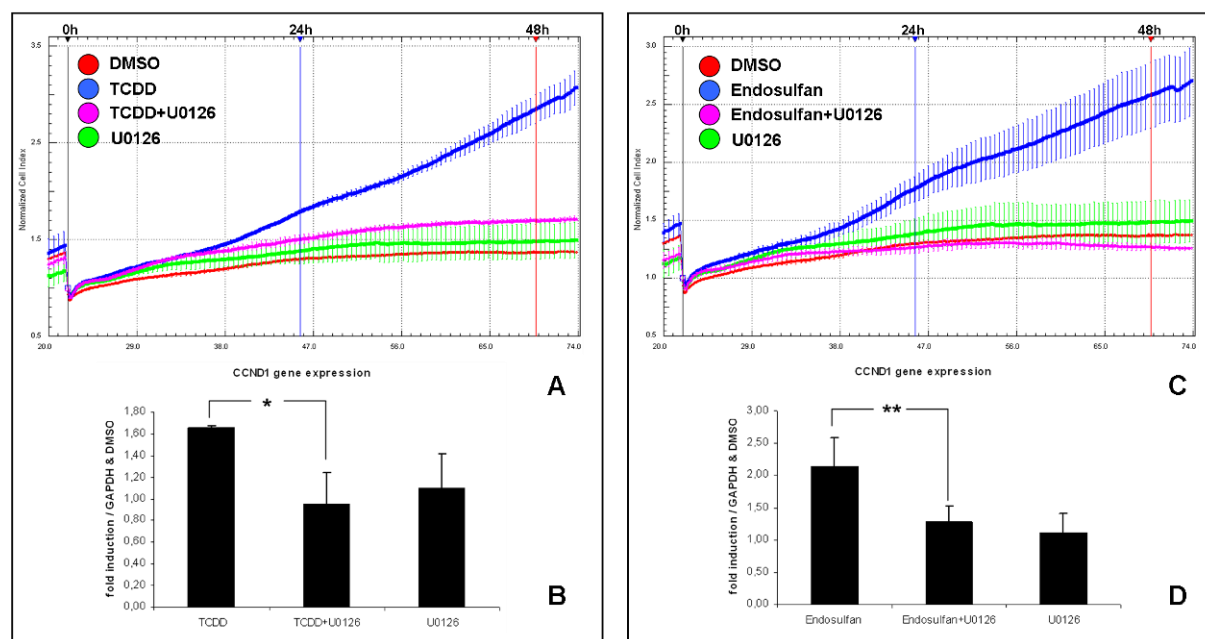


Fig.6: Involvement of the ERK1/2 pathway in the modulation of HCC markers. A and C, HepG2 cells were treated for 48h with 10 nM TCDD and 20 μ M endosulfan with or without 5 μ M of U0126. Then, the real-time cellular impedance signatures were obtained using xCELLigence® technology. B and D, *CCND1* mRNA levels were assessed by real-time RT-PCR after 48 h of treatment with the two compounds, with or without 5 μ M of U0126. For all real-time RT-PCR experiments, relative mRNA levels with respect to *GAPDH* mRNA levels are given, and the mRNA levels in DMSO-treated cells are taken as 1. Error bars indicate the mean \pm SEM of triplicate determinations in three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01.

| | | Endosulfan | Carbendazim | TCDD | Carbaryl | p,p'DDE | Hydroquinone |
|--------------------------------------|----------------|------------|-------------|------|----------|---------|--------------|
| EMT process | CDH1 | | | | | | |
| | β-catenin | | | | | | |
| | Snail1 | | | | | | |
| | FN1 | | | | | | |
| | S100A4 | | | | | | |
| | ILK | | | | | | |
| | HIF-1α | | | | | | |
| Apoptosis | P-Fak | | | | | | |
| | Pro-apoptotic | | | | | | |
| | Anti-apoptotic | | | | | | |
| Cell cycle regulators | XIAP | | | | | | |
| | P21 | | | | | | |
| Signal transduction in cancer | Cyclin D1 | | | | | | |
| | P-Akt | | | | | | |
| | P-Erk 1/2 | | | ? | | | |
| | P-Smad 1/2/5 | | | | | | |
| | P-Stat 3 | | | | | | |

| | | | |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | | ? |
| down regulation / activation | no modulation / no activation | up regulation / activation | suspected activation |

Fig.7: A summary of the modulations observed in response to the 6 compounds tested. Chemicals have been classified in order based on the level of deregulation observed and thus their carcinogenic potential.

References

- Benetti, A., Berenzi, A., Gambarotti, M., Garrafa, E., Gelati, M., Dessy, E., Portolani, N., Piardi, T., Giulini, S.M., Caruso, A., Invernici, G., Parati, E.A., Nicosia, R. and Alessandri, G. (2008) Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium. *Cancer Res* 68, 8626-8634.
- Boronat, S., Casado, S., Navas, J.M. and Piña, B. (2007) Modulation of aryl hydrocarbon receptor transactivation by carbaryl, a nonconventional ligand. *FEBS J* 274, 3327-3339.
- de Sousa, G., Fontaine, F., Pralavorio, M., Botta-Fridlund, D., Letreut, Y. and Rahmani, R. (1997) Insecticide cytotoxicity and CYP1A1/2 induction in primary human and rat hepatocyte cultures. *Toxicol In Vitro* 11, 451-457.
- Delescluse, C., Ledirac, N., de Sousa, G., Pralavorio, M., Lesca, P. and Rahmani, R. (1998) Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor. *Toxicol Lett* 96-97, 33-39.
- Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M.P., Hines, R.N., Gidrol, X. and Rahmani, R. (2001) Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochem Pharmacol* 61, 399-407.
- Denelavas, A., Weibel, F., Prummer, M., Imbach, A., Clerc, R.G., Apfel, C.M. and Hertel, C. (2011) Real-time cellular impedance measurements detect Ca(2+) channel-dependent oscillations of morphology in human H295R adenoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1813, 754-762.
- Denison, M.S., Phelan, D., Winter, G.M. and Ziccardi, M.H. (1998) Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 406-414.
- Diemert, S., Dolga, A.M., Tobaben, S., Grohm, J., Pfeifer, S., Oexler, E. and Culmsee, C. (2012) Impedance measurement for real time detection of neuronal cell death. *J Neurosci Methods* 203, 69-77.
- Duan, X.X., Ou, J.S., Li, Y., Su, J.J., Ou, C., Yang, C., Yue, H.F. and Ban, K.C. (2005) Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 11, 4740-4744.
- EL Naaman, C., Grum-Schwensen, B., Mansouri, A., Grigorian, M., Santoni-Rugiu, E., Hansen, T., Kriajevska, M., Schafer, B.W., Heizmann, C.W., Lukanidin, E. and Ambartsumian, N. (2004) Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene* 23, 3670-3680.
- Fabregat, I. (2009) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 15, 513-520.
- Fabregat, I., Roncero, C. and Fernández, M. (2007) Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 27, 155-162.

- Fransvea, E., Mazzocca, A., Santamato, A., Azzariti, A., Antonaci, S. and Giannelli, G. (2011) Kinase activation profile associated with TGF- β -dependent migration of HCC cells: a preclinical study. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 79-86.
- Fuchs, B.C., Fujii, T., Dorfman, J.D., Goodwin, J.M., Zhu, A.X., Lanuti, M. and Tanabe, K.K. (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 68, 2391-2399.
- Garrett, S.C., Varney, K.M., Weber, D.J. and Bresnick, A.R. (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281, 677-680.
- Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E. and Grigorian, M. (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92, 1955-1958.
- Jain, S., Singhal, S., Lee, P. and Xu, R. (2010) Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res* 2, 105-118.
- Jin, C., Samuelson, L., Cui, C.B., Sun, Y. and Gerber, D.A. (2011) MAPK/ERK and Wnt/ β -Catenin pathways are synergistically involved in proliferation of Sca-1 positive hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 803-807.
- Jing, Y., Han, Z., Zhang, S., Liu, Y. and Wei, L. (2011) Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Microenvironment. *Cell Biosci* 1, 29.
- Kalluri, R. and Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-1784.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X. and Abassi, Y.A. (2011) The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 740, 33-43.
- Ledirac, N., Delescluse, C., de Sousa, G., Pralavorio, M., Lesca, P., Amichot, M., Bergé, J.B. and Rahmani, R. (1997) Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 177-182.
- Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M.J., Gonzalez, F.J. and Xie, W. (2010) A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139, 653-663.
- Lemaire, G., Mnif, W., Mauvais, P., Balaguer, P. and Rahmani, R. (2006) Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 79, 1160-1169.
- Mann, C.D., Neal, C.P., Garcea, G., Manson, M.M., Dennison, A.R. and Berry, D.P. (2007) Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 43, 979-992.
- McCarroll, N.E., Protzel, A., Ioannou, Y., Frank Stack, H.F., Jackson, M.A., Waters, M.D.

- and Dearfield, K.L. (2002) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat Res* 512, 1-35.
- Moon, J.M. and Chun, B.J. (2009) Acute endosulfan poisoning: a retrospective study. *Hum Exp Toxicol* 28, 309-316.
- North, M., Tandon, V.J., Thomas, R., Loguinov, A., Gerlovina, I., Hubbard, A.E., Zhang, L., Smith, M.T. and Vulpe, C.D. (2011) Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. *PLoS One* 6, e24205.
- Parsons, C.J., Takashima, M. and Rippe, R.A. (2007) Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1, S79-84.
- Pierre, S., Bats, A.S., Chevallier, A., Bui, L.C., Ambolet-Camoit, A., Garlatti, M., Aggerbeck, M., Barouki, R. and Coumoul, X. (2011) Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation. *Biochem Pharmacol* 81, 304-313.
- Popp, J.A., Crouch, E. and McConnell, E.E. (2006) A Weight-of-evidence analysis of the cancer dose-response characteristics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD). *Toxicol Sci* 89, 361-369.
- Qin, L.X. and Tang, Z.Y. (2004) Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 497-513.
- Radtke, S., Wüller, S., Yang, X.P., Lippok, B.E., Mütze, B., Mais, C., de Leur, H.S., Bode, J.G., Gaestel, M., Heinrich, P.C., Behrmann, I., Schaper, F. and Hermanns, H.M. (2010) Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J Cell Sci* 123, 947-959.
- Rahim, S. and Üren, A. (2011) A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. *J Vis Exp*.
- Schattenberg, J.M., Schuchmann, M. and Galle, P.R. (2011) Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 213-219.
- Shi, Y.H., Ding, W.X., Zhou, J., He, J.Y., Xu, Y., Gambotto, A.A., Rabinowich, H., Fan, J. and Yin, X.M. (2008) Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology* 48, 497-507.
- Silva, M.H. and Gammon, D. (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86, 1-28.
- Steenland, K., Bertazzi, P., Baccarelli, A. and Kogevinas, M. (2004) Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect* 112, 1265-1268.

- Sun, H., Shen, O.X., Xu, X.L., Song, L. and Wang, X.R. (2008) Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology* 249, 238-242.
- Takahashi, E., Funato, N., Higashihori, N., Hata, Y., Gridley, T. and Nakamura, M. (2004) Snail regulates p21(WAF/CIP1) expression in cooperation with E2A and Twist. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1136-1144.
- van Nimwegen, M.J. and van de Water, B. (2007) Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 73, 597-609.
- van Zijl, F., Mall, S., Machat, G., Pirker, C., Zeillinger, R., Weinhaeusel, A., Bilban, M., Berger, W. and Mikulits, W. (2011) A human model of epithelial to mesenchymal transition to monitor drug efficacy in hepatocellular carcinoma progression. *Mol Cancer Ther* 10, 850-860.
- van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., Machat, G., Grubinger, M., Huber, H. and Mikulits, W. (2009) Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 5, 1169-1179.
- Xu, S., Feng, Z., Zhang, M., Wu, Y., Sang, Y., Xu, H., Lv, X., Hu, K., Cao, J., Zhang, R., Chen, L., Liu, M., Yun, J.P., Zeng, Y.X. and Kang, T. (2011) hSSB1 binds and protects p21 from ubiquitin-mediated degradation and positively correlates with p21 in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 30, 2219-2229.
- Yamamoto, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Yaginuma, Y. and Ogawa, K. (2006) Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 45, 901-913.
- Yenjerla, M., Cox, C., Wilson, L. and Jordan, M.A. (2009) Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 390-398.
- Zhang, M.F., Zhang, Z.Y., Fu, J., Yang, Y.F. and Yun, J.P. (2009) Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 7, 110.

CONCLUSIONS

Le nombre de contaminants environnementaux (pesticides, polluants organiques persistants - POP-, médicaments, dérivés plastiques...) a considérablement augmenté dans le monde depuis les années 50 et l'avènement de l'industrie pétrochimique. Associés à de nombreuses pathologies (perturbations hormonales, immunodépression, allergies, cancers...), ils font l'objet d'une surveillance accrue de la part des autorités afin de limiter les risques sanitaires potentiels liés à leur commercialisation. Dans l'objectif de renforcer les tests toxicologiques classiques, nous avons recherché et développé des biomarqueurs précoces de cancérogenèse. Leur caractère fiable et prédictif servira à évaluer de manière plus robuste l'impact des xénobiotiques environnementaux sur des modèles *in vitro*. Nous nous sommes intéressés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), phénomène capable de rendre compte d'évènements de dédifférenciation cellulaires associés à l'initiation et à la progression tumorale. En effet, la TEM intervient à des étapes précoces (fibrose) et tardives (métastases) de l'hépto-carcinogénèse. Nous avons, dans un premier temps, identifié les mécanismes cellulaires et moléculaires de la TEM au niveau hépatique. Sur la lignée cancéreuse HepG2, nous avons ainsi pu mettre en évidence l'importance de la coopération entre le facteur Snail et la voie WNT/ β -caténine dépendante de l'activation de la voie ERK1/2, et ce grâce à l'utilisation d'un inducteur de TEM sur ce modèle, le TPA. Puis nous avons dans un second temps soumis certains pesticides aux biomarqueurs de TEM validés. Parmi eux, l'endosulfan a montré qu'il était capable d'induire une TEM partielle et de sensibiliser de manière transitoire et réversible les cellules HepG2 au phénomène d'anoïkis. L'atrazine a quant à lui été formellement identifié comme un répresseur du marqueur de TEM fibrotique et métastatique S100A4. Cet herbicide est entre autres capable d'inhiber la migration cellulaire des HepG2 induite par le TPA. Nous avons ensuite testé les biomarqueurs de TEM sur des hépatocytes humains en culture primaire en réponse à des pesticides organochlorés (endosulfan, heptachlore et DDT) et à la dioxine. Nous avons montré que ces POP potentialisaient le processus de TEM spontané observé au cours du phénomène de dédifférenciation naturel de ces cellules en culture. Enfin, nous avons intégré une nouvelle technologie dite d'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence®, Roche) à l'expertise toxicologique classique. Combiné à l'utilisation des biomarqueurs de TEM mais également à d'autres biomarqueurs (apoptotiques et régulateurs du cycle cellulaire), ce protocole a permis de cribler un grand nombre de molécules et d'estimer de manière originale les effets à faibles

doses de contaminants environnementaux sur l'aggravation du cancer hépatique en condition *in vitro*. Les résultats ont montré que l'endosulfan, la dioxine, le carbendazime et la carbaryl possédaient des capacités potentiellement pro-tumorales.

A ce jour, la TEM reste peu controversée même si certains campent sur l'idée que la TEM *in vitro* est un artefact (« une instabilité génomique ») lié aux conditions artificielles de culture, non représentatives de ce qui se passe réellement chez un organisme (D. Tarin, 2005). En effet, en culture 2D, le milieu est très artificiel car il ne possède pas de vascularisation ni de contributions endocrine et nerveuse. En 3D, la matrice ne reflète pas la vraie complexité du tissu. Dans les deux cas, un problème additionnel majeur réside dans l'utilisation de lignée transformées qui sont cultivées dans des milieux très riches en facteurs conditionnant les cellules épithéliales à devenir mésenchymateuses. D. Tarin précise qu'une conversion chez une lignée cellulaire devrait être stable et irréversible alors qu'on sait pertinemment aujourd'hui qu'une des particularités de la TEM c'est justement la grande plasticité que le processus procure aux lignées et aux populations cancéreuses lors de la progression tumorale (G. Berx *et al.*, 2007). Le processus n'a pas été démontré sur tous les types de cancers par les pathologistes (K. Garber, 2008) ce qui pour les détracteurs suffit à remettre en cause l'existence du phénomène *in vivo*. De plus, les métastases et les mauvais pronostics cliniques ne sont pas toujours associés à l'expression de marqueurs communs de TEM (A. Voulgari *et A. Pintzas*, 2009). Il semblerait en effet que certaines cellules gardent leurs caractéristiques épithéliales alors même qu'elles sont capables de migrer et d'envahir localement l'organe. Cette migration individuelle de cellules sans la dégradation de la MEC s'appelle la migration amiboïde et a été observée dans de nombreux types de cancers (P. Friedl *et K. Wolf*, 2003). Des expériences ont montré qu'il existait également une migration collective de cellules épithéliales maintenant de fortes adhérences entre elles au milieu d'une MEC altérée (P. Friedl *et al.*, 2004). Il existe donc d'autres alternatives que la TEM à la migration et l'invasion durant le cancer. De manière complémentaire, de plus en plus d'études indiquent que le phénomène de TEM partielle se rencontre plus souvent lors de pathologies humaines que la TEM complète, ce qui dans un sens rend encore plus robuste la seule modulation même transitoire de l'expression du marqueur principal qu'est la E-cadhérine pour l'évaluation clinique ou simplement toxicologique. L'aspect temporaire et l'existence même du processus inverse qu'est la MET peut concilier à la fois l'absence de preuves cliniques quant à l'initiation de ce processus sur certains cancers, ainsi que la non observation de modulations

d'expressions de marqueurs de TEM (*in vivo* et *in vitro*) pouvant rendre compte d'une TEM sur un nombre restreint de cellules d'un tissu. A ce jour, ce sont les analyses génétiques qui représentent la principale évidence quant à l'initiation de la TEM durant le processus de progression tumorale *in vivo*. Au sein des tumeurs, de nombreuses populations coexistent. Certaines données indiquent qu'elles peuvent avoir une origine commune, suggérant que la TEM pourrait être l'évènement à l'origine de la présence de ces différentes populations (G. Berx *et al.*, 2007). Cependant, la controverse est à ce jour encore d'actualité. La publication de K. Taura *et al.*, 2010 montre que les hépatocytes FSP1-positifs ne génèrent pas de collagène mais que cette production est réservée *in vivo* aux cellules α -SMA et PDGFR- β positives, ce qui reviendrait à dire que les hépatocytes ne contribuent pas via la TEM à la fibrose hépatique.

La notion de « cancer » a donc largement évolué ces dernières années, grâce d'une part au phénomène de TEM, et d'autre part grâce aux études sur les cellules souches. En effet, toutes les cellules d'un organisme proviennent de cellules souches embryonnaires à partir desquelles elles vont se spécialiser. Or les cancers les plus agressifs concernent les tumeurs possédant des cellules cancéreuses peu différenciées. L'analogie consiste à dire que le cancer ressemblerait donc à un arrêt du développement et c'est ce qui a permis aux voies et aux gènes impliqués dans l'embryogenèse d'être aujourd'hui associés à la progression du cancer et d'être de sérieuses voies thérapeutiques pour l'avenir. Afin de bien cerner le lien existant entre TEM et cellules souches, voici une illustration récente tirée de l'étude de H. Siemens *et al.*, 2011.

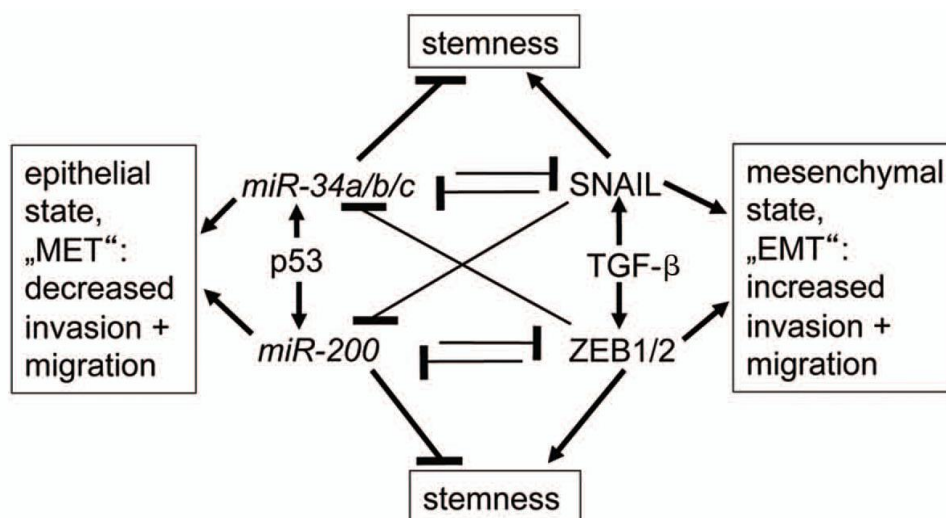


Figure 19. Interactions entre la voie P53 et la voie du TGF β dans le contrôle du processus de TEM et des caractères de cellule souche, d'après H. Siemens *et al.*, 2011.

Le terme de « stemness » ou caractère de cellule souche est associé à l'expression de marqueurs clefs tels que BMI1, CD44, CD133, OLFM4 ou encore c-MYC. P53 et le TGF- β jouent ici un rôle central dans la régulation du processus de différenciation en agissant directement et respectivement dans la modulation de l'expression des miRNAs et des facteurs de répression contrôlant le processus de TEM.

Il convient cependant d'être prudent quant à l'utilisation de biomarqueurs dits « prédictifs » de TEM. Ils s'avèrent ne pas être universels, nous l'avons signalé un peu plus haut concernant la migration, autrement dit, ils ne sont pas systématiquement associables au phénomène de TEM en fonction du type cellulaire utilisé. Par exemple, la Vimentine, protéine clef du cytosquelette des cellules mésenchymateuses, peut être exprimée dans le cas d'un stress cellulaire sur cellules épithéliales (*M. Zeisberg et al., 2009*). On l'a également retrouvée dans les cellules épithéliales de l'œil dont le cristallin, où elle a une fonction bien particulière. Il en va de même pour la Fibronectine, pourtant très couramment utilisée comme biomarqueur prédictif et présent dans certains épithéliums. Cette prudence est même valable pour la « master protéine » de la TEM qu'est l'E-cadhérine. En effet, la perte de ce constituant des jonctions adhérentes n'est pas toujours suffisante pour observer une perte du phénotype épithélial et certaines cellules cancéreuses invasives ne présentent pas de modulation de l'expression de l'E-cadhérine (*G. Berx et al., 2007*). La perte de l'E-cadhérine n'est donc pas considérée de manière systématique comme un événement majeur durant le processus de TEM, car d'une part sa surexpression ne suffit pas toujours à reverser le phénomène sur certains carcinomes, et d'autre part le démantèlement des jonctions adhérentes sans sa répression peut suffire à entraîner le processus (*Ohkubo et Ozawa, 2004 ; R. Martinez-Orozco et al., 2010*). De plus, comme expliqué plus haut, la TEM est un processus dynamique. Durant mes expériences, j'ai pu observer que l'inhibition de l'E-cadhérine était réversible (figure 20). En effet, j'ai pu mettre en évidence qu'une population à l'origine épithéliale pouvait récupérer son expression basale de E-cadhérine (observable à 72h) alors qu'elle continue de perdre ses caractéristiques hépatiques (diminution de l'expression génique de l'Albumine) et qu'elle maintient un phénotype acquis mésenchymateux (induit par le promoteur tumoral TPA) et potentiellement invasif (à travers l'expression de S100a4). Il est donc parfois nécessaire et recommandé d'établir un pré-screening des molécules utilisées comme biomarqueurs et ce sur une échelle de temps important, en particulier lorsqu'on travaille sur des cellules en culture *in vitro*, car elles n'expriment pas toutes à la base les mêmes taux de protéines spécifiques de

leur phénotype et cette expression peut être temporellement variable comme nous l'avons vu. C'est ce que nous avons fait lorsque nous avons commencé à travailler sur la lignée HepG2, à savoir s'assurer que les caractéristiques épithéliales étaient bien définies. Cette lignée présentait une forte expression du marqueur protéique E-cadhérine et un faible niveau des marqueurs mésenchymateux CD44, Vimentine, ILK, P-STAT3 et P-Akt (B. C. Fuchs et al., 2008).

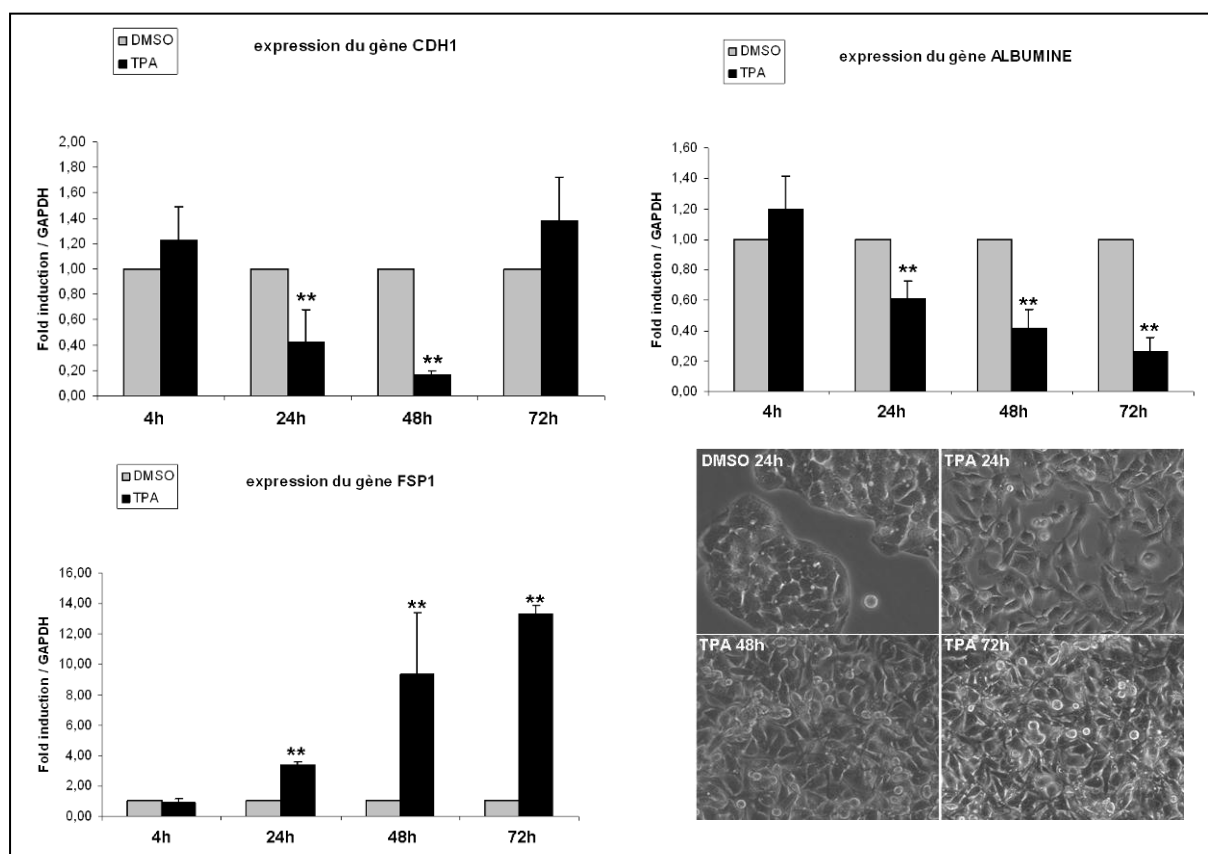


Figure 20 : A- la modulation du gène CDH1 codant pour la protéine E-cadhérine, FSP1 codant pour le marqueur mésenchymateux S100a4 et le gène de l'albumine ont été observés par PCR quantitative en temps réel sur 4 temps. Le TPA a été utilisé à la concentration de 100nM et comparé au contrôle DMSO (0.25% final). Chaque condition a été répétée trois fois (n=3) puis statistiquement estimée grâce au test t de student (**P<0.05). B- les cellules HepG2 ont été traitées 24h, 48h et 72h en présence de 100nM de TPA. Les photos ont été prises par microscopie à contraste de phase X200.

Une autre particularité de la lignée utilisée sur l'ensemble des travaux de thèse réside en l'activation basale constitutive de la voie WNT/ β -caténine. En effet, les cellules HepG2 possèdent deux protéines β -caténine, une forme normale et fonctionnelle, ainsi qu'une forme

troncaturée et majoritaire. Cette dernière n'est plus régulée négativement de part sa conformation, ce qui se traduit par une activité transcriptionnelle du complexe LEF/TCF (*H. S. Lee et al., 2007*). Ce caractère pousse donc à la prudence quant à l'utilisation d'anticorps spécifiques ou encore d'inhibiteurs (pharmacologiques, shRNA, siRNA...) lors d'expertises toxicologiques.

On a démontré d'autres utilisations abusives de biomarqueurs de TEM lors de différentes études. L' α -SMA par exemple est une protéine clef de la machinerie contractile impliquée dans la motilité cellulaire. Cette protéine est très souvent le marqueur mésenchymateux de référence. Or certains auteurs pensent qu'elle ne peut être un bon marqueur de TEM car elle est exprimée dans de nombreuses maladies et ne posséderait peu ou pas de lien avec la synthèse de protéines de la MEC. De plus, certaines cellules épithéliales expriment cette protéine des filaments intermédiaires, tout comme la Vimentine, lors de dommages tissulaires. Il en va de même pour S100a4 qui n'est pas spécifique des fibroblastes mais qui est majoritairement exprimé par les macrophages (*M. Pinzani et al., 2011*). Ces remarques concernant la Vimentine, S100a4 ou encore α -SMA s'appliquent donc principalement aux études réalisées *in vivo* qui dans certaines conditions ont du mal à discriminer les différents types cellulaires au sein d'un même tissu. Dans ce cas, le marqueur avéré et validé en ce qui concerne la fibrose hépatique reste le Collagène I. Ce qu'il faut retenir ici, c'est que l'acquisition de marqueurs mésenchymateux ainsi que d'autres caractéristiques morphologiques nécessaires à la migration cellulaire, ne font pas nécessairement des cellules cancéreuses des myofibroblastes. En somme, l'acquisition de ces néo-marqueurs ne peut être considérée que comme un pré-requis, une transition partielle mais cependant clairement indicatrice d'une perturbation majeure au sein d'une population, d'un tissu ou d'un organe, pouvant conduire à la mise en place de pathologies de type fibrose et cancer. Dans ce contexte, il existe une hypothèse intéressante qui cible la TEM de type 2 : sur cellules épithéliales non transformées, les agressions de type inflammation, stress oxydant ou hypoxie peuvent conduire les cellules à trouver un moyen d'éviter la nécrose. C'est ce que l'on appelle le mécanisme d'oxydoréduction d'échappement à la mort « redox-based escape mechanism from death » basé sur un changement dans le métabolisme conduisant la cellule à la motilité. Ce mécanisme permettrait en fait de limiter la fibrose et donc le dysfonctionnement local et expliquerait également la stratégie adoptée lors du cancer métastatique (*G. Pani et al., 2009*).

Le processus de métastase est caractérisé par des étapes de dissémination et d'invasion. Cependant, ces étapes ne sont pas « vécues » par l'ensemble des cellules cancéreuses. Elles nécessiteraient l'acquisition, par un nombre limité d'entre elles, d'anomalies spécifiques. Car en effet, le séquençage n'a pas montré de différences significatives entre les cellules d'une tumeur primaire et celles métastatiques. Ce qui laisse suggérer que la majorité des cellules cancéreuses possèdent et expriment des gènes favorisant la dissémination métastatique mais qu'en l'absence de signaux, elles ne se comportent pas de manière maligne. Autrement dit, les propriétés métastatiques sont acquises précocement et les facteurs de transcription impliqués durant la TEM gouverneraient après induction par des signaux ou anomalies génétiques et épigénétiques les phases plus tardives nécessaires à la progression cancéreuse (*A Puisieux, 2009*). De manière plus détaillée donc, nous l'avons vu, certains facteurs de transcription clefs impliqués dans la TEM jouent un rôle important lors du processus métastatique. Parmi eux, on retrouve majoritairement TWIST mais aussi ZEB1 dont la surexpression serait corrélée à la migration et à l'invasion. Il semblerait que TWIST et ZEB1 soient impliqués dans un processus de dissémination précoce à partir d'un tissu non cancéreux mais simplement lésé. Les cellules qui échappent alors au contrôle acquièrent des capacités pré-malignes. On parle alors de cellules tumorales disséminées (DTC), cellules reprogrammées qui avec la pression de sélection et l'addition d'évènements génétiques et épigénétiques acquièrent un vrai potentiel métastatique (*S. Ansieau et al., 2008*). Or généralement, lorsqu'on parle de TEM, c'est pour décrire soit des évènements tardifs tels que la progression tumorale, soit des éléments précoces tels que la fibrose. Grâce à ces nouvelles données, il semble que le processus de TEM trouve ici une nouvelle fonction et il convient donc d'avoir à l'esprit que de telles perturbations peuvent avoir d'importantes répercussions quant au développement et à la progression tumorale ultérieure à cet évènement chez les patients.

En fonction de l'organe ou du type cellulaire en culture, l'implication des facteurs de transcription importants durant le processus de TEM ne sont pas les mêmes. Cependant, sur l'ensemble des publications traitant du phénomène, nous avons observé une redondance dans le rôle de Twist et Snail1. Il se trouve que ces deux répresseurs de l'E-cadhérine sont régulés indépendamment l'un de l'autre, mais ils agissent de manière additionnelle dans la promotion de la TEM. La co-expression de ces facteurs sur HCC est en effet indicatrice d'un mauvais pronostic vital, car les lignées issues de ce type de carcinome présentent une importante capacité métastatique (*M. H. Yang, C. H. Chen et al., 2009*). Ces données nous confortent un peu plus dans le choix de la lignée HepG2 quant aux travaux réalisés sur la progression

tumorale. Contrairement aux cellules Hep3B ou aux Mahlavu, les cellules HepG2 expriment un faible niveau de Snail1 et celui de Twist est souvent indétectable, faisant de ces cellules une lignée en effet non métastatique.

PERSPECTIVES

Des résultats annexes réalisés au sein du laboratoire ont montré que sur la lignée HepG2, les trois pesticides organochlorés que sont le DDT, l'Heptachlore et l'Endosulfan induisaient l'activation précoce de la voie du TGF- β via la phosphorylation de Smad2 et Smad1/5. Compte tenu de l'implication de la voie durant les processus apoptotiques et durant la TEM, il conviendrait d'orienter les investigations au niveau de la fibrose hépatique et si possible sur modèle murin. En effet, il manque à ce jour de sérieuses données sur les mammifères outre les données épidémiologiques, quant à la possibilité des polluants persistants organiques d'être à l'origine de pathologies chroniques, en particulier chez l'homme, et ce malgré la grande suspicion qu'il règne. Il est supposé exister une voie commune épigénétique (activation récepteur commun ?) entre ces POPs, capable d'expliquer les pathologies hypothétiquement associées pour certaines et touchant la plupart du temps au développement et à la reproduction. En dehors des effets endocriniens, l'une des hypothèses pour le moment la plus envisageable concerne la production d'espèces réactives d'oxygènes induite par les POCs, en particulier l'Endosulfan. En effet, les bicouches phospholipidiques des membranes cellulaires eucaryotes sont constituées de protéines et de lipides à taux plus ou moins équivalant en fonction du type cellulaire, ainsi que de glucose. Parmi la famille des lipides, on retrouve des phospholipides, du cholestérol et des glycolipides. L'acide arachidonique (A.A) est un acide gras polyinsaturé majoritaire au niveau des membranes plasmiques. Lorsque l'activité des phospholipases (PPs) augmente, en particulier la PPA2 durant l'activation des récepteurs membranaires, l'A.A. est libéré dans le cytoplasme puis métabolisé en acides et en prostaglandines via les cyclooxygénases (COXs), les lipoxygénases (LOXs) et les CYP450. Comme une majorité d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes, l'A.A. serait impliqué dans le développement et la progression tumorale lorsqu'il se trouve de manière aberrante dans l'organisme des patients atteints. Il est également associé à la croissance des cellules cancéreuses *in vitro*, à la migration et à la différenciation via la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et de TGF- α (A. Angelucci *et al.*, 2008 ; A. Leask *et D. J. Abraham*, 2004). De manière générale, l'A.A et ses métabolites sont connus pour réguler l'angiogenèse, la chémotaxie, la migration et les processus apoptotiques y compris la survie cellulaire (R. Martinez-Orozco *et al.*, 2010). Ce même auteur a montré que l'augmentation de l'A.A. libre conduisait à la migration des cellules épithéliales MCF10A après initiation du processus de TEM, phénomène inhibé par l'ajout de PP2A. Allant dans le même sens, une association a été mise

en évidence entre le cancer du sein et le taux d'A.A. libre issu des acides gras alimentaires lors de surconsommation. De plus, la libération d'A.A. lors de l'hypoxie conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui via les voies MAPKs et NF-κB vont activer le facteur de transcription HIF-1α conduisant à la production d'IL-6 sous le contrôle des MMPs. Cela induit la prolifération cellulaire via l'augmentation des cyclines D/E et des CDK2/4 sur les cellules souches embryonnaires de souris (*S. Hun Lee et al., 2009*). Inspiré de ces deux études citées, je propose donc que certains composés présents dans l'environnement et capables de provoquer à la fois une peroxydation lipidique et du stress oxydant chez les cellules en contact avec ces xénobiotiques, puissent être de bons candidats quant à l'initiation du processus de TEM. Dans le cas de l'Endosulfan, la cascade d'activation hypothétique serait la suivante :

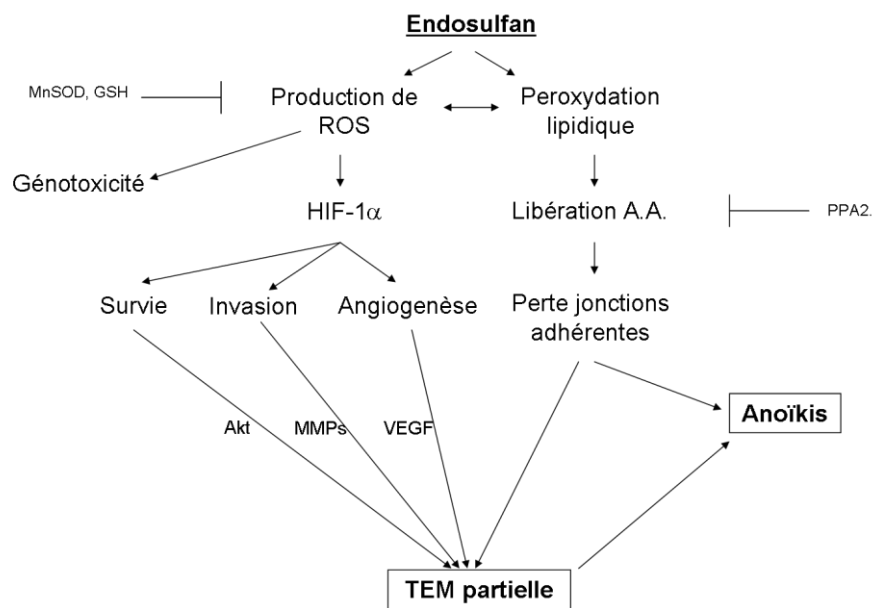


Figure 21. Schéma hypothétique de l'action de l'endosulfan

Le scénario est plus que probable, comme en témoignent à chaque étape initiale les études qui indépendamment relatent les effets de l'Endosulfan sur l'homme et sur différentes lignées cellulaires, à savoir la peroxydation lipidique et le stress oxydant (*T. Ahmed et al., 2011 ; N. S. El-Shenawy, 2010 ; K. Kannan et al., 2003 ; R. Pathak et al., 2010*). Combiné à nos résultats démontrant que le POC est capable d'activer HIF-1α, d'induire l'expression de MMP7, et qu'il participe à la perte des jonctions adhérentes à travers la répression génique de

l'E-cadhérine, l'ensemble des données rassemblées constituent donc un scénario possible quant aux mécanismes d'action de l'Endosulfan.

De plus, lors de mes travaux toujours réalisés sur l'Endosulfan, j'ai pu noter que ce pesticide était en mesure de potentialiser certains effets moléculaires sur HepG2 lorsque la lignée était traitée avec le promoteur tumoral TPA (cette observation est similaire dans une moindre mesure lors de co-traitements TPA+DDT et TPA+Heptachlore). Cette potentialisation concerne l'activation de la voie JNK, la phosphorylation de GSK3 β , l'augmentation de l'expression de PDK1, Rho et Fak, la phosphorylation de Fak, Stat3, Smad2, ERK1/2 et PKC α / β II, l'augmentation de la protéine régulatrice du cycle cellulaire P21, ainsi que la stabilisation de la β -caténine. Ces résultats mettent en évidence les effets pro-carcinogènes du composé compte tenu des cibles moléculaires citées et connues comme étant impliquées dans le maintien et la progression tumorale. Cela pose la question de sa dangerosité dans l'environnement en combinaison avec d'autres xénobiotiques qui pourraient avoir de près ou de loin les mêmes cibles que le TPA, c'est-à-dire les voies PKC/ERK, TGF- β , AKT ou encore FAK/SRC.

Durant ces travaux, le TPA a été utilisé comme molécule référence sur la lignée HepG2, en tant que contrôle positif de la TEM. Il n'a en effet d'après les données de cytotoxicité aucun effet sur la viabilité cellulaire sur une gamme de 1nM à 10 μ M (fig. A). Sa concentration efficace est généralement établie autour de 100nM (fig. C), valeur à laquelle on retrouve une pleine dédifférenciation des HepG2 (fig. B). Que ce soit pour les marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine, les marqueurs mésenchymateux tels que FSP1, ILK ou ITGA5 et les marqueurs du cycle cellulaire Cycline D1 et P21^{waf1} (fig. D), ainsi que pour les principales voies de signalisation impliquées dans le processus de TEM telles que le TGF/SMAD, ERK/MAPK (fig. F), Hif-1 α (fig. G) ou encore AKT/PI3K (fig. E), le TPA a parfaitement joué son rôle de contrôle positif. Tous les marqueurs utilisés y compris ceux non montrés ici (MMP7, CD44, Rho B...) se sont montrés surexprimés sous l'effet de ce phorbol. Cependant, des données intéressantes qui n'ont pu être développées durant ces travaux de thèse montrent que le TPA est également capable d'induire l'activation des Caspases 3, 8 et 9 à 48h (fig. H). Les cellules HepG2 ne sont pas sensibles à la perte de l'adhésion et n'entrent pas en apoptose comme on a pu le montrer sur l'article « *Effects of Endosulfan on hepatoma cells adhesion: from epithelial to mesenchymal transition to anoikis resistance* ». Nous nous sommes alors

intéressés à l'expression des principales protéines apoptotiques afin d'estimer la balance sur deux temps, 4h et 48h. Bien que pas de modulation du pro-apoptotique Bax n'est été remarquée, nous avons observé une franche diminution de l'expression de Bcl2, et à contrario une augmentation de l'expression de Bcl-xl (fig. I). Or ces deux dernières protéines font partie de la famille des anti-apoptotiques. Le ratio couramment utilisé Bcl-xl / Bax indique une tendance clairement anti-apoptotique à 48h (fig. I), ce qui d'un point de vue cellulaire est en adéquation avec les observations phénotypiques (absence d'apoptose). Mais il laisse de profondes interrogations concernant les activités Caspases et l'inhibition de l'expression de Bcl-2. Dans l'intérêt de répondre à la question des activités Caspases, nous nous sommes penchés sur l'expression de deux inhibiteurs endogènes de l'apoptose, la Survivine et XIAP. Nous avons via qPCR trouvé une élévation de l'expression génique de XIAP en réponse au TPA à 48h (fig. J) et de manière très intéressante une totale inhibition de l'expression génique de la Survivine (données non montrées). Deux hypothèses de travail s'offrent alors à nous : l'une consiste à vérifier l'implication de la répression de l'E-cadhérine dans les mécanismes de régulation de Bcl2 sous l'effet du TPA. En effet, des études ont déjà pointé la relation complexe qu'il existait entre ces deux protéines et ont montré une corrélation entre leurs diminutions respectives (*S. S. Kantak et al, 1998; L. Wang et al, 2009*). L'autre hypothèse est tournée vers l'implication du facteur P53, dont son activation est reconnue comme pouvant induire la répression à la fois de la Survivine et de Bcl-2 (*J. L. Rinn et M. Huarte, 2011*). Les données recueillies pour l'heure iraient dans ce sens puisque le TPA agit sur le cycle cellulaire des HepG2 via P21 (*W. Wen-Sheng, 2006*). Or P21 se trouve être entre autre, sous le contrôle de P53. D'autre part, le TPA provoque l'activation de P53 et sa translocation mitochondriale, phénomène qui conduit à l'initiation des processus apoptotiques (*F. Wang et al., 2010*). Un point supplémentaire quant au rôle de P53 induite par le TPA réside dans le fait que l'activation nucléaire de P53 conduit à la modulation de l'expression de Bax (non observée dans notre cas), alors que l'activation mitochondriale elle, module l'expression de Bcl-2 (observée ici). Bien que récemment, une étude ait montré que l'augmentation de P21 induite par le TPA sur cellules cancéreuses du sein était indépendante des mécanismes de P53 (*J. Han et al., 2012*), il est clair que de plus amples données seraient nécessaires à la compréhension de la modulation des processus apoptotiques en réponse au TPA et ce sur cellules cancéreuses.

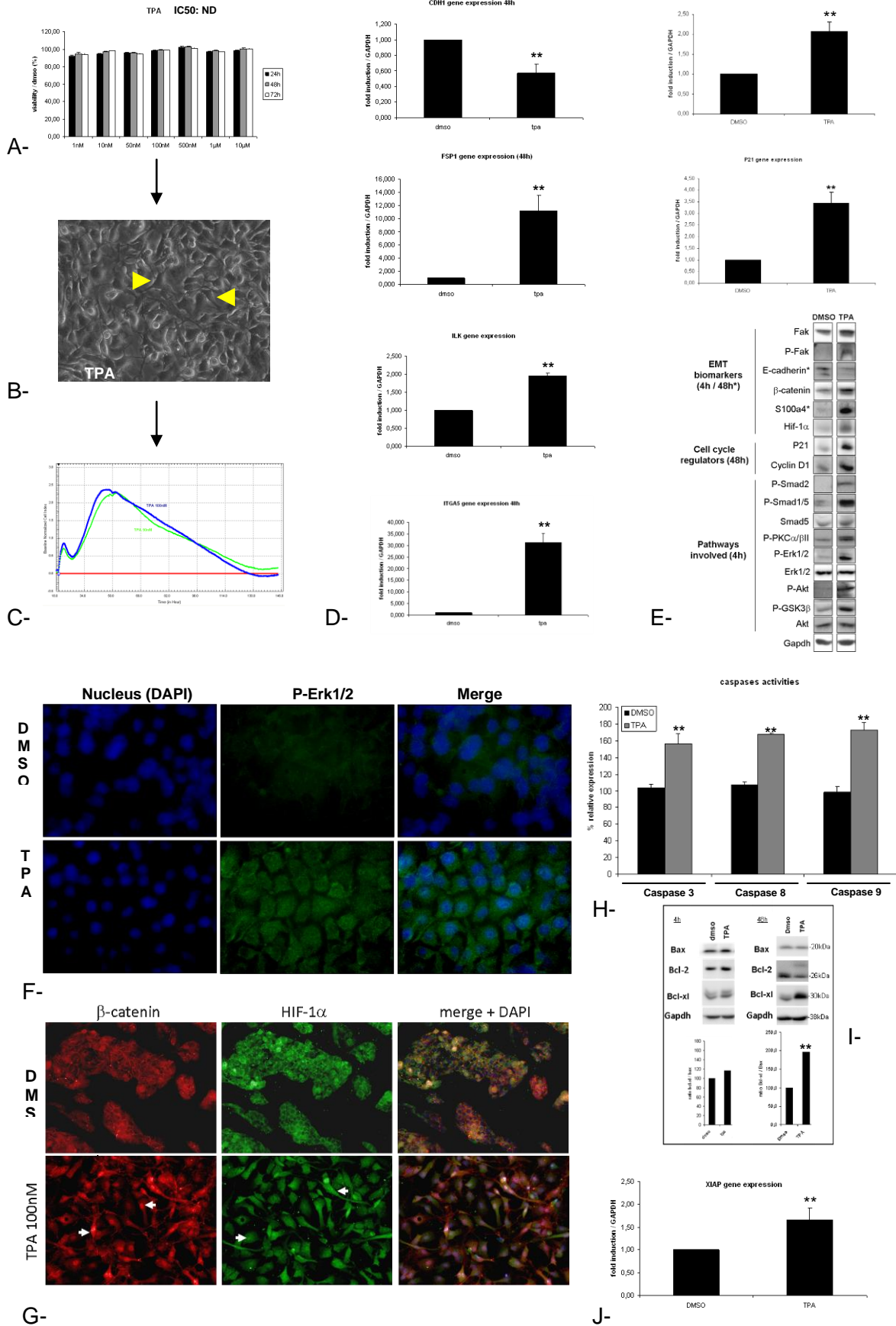


Figure 22. Action du TPA sur les cellules de la lignée HepG2 : zoom sur les processus apoptotiques

Il serait intéressant d'observer dans le cadre de la suite de mon travail sur le TPA en tant qu'initiateur de TEM sur lignée HepG2, si les cellules mésenchymateuses en culture peuvent exprimer des marqueurs de cellules souches. Cela pourrait rendre compte d'une certaine pluripotence conférant aux cellules cancéreuses une plasticité qui, lorsqu'elle est extrapolée aux conditions *in vivo*, peut rendre compte d'une potentielle dangerosité (progression, chimiorésistance...). Il conviendrait alors dans un second temps de soumettre les polluants environnementaux à ces marqueurs et ainsi augmenter le pool de données quant aux impacts sanitaires potentiels. Cette hypothèse est largement plausible car une équipe italienne a montré que l'initiation de la TEM sur cellules cancéreuses pulmonaires via le TGF- β 1 conduisait également à l'expression de marqueurs de cellules souches tels que Oct4, CD133, Sox2 et c-kit (*G. pirozzi et al., 2011*). Cette même hypothèse a également pu être démontrée sur cellules issues d'un HCC. Sous l'effet du TGF- β toujours, ces cellules initient un processus de TEM et expriment les marqueurs CD13 et CD133. Or le marqueur CD13 est suspecté d'être exprimé sur les cellules positives aux marqueurs mésenchymateux et positifs aux marqueurs des cellules souches, cellules qui sont reconnues comme étant résistantes aux chimiothérapies lors du cancer du foie (*H. M. Kim et al., 2011*).

Au delà des marqueurs de TEM, il existe d'autres protéines qui peuvent faire office à la fois d'inducteurs de TEM et de biomarqueurs pouvant rendre compte d'effets potentiellement aggravant en réponse à certains xénobiotiques. Ce sont les interleukines, les chimiokines (cytokines chemoattractant recrutant les cellules immunitaires) et certains facteurs pro-inflammatoires. On dénombre l'IL-1 dont la cible est entre autre le foie, l'IL6 appelée HSF (facteur de différenciation hépatocytaire), l'IL11 dit facteur inhibiteur d'adipogenèse, mais encore l'IL-33 qui est une cytokine alarme durant l'hépatite, le TNF- α , CCL2, CXCL12 et l'IFN- γ . Ces derniers seraient très utiles à intégrer lors d'études toxicologiques *in vivo* car facilement dosables dans le sang par exemple. Ils apporteraient des informations complémentaires aux biomarqueurs de TEM, en associant leur modulation à l'inflammation chronique et à la progression tumorale et ce de manière pertinente. En effet les thérapies anticancéreuses ciblent depuis peu les cytokines inflammatoires et les tests cliniques sur les chimiokines sont en cours. Comme pour la TEM, l'inflammation est un processus très étudié. Ils ont en commun nous l'avons vu, des voies d'activations (NF κ B) qui jouent un rôle clef dans la survie, la migration et les métastases. L'IL-6 stimule par exemple la production

d'anticorps par les lymphocytes B. Elle active également la voie JAK/Stat jouant un rôle dans la progression et la différenciation. Elle permet la survie cellulaire et est donc responsable de la résistance aux chimiothérapies. Depuis peu, l'IL-6 est connue pour être un inducteur de TEM sur cellules cancéreuses pancréatiques (C. Huang *et al.*, 2011) et sur cellules cancéreuses du sein (N. J. Sullivan *et al.*, 2009). Présenter l'augmentation des marqueurs inflammatoires dans une tumeur comme des marqueurs potentiels de TEM serait donc scientifiquement pertinent.

L'approche que nous avons choisi d'adopter durant ces travaux sur les biomarqueurs de TEM nous a permis d'imaginer à l'avenir un nouveau protocole prenant en compte en parallèle l'effet des xénobiotiques sur primo-cultures, lignée cancéreuse non métastatique et cellules métastatiques. L'intérêt étant de prendre en compte les différents stades de progression tumorale par rapport à des cellules saines. L'utilisation de biomarqueurs validés cliniquement sur l'organe étudié permettra d'être plus pertinent et d'extrapoler les observations *in vitro* aux données cliniques avec une constante chronologique bien établie.

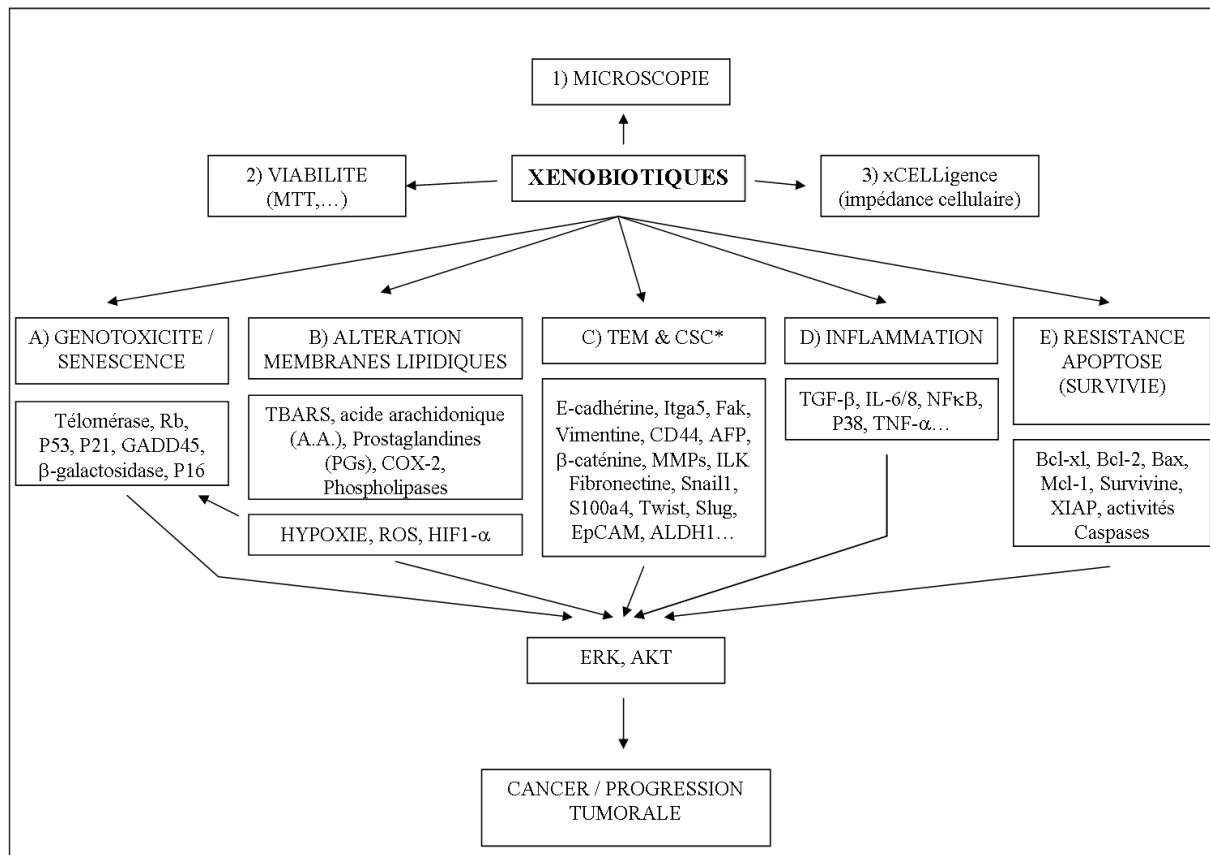
Une alternative intéressante à l'utilisation d'animaux en laboratoire reste la construction d'organes ou de tissus. Par exemple, l'utilisation de peaux reconstruites est un procédé très développé dans le privé que ce soit en pharmacologie ou en cosmétique, et qui mérite d'être étendu à la toxicologie, en particulier lorsqu'on travaille sur des domaines de recherche dynamiques comme la TEM. Il est possible alors d'imaginer des chambres de culture spécialement conçue pour reproduire par exemple des pulvérisations de pesticides, à l'image de l'utilisation courante qu'en font les agriculteurs, afin de rapprocher les données épidémiologiques et les études *in vivo* ou *in vitro* sur le sujet. Grâce ensuite à la microdissection et à l'histologie, il serait intéressant d'utiliser les biomarqueurs développés à des fins cliniques.

L'utilisation de Glucocorticoïdes de type Dexaméthasone combinée aux traitements courants lors de chimiothérapies est certainement une piste intéressante à creuser compte tenu de leurs effets pro-épithéliaux. En effet, la Dexaméthasone a un effet limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène empêchant l'initiation de la cascade liée à l'activation de Snail et conduisant à la TEM. Il est capable d'empêcher la migration cellulaire et d'inhiber l'activation du TGF- β sur lignée pulmonaire (L. Zhang *et al.*, 2010), initiant même le processus inverse qu'est la Transition mésenchymo-épithéliale (TME). Une équipe allemande

a de plus récemment proposé de classer les marqueurs de TEM en fonction de leur dépendance à la Dexaméthasone. En effet, 12 des 17 marqueurs testés sur cultures primaires d'hépatocytes murins (Vimentine, Snail-1, Snail-2, HNF4 α , Twist-1, ZEB2, Fibronectine, Occludine, MMP14, Claudine-1, Cytokératine-8, et Cytokératine-18) sont modulés de manière transcriptionnelle par la Dexaméthasone (*P. Godoy et al., 2010*). Les glucocorticoïdes et le récepteur spécifique GR pourraient donc être une cible potentielle pour lutter contre les populations mésenchymateuses au sein des tumeurs.

Les Claudines et les Occludines sont des protéines des jonctions serrées nous l'avons vu plus haut, jouant un rôle clef dans la polarité cellulaire. Or, leur expression se trouve diminuée durant la TEM. De plus, elles jouent également un rôle en tant qu'acteurs clefs de la barrière entre le système biliaire et la circulation sanguine. En effet, une perturbation de cette barrière (détérioration, dilatation, dépolymérisation des filaments d'actine/myosine...) peut entraîner une cholestase hépatique (*T. Kojima et al., 2003*). La question qui peut donc se poser est : « les xénobiotiques capables d'initier la TEM peuvent-ils de manière chronique ou non perturber cette barrière et ainsi permettre l'augmentation du volume biliaire dans le sang, entraînant certaines pathologies hépatiques ? ». Cette idée s'appuie sur plusieurs points. On sait que la perte des jonctions lacunaires et des jonctions serrées sur hépatocytes cholestatiques peut être causée par divers facteurs de croissance et cytokines inflammatoires à travers les voies MAPK, PI3K et p38 (*S. Potempa et al., 1998*). Des études incriminent également le rôle de la TEM dans l'établissement de la cirrhose biliaire primitive après la transplantation hépatique (*H. Robertson et al., 2007*). La relation entre les dommages des canaux biliaires et la fibrose portale lors des maladies chroniques du foie reste en suspens chez les praticiens. Une étude a cependant montré que les cellules formant les canaux biliaires (chondrocytes) pouvaient subir une TEM au cours des maladies chroniques du foie, conduisant à la formation de fibroblastes envahissants. Ce phénomène peut être induit par une réponse au TGF- β sécrété de manière paracrine par l'infiltration des cellules T (*K. A. Rygiel et al., 2008*). De manière complémentaire, d'autres travaux supportent l'idée que la TEM contribue à l'évolution de la fibrose biliaire au cours de la cholestase chronique (*A. Omenetti et al., 2008*). Il est donc possible d'imaginer que les xénobiotiques capables d'activer la voie du TGF- β , comme c'est le cas de certains organochlorés, peuvent conduire de manière chronique à l'établissement de diverses pathologies hépatiques.

Figure 23. Protocole de vigilance proposé pour un meilleur screening et une expertise approfondie des effets des xénobiotiques sur l'initiation et la progression tumorale *in vitro* :



CSC* : cellules souches cancéreuses

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abass, K., Lämsä, V., Reponen, P., Küblbeck, J., Honkakoski, P., Mattila, S., Pelkonen, O. and Hakkola, J. (2012) Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology* 294, 17-26.
- Aït-Aïssa, S., Pandard, P., Magaud, H., Arrigo, A.P., Thybaud, E. and Porcher, J.M. (2003) Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 54, 92-104.
- Alexander, N.R., Tran, N.L., Rekapally, H., Summers, C.E., Glackin, C. and Heimark, R.L. (2006) N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* 66, 3365-3369.
- Angelucci, A., Garofalo, S., Specia, S., Bovadilla, A., Gravina, G.L., Muzi, P., Vicentini, C. and Bologna, M. (2008) Arachidonic acid modulates the crosstalk between prostate carcinoma and bone stromal cells. *Endocr Relat Cancer* 15, 91-100.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron de Fromental, C. and Puisieux, A. (2008a) Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79-89.
- Ansieau, S., Courtois-Cox, S., Morel, A.P. and Puisieux, A. (2011) Failsafe program escape and EMT: A deleterious partnership. *Semin Cancer Biol*.
- Ansieau, S., Hinkal, G., Thomas, C., Bastid, J. and Puisieux, A. (2008b) Early origin of cancer metastases: dissemination and evolution of premalignant cells. *Cell Cycle* 7, 3659-3663.
- Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A.P., Lenormand, P., Caron, J.C. and Rahmani, R. (2007) Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol* 213, 177-186.
- Austin, H., Delzell, E., Grufferman, S., Levine, R., Morrison, A.S., Stolley, P.D. and Cole, P. (1987) Case-control study of hepatocellular carcinoma, occupation, and chemical exposures. *J Occup Med* 29, 665-669.
- Avizienyte, E. and Frame, M.C. (2005) Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 17, 542-547.
- Aziz-Seible, R.S., Lee, S.M., Kharbanda, K.K., McVicker, B.L. and Casey, C.A. (2011) Ethanol feeding potentiates the pro-inflammatory response of Kupffer cells to cellular fibronectin. *Alcohol Clin Exp Res* 35, 717-725.

- Bakin, A.V., Safina, A., Rinehart, C., Daroqui, C., Darbary, H. and Helfman, D.M. (2004) A critical role of tropomyosins in TGF-beta regulation of the actin cytoskeleton and cell motility in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15, 4682-4694.
- Band, P.R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R.P. and Le, N.D. (2011) Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *Prostate* 71, 168-183.
- Barr, S., Thomson, S., Buck, E., Russo, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Eyzaguirre, A., Rosenfeld-Franklin, M., Gibson, N.W., Miglarese, M., Epstein, D., Iwata, K.K. and Haley, J.D. (2008) Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clin Exp Metastasis* 25, 685-693.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M.A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
- Battaglia, S., Benzoubir, N., Nobilet, S., Charneau, P., Samuel, D., Zignego, A.L., Atfi, A., Bréchet, C. and Bourgeade, M.F. (2009) Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 4, e4355.
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 113, 8-13.
- Bergamini, C., Sgarra, C., Trerotoli, P., Lupo, L., Azzariti, A., Antonaci, S. and Giannelli, G. (2007) Laminin-5 stimulates hepatocellular carcinoma growth through a different function of alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins. *Hepatology* 46, 1801-1809.
- Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J.P. and Sleeman, J.P. (2007) Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 24, 587-597.
- Bhattacharya, S.D., Mi, Z., Kim, V.M., Guo, H., Talbot, L.J. and Kuo, P.C. (2012) Osteopontin regulates epithelial mesenchymal transition-associated growth of hepatocellular cancer in a mouse xenograft model. *Ann Surg* 255, 319-325.
- Bianchi, A., Gervasi, M.E. and Bakin, A. (2010) Role of β 5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF- β . *Cell Cycle* 9, 1647-1659.
- Bird, T.G., Lorenzini, S. and Forbes, S.J. (2008) Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res* 331, 283-300.
- Blagosklonny, M.V. (2005) Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 621-627.
- Borzio, M., Fargion, S., Borzio, F., Fracanzani, A.L., Croce, A.M., Stroffolini, T., Oldani, S., Cotichini, R. and Roncalli, M. (2003) Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 39, 208-214.
- Boye, K. and Maelandsmo, G.M. (2010) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol* 176, 528-535.

- Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J. and Brabletz, T. (2011) The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 30, 770-782.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. and Kirchner, T. (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10356-10361.
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M. and Llovet, J.M. (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5, 215-219.
- Caja, L., Bertran, E., Campbell, J., Fausto, N. and Fabregat, I. (2011) The transforming growth factor-beta (TGF- β) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J Cell Physiol* 226, 1214-1223.
- Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfrè di Bonzo, L., Busletta, C., Zamara, E., Paternostro, C., Povero, D., Bandino, A., Bozzo, F., Cravanzola, C., Bravoco, V., Colombatto, S. and Parola, M. (2008) Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2267-2278.
- Cannito, S., Novo, E., di Bonzo, L.V., Busletta, C., Colombatto, S. and Parola, M. (2010) Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 12, 1383-1430.
- Carayol, N., Campbell, A., Vachier, I., Mainprice, B., Bousquet, J., Godard, P. and Chanez, P. (2002) Modulation of cadherin and catenins expression by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 341-347.
- Carloni, V., Mazzocca, A., Pantaleo, P., Cordella, C., Laffi, G. and Gentilini, P. (2001) The integrin, $\alpha\beta 1$, is necessary for the matrix-dependent activation of FAK and MAP kinase and the migration of human hepatocarcinoma cells. *Hepatology* 34, 42-49.
- Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F. and Gridley, T. (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8188.
- Casabar, R.C., Das, P.C., Dekrey, G.K., Gardiner, C.S., Cao, Y., Rose, R.L. and Wallace, A.D. (2010) Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 335-343.
- Castilla, M., Moreno-Bueno, G., Romero-Pérez, L., Van De Vijver, K., Biscuola, M., López-García, M., Prat, J., Matías-Guiu, X., Cano, A., Oliva, E. and Palacios, J. (2011) Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol* 223, 72-80.
- Chai, J.Y., Modak, C., Mouazzen, W., Narvaez, R. and Pham, J. (2010a) Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Biosci Trends* 4, 130-142.
- Chai, J.Y., Modak, C., Mouazzen, W., Narvaez, R. and Pham, J. (2010b) Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Biosci Trends* 4, 130-142.

- Chan, J., Ko, F.C., Yeung, Y.S., Ng, I.O. and Yam, J.W. (2011) Integrin-linked kinase overexpression and its oncogenic role in promoting tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 6, e16984.
- Chatzizacharias, N.A., Kouraklis, G.P. and Theocharis, S.E. (2008) Clinical significance of FAK expression in human neoplasia. *Histol Histopathol* 23, 629-650.
- Chen, C., Wu, C.Q., Zhang, Z.Q., Yao, D.K. and Zhu, L. (2011a) Loss of expression of miR-335 is implicated in hepatic stellate cell migration and activation. *Exp Cell Res* 317, 1714-1725.
- Chen, X., Lingala, S., Khoobyari, S., Nolta, J., Zern, M.A. and Wu, J. (2011b) Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol*.
- Chen, Y.L., Lv, J., Ye, X.L., Sun, M.Y., Xu, Q., Liu, C.H., Min, L.H., Li, H.P., Liu, P. and Ding, X. (2011c) Sorafenib inhibits transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology* 53, 1708-1718.
- Cheung, P.Y., Yip, Y.L., Tsao, S.W., Ching, Y.P. and Cheung, A.L. (2011) Id-1 induces cell invasiveness in immortalized epithelial cells by regulating cadherin switching and Rho GTPases. *J Cell Biochem* 112, 157-168.
- Chiarugi, P. and Giannoni, E. (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76, 1352-1364.
- Choi, S.S. and Diehl, A.M. (2009) Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 50, 2007-2013.
- Christiansen, J.J. and Rajasekaran, A.K. (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66, 8319-8326.
- Cicchini, C., Laudadio, I., Citarella, F., Corazzari, M., Steindler, C., Conigliaro, A., Fantoni, A., Amicone, L. and Tripodi, M. (2008) TGF β -induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res* 314, 143-152.
- Coumoul, X., Diry, M. and Barouki, R. (2002) PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem Pharmacol* 64, 1513-1519.
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C. and Barouki, R. (2001) Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3942-3948.
- Dang, H., Ding, W., Emerson, D. and Rountree, C.B. (2011) Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer* 11, 396.
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S. and de Herreros, A.G. (2011) Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 286, 12024-12032.

- De Wever, O., Pauwels, P., De Craene, B., Sabbah, M., Emami, S., Redeuilh, G., Gespach, C., Bracke, M. and Berx, G. (2008) Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 130, 481-494.
- Dehn, P.F., Allen-Mocherie, S., Kerek, J. and Thenappan, A. (2005) Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. *Toxicol In Vitro* 19, 261-273.
- del Castillo, G., Alvarez-Barrientos, A., Carmona-Cuenca, I., Fernández, M., Sánchez, A. and Fabregat, I. (2008) Isolation and characterization of a putative liver progenitor population after treatment of fetal rat hepatocytes with TGF-beta. *J Cell Physiol* 215, 846-855.
- di Bari, M.G., Ginsburg, E., Plant, J., Strizzi, L., Salomon, D.S. and Vonderhaar, B.K. (2009) Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1. *J Cell Physiol* 219, 659-666.
- Doberstein, K., Pfeilschifter, J. and Gutwein, P. (2011) The transcription factor PAX2 regulates ADAM10 expression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 32, 1713-1723.
- Dooley, S., Hamzavi, J., Ciuculan, L., Godoy, P., Ilkavets, I., Ehnert, S., Ueberham, E., Gebhardt, R., Kanzler, S., Geier, A., Breitkopf, K., Weng, H. and Mertens, P.R. (2008) Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 135, 642-659.
- Dotto, G.P. (2008) Notch tumor suppressor function. *Oncogene* 27, 5115-5123.
- Dunn, K.L., Espino, P.S., Drobnic, B., He, S. and Davie, J.R. (2005) The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* 83, 1-14.
- Egeblad, M., Littlepage, L.E. and Werb, Z. (2005) The fibroblastic coconspirator in cancer progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 383-388.
- Entschladen, F., Zänker, K.S. and Powe, D.G. (2011) Heterotrimeric G protein signaling in cancer cells with regard to metastasis formation. *Cell Cycle* 10, 1086-1091.
- Evan, G.I. and d'Adda di Fagagna, F. (2009) Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* 19, 25-31.
- Ezzat, S., Abdel-Hamid, M., Eissa, S.A., Mokhtar, N., Labib, N.A., El-Ghorory, L., Mikhail, N.N., Abdel-Hamid, A., Hifnawy, T., Strickland, G.T. and Loffredo, C.A. (2005) Associations of pesticides, HCV, HBV, and hepatocellular carcinoma in Egypt. *Int J Hyg Environ Health* 208, 329-339.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R. and Nawata, H. (2007) Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect* 115, 720-727.
- Felton, V.M., Borok, Z. and Willis, B.C. (2009) N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L805-812.

Fernández, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M. and Bosch, J. (2009) Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 50, 604-620.

Ferrís I Tortajada, J., Ortega García, J.A., Garcia I Castell, J., López Andreu, J.A., Ribes Koninckx, C. and Berbel Tornero, O. (2008) [Risks factors for pediatric malignant liver tumors]. *An Pediatr (Barc)* 68, 377-384.

Fery, Y., Mueller, S.O. and Schrenk, D. (2010) Development of stably transfected human and rat hepatoma cell lines for the species-specific assessment of xenobiotic response enhancer module (XREM)-dependent induction of drug metabolism. *Toxicology* 277, 11-19.

Firincieli, D., Boissan, M. and Chignard, N. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol* 34, 523-528.

Frame, S. and Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359, 1-16.

Franco, D.L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M.M., de Frutos, C.A., Del Castillo, G., López-Blau, C., Fabregat, I. and Nieto, M.A. (2010) Snail1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J Cell Sci* 123, 3467-3477.

Fransvea, E., Mazzocca, A., Antonaci, S. and Giannelli, G. (2009) Targeting transforming growth factor (TGF)-betaRI inhibits activation of beta1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 839-850.

Friedl, P., Hegerfeldt, Y. and Tusch, M. (2004) Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48, 441-449.

Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.

Fu, J., Chen, Y., Cao, J., Luo, T., Qian, Y.W., Yang, W., Ren, Y.B., Su, B., Cao, G.W., Yang, Y., Yan, Y.Q., Shen, F., Wu, M.C., Feng, G.S. and Wang, H.Y. (2011) p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 α pathways. *Hepatology* 53, 181-192.

Fuchs, B.C., Fujii, T., Dorfman, J.D., Goodwin, J.M., Zhu, A.X., Lanuti, M. and Tanabe, K.K. (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 68, 2391-2399.

Fuxe, J., Vincent, T. and Garcia de Herreros, A. (2010a) Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 9, 2363-2374.

Fuxe, J., Vincent, T. and Garcia de Herreros, A. (2010b) Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 9, 2363-2374.

- Garber, K. (2007) Notch emerges as new cancer drug target. *J Natl Cancer Inst* 99, 1284-1285.
- Garber, K. (2008a) Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* 100, 232-233, 239.
- Garber, K. (2008b) Hedgehog drugs begin to show results. *J Natl Cancer Inst* 100, 692-697.
- Garber, K. (2009a) Drugging the Wnt pathway: problems and progress. *J Natl Cancer Inst* 101, 548-550.
- Garber, K. (2009b) First results for agents targeting cancer-related inflammation. *J Natl Cancer Inst* 101, 1110-1112.
- Gavert, N. and Ben-Ze'ev, A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 14, 199-209.
- Gavert, N., Vivanti, A., Hazin, J., Brabletz, T. and Ben-Ze'ev, A. (2011) L1-mediated colon cancer cell metastasis does not require changes in EMT and cancer stem cell markers. *Mol Cancer Res* 9, 14-24.
- Giannelli, G., Bergamini, C., Fransvea, E., Sgarra, C. and Antonaci, S. (2005) Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 129, 1375-1383.
- Giehl, K. and Menke, A. (2008) Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci* 13, 3975-3985.
- Gloushankova, N.A. (2008) Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)* 73, 742-750.
- Godoy, P., Lakkapamu, S., Schug, M., Bauer, A., Stewart, J.D., Bedawi, E., Hammad, S., Amin, J., Marchan, R., Schormann, W., Maccoux, L., von Recklinghausen, I., Reif, R. and Hengstler, J.G. (2010) Dexamethasone-dependent versus -independent markers of epithelial to mesenchymal transition in primary hepatocytes. *Biol Chem* 391, 73-83.
- Goel, G., Makkar, H.P., Francis, G. and Becker, K. (2007a) Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol* 26, 279-288.
- Goel, G., Makkar, H.P., Francis, G. and Becker, K. (2007b) Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol* 26, 279-288.
- Greenburg, G. and Hay, E.D. (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-339.
- Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G. and Goodall, G.J. (2008) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-3118.
- Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G. and Lukanidin, E. (2001) Tumor

suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276, 22699-22708.

Grum-Schwensen, B., Klingelhofer, J., Berg, C.H., El-Naaman, C., Grigorian, M., Lukanidin, E. and Ambartsumian, N. (2005) Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* 65, 3772-3780.

Guarino, M., Rubino, B. and Ballabio, G. (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39, 305-318.

Guarino, M., Tosoni, A. and Nebuloni, M. (2009) Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 40, 1365-1376.

Guberman, A.S., Scassa, M.E. and Cánepa, E.T. (2005) Repression of 5-aminolevulinate synthase gene by the potent tumor promoter, TPA, involves multiple signal transduction pathways. *Arch Biochem Biophys* 436, 285-296.

Hamada, S., Satoh, K., Hirota, M., Kimura, K., Kanno, A., Masamune, A. and Shimosegawa, T. (2007) Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol* 213, 768-774.

Han, J., Kim, S., Yang, J.H., Nam, S.J. and Lee, J.E. (2012) TPA-induced p21 expression augments G2/M arrest through a p53-independent mechanism in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 27, 517-522.

Hartwell, K.A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A.E., Sgroi, D.C. and Weinberg, R.A. (2006) The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18969-18974.

He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L.M., Barrett, T.A., Hood, L., Wu, H. and Li, L. (2007) PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 39, 189-198.

Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E. and Grigorian, M. (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92, 1955-1958.

Hodgson, E. and Rose, R.L. (2006) Organophosphorus chemicals: potent inhibitors of the human metabolism of steroid hormones and xenobiotics. *Drug Metab Rev* 38, 149-162.

Hofmann, C., Obermeier, F., Artinger, M., Hausmann, M., Falk, W., Schoelmerich, J., Rogler, G. and Grossmann, J. (2007) Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 132, 587-600.

Hollier, B.G., Evans, K. and Mani, S.A. (2009) The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14, 29-43.

- Hou, J.M., Krebs, M., Ward, T., Sloane, R., Priest, L., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Blackhall, F. and Dive, C. (2011) Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 178, 989-996.
- Hu, C.T., Chang, T.Y., Cheng, C.C., Liu, C.S., Wu, J.R., Li, M.C. and Wu, W.S. (2010) Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15INK4b. *FEBS J* 277, 1202-1218.
- Hu, C.T., Wu, J.R., Chang, T.Y., Cheng, C.C. and Wu, W.S. (2008) The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2. *J Biomed Sci* 15, 343-355.
- Hu, L., Lau, S.H., Tzang, C.H., Wen, J.M., Wang, W., Xie, D., Huang, M., Wang, Y., Wu, M.C., Huang, J.F., Zeng, W.F., Sham, J.S., Yang, M. and Guan, X.Y. (2004) Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* 23, 298-302.
- Huang, C., Yang, G., Jiang, T., Zhu, G., Li, H. and Qiu, Z. (2011) The effects and mechanisms of blockage of STAT3 signaling pathway on IL-6 inducing EMT in human pancreatic cancer cells in vitro. *Neoplasma* 58, 396-405.
- Huber, M.A., Kraut, N. and Beug, H. (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Hugo, H.J., Kokkinos, M.I., Blick, T., Ackland, M.L., Thompson, E.W. and Newgreen, D.F. (2011) Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs* 193, 23-40.
- Høyer, A.P., Gerdes, A.M., Jørgensen, T., Rank, F. and Hartvig, H.B. (2002) Organochlorines, p53 mutations in relation to breast cancer risk and survival. A Danish cohort-nested case-controls study. *Breast Cancer Res Treat* 71, 59-65.
- Infante, P.F., Petty, S.E., Groth, D.H., Markowitz, G. and Rosner, D. (2009) Vinyl chloride propellant in hair spray and angiosarcoma of the liver among hairdressers and barbers: case reports. *Int J Occup Environ Health* 15, 36-42.
- Insel, P.A., Murray, F., Yokoyama, U., Romano, S., Yun, H., Brown, L., Snead, A., Lu, D. and Aroonsakool, N. (2012) Cyclic AMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol*.
- Inumaru, J., Nagano, O., Takahashi, E., Ishimoto, T., Nakamura, S., Suzuki, Y., Niwa, S., Umezawa, K., Tanihara, H. and Saya, H. (2009) Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes Cells* 14, 703-716.
- Iredale, J.P. (2007) Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117, 539-548.
- Ishioka, T., Katayama, R., Kikuchi, R., Nishimoto, M., Takada, S., Takada, R., Matsuzawa, S., Reed, J.C., Tsuruo, T. and Naito, M. (2007) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by cellular FLIP. *Genes Cells* 12, 735-744.

- Jeanes, A., Gottardi, C.J. and Yap, A.S. (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27, 6920-6929.
- Jhingory, S., Wu, C.Y. and Taneyhill, L.A. (2010) Novel insight into the function and regulation of alphaN-catenin by Snail2 during chick neural crest cell migration. *Dev Biol* 344, 896-910.
- Jiang, J., Tang, Y.L. and Liang, X.H. (2011) EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther* 11, 714-723.
- Jondeau, A., Dahbi, L., Bani-Estivals, M.H. and Chagnon, M.C. (2006) Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants. *Toxicology* 226, 218-228.
- Jordà, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A. and Fabra, A. (2005) Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 118, 3371-3385.
- Jordà, M., Vinyals, A., Marazuela, A., Cubillo, E., Olmeda, D., Valero, E., Cano, A. and Fabra, A. (2007) Id-1 is induced in MDCK epithelial cells by activated Erk/MAPK pathway in response to expression of the Snail and E47 transcription factors. *Exp Cell Res* 313, 2389-2403.
- Jung, A., Schrauder, M., Oswald, U., Knoll, C., Sellberg, P., Palmqvist, R., Niedobitek, G., Brabletz, T. and Kirchner, T. (2001) The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 159, 1613-1617.
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J.Y., Wang, C., Mezey, E. and Koteish, A. (2007a) Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 282, 22089-22101.
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J.Y., Wang, C., Mezey, E. and Koteish, A. (2007b) Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 282, 22089-22101.
- Kallergi, G., Papadaki, M.A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V. and Agelaki, S. (2011) Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13, R59.
- Kalluri, R. and Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-1784.
- Kane, L.P., Mollenauer, M.N., Xu, Z., Turck, C.W. and Weiss, A. (2002) Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 22, 5962-5974.
- Kannan, K., Holcombe, R.F., Jain, S.K., Alvarez-Hernandez, X., Chervenak, R., Wolf, R.E. and Glass, J. (2000) Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Mol Cell Biochem* 205, 53-66.

Kannan, K. and Jain, S.K. (2003) Oxygen radical generation and endosulfan toxicity in Jurkat T-cells. *Mol Cell Biochem* 247, 1-7.

Kantak, S.S. and Kramer, R.H. (1998) E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 16953-16961.

Karami-Mohajeri, S. and Abdollahi, M. (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum Exp Toxicol* 30, 1119-1140.

Katoh, Y. and Katoh, M. (2008) Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med* 22, 271-275.

Kawata, K., Shimazaki, R. and Okabe, S. (2009) Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel, and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen* 50, 46-59.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.

Kim, C.H., Jeon, H.M., Lee, S.Y., Ju, M.K., Moon, J.Y., Park, H.G., Yoo, M.A., Choi, B.T., Yook, J.I., Lim, S.C., Han, S.I. and Kang, H.S. (2011a) Implication of snail in metabolic stress-induced necrosis. *PLoS One* 6, e18000.

Kim, H.M., Haraguchi, N., Ishii, H., Ohkuma, M., Okano, M., Mimori, K., Eguchi, H., Yamamoto, H., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y. and Mori, M. (2011b) Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Ann Surg Oncol*.

Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.S., Alder, H., Liu, C.G., Dejean, A. and Croce, C.M. (2011c) p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med* 208, 875-883.

Kluwe, J., Pradere, J.P., Gwak, G.Y., Mencin, A., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Colmenero, J., Bataller, R. and Schwabe, R.F. (2010) Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology* 138, 347-359.

Koch, U. and Radtke, F. (2007) Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 64, 2746-2762.

Kojima, T. and Sawada, N. (2011) Expression and function of claudins in hepatocytes. *Methods Mol Biol* 762, 233-244.

Kojima, T., Takano, K., Yamamoto, T., Murata, M., Son, S., Imamura, M., Yamaguchi, H., Osanai, M., Chiba, H., Himi, T. and Sawada, N. (2008) Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. *Liver Int* 28, 534-545.

- Kojima, T., Yamamoto, T., Murata, M., Chiba, H., Kokai, Y. and Sawada, N. (2003) Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc* 36, 157-164.
- Laberge, R.M., Awad, P., Campisi, J. and Desprez, P.Y. (2011) Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenviron*.
- Lan, L., Han, H., Zuo, H., Chen, Z., Du, Y., Zhao, W., Gu, J. and Zhang, Z. (2010) Upregulation of myosin Va by Snail is involved in cancer cell migration and metastasis. *Int J Cancer* 126, 53-64.
- Larue, L. and Bellacosa, A. (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443-7454.
- Lau, G.M., Yu, G.L., Gelman, I.H., Gutowski, A., Hangauer, D. and Fang, J.W. (2009) Expression of Src and FAK in hepatocellular carcinoma and the effect of Src inhibitors on hepatocellular carcinoma in vitro. *Dig Dis Sci* 54, 1465-1474.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.M. and Aït-Aïssa, S. (2006) Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98-108.
- Leask, A. and Abraham, D.J. (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18, 816-827.
- Lee, H.S., Park, M.H., Yang, S.J., Park, K.C., Kim, N.S., Kim, Y.S., Kim, D.I., Yoo, H.S., Choi, E.J. and Yeom, Y.I. (2007) Novel candidate targets of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sci* 80, 690-698.
- Lee, M.J., Thangada, S., Paik, J.H., Sapkota, G.P., Ancellin, N., Chae, S.S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Alessi, D.R. and Hla, T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 8, 693-704.
- Lee, T.K., Poon, R.T., Yuen, A.P., Ling, M.T., Kwok, W.K., Wang, X.H., Wong, Y.C., Guan, X.Y., Man, K., Chau, K.L. and Fan, S.T. (2006) Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 12, 5369-5376.
- Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L. and Chen, C.S. (2012) Matrix rigidity regulates a switch between TGF- β 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*.
- Leong, T.Y. and Leong, A.S. (2005) Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 7, 5-15.
- Li, D., Liu, J. and Li, J. (2011a) Genotoxic evaluation of the insecticide endosulfan based on the induced GADD153-GFP reporter gene expression. *Environ Monit Assess* 176, 251-258.

- Li, T., Zeng, Z.C., Wang, L., Qiu, S.J., Zhou, J.W., Zhi, X.T., Yu, H.H. and Tang, Z.Y. (2011b) Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through Tmprss4-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Gene Ther.*
- Li, X.Y., Zhan, X.R., Liu, X.M. and Wang, X.C. (2011c) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB in the differentiation of pancreatic ductal cells into islet β -cells mediated by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 711-716.
- Li, Y., Zhu, X., Zeng, Y., Wang, J., Zhang, X., Ding, Y.Q. and Liang, L. (2010) FMNL2 enhances invasion of colorectal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res* 8, 1579-1590.
- Lindley, L.E. and Briegel, K.J. (2010) Molecular characterization of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 659-664.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Bernardino, D. and Ursini, M.V. (1998) Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ Mol Mutagen* 32, 39-46.
- Liu, Y. and Dean, D.C. (2010) Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: do all roads lead to EMT? *Cell Cycle* 9, 897-900.
- Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D.S., Higashi, Y. and Dean, D.C. (2008a) Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 135, 579-588.
- Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D.S., Higashi, Y. and Dean, D.C. (2008b) Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 135, 579-588.
- Lu, Y., Morimoto, K., Takeshita, T., Takeuchi, T. and Saito, T. (2000) Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ Health Perspect* 108, 559-561.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z. and Hunter, T. (2003) Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499-515.
- Luebke-Wheeler, J.L., Nedredal, G., Yee, L., Amiot, B.P. and Nyberg, S.L. (2009) E-cadherin protects primary hepatocyte spheroids from cell death by a caspase-independent mechanism. *Cell Transplant* 18, 1281-1287.
- Macara, I.G. (2004) Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* 14, R160-162.
- Maeyama, M., Koga, H., Selvendiran, K., Yanagimoto, C., Hanada, S., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Harada, M., Ueno, T. and Sata, M. (2008) Switching in discoid domain receptor expressions in SLUG-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer* 113, 2823-2831.

Majumder, P.K., Grisanzio, C., O'Connell, F., Barry, M., Brito, J.M., Xu, Q., Guney, I., Berger, R., Herman, P., Bikoff, R., Fedele, G., Baek, W.K., Wang, S., Ellwood-Yen, K., Wu, H., Sawyers, C.L., Signoretti, S., Hahn, W.C., Loda, M. and Sellers, W.R. (2008) A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 14, 146-155.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J. and Weinberg, R.A. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Martinez-Orozco, R., Navarro-Tito, N., Soto-Guzman, A., Castro-Sanchez, L. and Perez Salazar, E. (2010) Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary epithelial cells MCF10A. *Eur J Cell Biol* 89, 476-488.

Medici, D., Hay, E.D. and Olsen, B.R. (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* 19, 4875-4887.

Miroux, C., Vausselin, T. and Delhem, N. (2010) Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. *Expert Opin Biol Ther* 10, 1563-1572.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K. and Miyazaki, K. (2005) Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92, 252-258.

Mongroo, P.S. and Rustgi, A.K. (2010) The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 10, 219-222.

Nagai, T., Arao, T., Furuta, K., Sakai, K., Kudo, K., Kaneda, H., Tamura, D., Aomatsu, K., Kimura, H., Fujita, Y., Matsumoto, K., Saijo, N., Kudo, M. and Nishio, K. (2011) Sorafenib inhibits the hepatocyte growth factor-mediated epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 10, 169-177.

Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S. (2002) Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* 7, 1161-1171.

Nam, E.H., Lee, Y., Park, Y.K., Lee, J.W. and Kim, S. (2012) ZEB2 upregulates integrin $\alpha 5$ expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis*.

Nart, D., Yaman, B., Yilmaz, F., Zeytinlu, M., Karasu, Z. and Kiliç, M. (2010) Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transpl* 16, 621-630.

Nass, S.J., Herman, J.G., Gabrielson, E., Iversen, P.W., Parl, F.F., Davidson, N.E. and Graff, J.R. (2000) Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 60, 4346-4348.

- Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A. and Hay, E.D. (2005) Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179, 11-23.
- Nawshad, A., Medici, D., Liu, C.C. and Hay, E.D. (2007) TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J Cell Sci* 120, 1646-1653.
- Ng, Y.H., Zhu, H. and Leung, P.C. (2012) Twist modulates human trophoblastic cell invasion via regulation of N-cadherin. *Endocrinology* 153, 925-936.
- Nowicka, A.M., Kowalczyk, A., Stojek, Z. and Hepel, M. (2010) Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants. *Biophys Chem* 146, 42-53.
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M. and Oshima, M. (2008) Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J* 27, 1671-1681.
- Ohashi, R., Gao, C., Miyazaki, M., Hamazaki, K., Tsuji, T., Inoue, Y., Uemura, T., Hirai, R., Shimizu, N. and Namba, M. (2001) Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 21, 657-662.
- Ohkubo, T. and Ozawa, M. (2004) The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* 117, 1675-1685.
- Omenetti, A., Porrello, A., Jung, Y., Yang, L., Popov, Y., Choi, S.S., Witek, R.P., Alpini, G., Venter, J., Vandongen, H.M., Syn, W.K., Baroni, G.S., Benedetti, A., Schuppan, D. and Diehl, A.M. (2008) Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 118, 3331-3342.
- Orlichenko, L.S. and Radisky, D.C. (2008) Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis* 25, 593-600.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y. and Wrana, J.L. (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603-1609.
- Pani, G., Giannoni, E., Galeotti, T. and Chiarugi, P. (2009) Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxid Redox Signal* 11, 2791-2806.
- Parola, M. and Pinzani, M. (2009) Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2, 4.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-428.
- Penel, N. and Vansteene, D. (2007) [Cancers and pesticides: current data]. *Bull Cancer* 94, 15-22.

- Perlson, E., Michaelievski, I., Kowalsman, N., Ben-Yaakov, K., Shaked, M., Seger, R., Eisenstein, M. and Fainzilber, M. (2006) Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* 364, 938-944.
- Philips, G.M., Chan, I.S., Swiderska, M., Schroder, V.T., Guy, C., Karaca, G.F., Moylan, C., Venkatraman, T., Feuerlein, S., Syn, W.K., Jung, Y., Witek, R.P., Choi, S., Michelotti, G.A., Rangwala, F., Merkle, E., Lascola, C. and Diehl, A.M. (2011) Hedgehog signaling antagonist promotes regression of both liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in a murine model of primary liver cancer. *PLoS One* 6, e23943.
- Phua, D.C., Humbert, P.O. and Hunziker, W. (2009) Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. *Mol Biol Cell* 20, 2841-2855.
- Pinzani, M. (2011) Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: Fibrogenesis or escape from death? *J Hepatol*.
- Pirozzi, G., Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., La Rocca, A., Liguori, E., Martucci, N., Paino, F., Normanno, N. and Rocco, G. (2011) Epithelial to mesenchymal transition by TGF β -1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One* 6, e21548.
- Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B. and Rosewicz, S. (2000) A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor. *J Cell Biol* 150, 1467-1478.
- Polyak, K. and Weinberg, R.A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- Potempa, S. and Ridley, A.J. (1998) Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* 9, 2185-2200.
- Powell, E.R., Faldladdin, N., Rand, A.D., Pelzer, D., Schrunk, E.M. and Dhanwada, K.R. (2011) Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 25, 644-651.
- Qin, L.X. and Tang, Z.Y. (2004) Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 497-513.
- Radisky, E.S. and Radisky, D.C. (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 201-212.
- Ramaiah, S.K. and Rittling, S. (2008) Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* 103, 4-13.
- Ratke, J., Entschladen, F., Niggemann, B., Zänker, K.S. and Lang, K. (2010) Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways. *Endocr Relat Cancer* 17, 179-189.

- Reiske, H.R., Kao, S.C., Cary, L.A., Guan, J.L., Lai, J.F. and Chen, H.C. (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 274, 12361-12366.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. and Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N. and Marcos, R. (1998) Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 416, 93-99.
- Rinn, J.L. and Huarte, M. (2011) To repress or not to repress: this is the guardian's question. *Trends Cell Biol* 21, 344-353.
- Robertson, H., Kirby, J.A., Yip, W.W., Jones, D.E. and Burt, A.D. (2007) Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45, 977-981.
- Ruiz, M.J. and Marzin, D. (1997) Genotoxicity of six pesticides by *Salmonella* mutagenicity test and SOS chromotest. *Mutat Res* 390, 245-255.
- Ruiz, P. and Günthert, U. (1996) The cellular basis of metastasis. *World J Urol* 14, 141-150.
- Rygiel, K.A., Robertson, H., Marshall, H.L., Pekalski, M., Zhao, L., Booth, T.A., Jones, D.E., Burt, A.D. and Kirby, J.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 88, 112-123.
- Sack, U. and Stein, U. (2009) Wnt up your mind - intervention strategies for S100A4-induced metastasis in colon cancer. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus, F55-64.
- Sakai, D., Suzuki, T., Osumi, N. and Wakamatsu, Y. (2006) Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 133, 1323-1333.
- Satelli, A. and Li, S. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*.
- Sathiakumar, N., MacLennan, P.A., Mandel, J. and Delzell, E. (2011) A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Crit Rev Toxicol* 41 Suppl 1, 1-34.
- Satoh, K., Hamada, S., Kimura, K., Kanno, A., Hirota, M., Umino, J., Fujibuchi, W., Masamune, A., Tanaka, N., Miura, K., Egawa, S., Motoi, F., Unno, M., Vonderhaar, B.K. and Shimosegawa, T. (2008) Up-regulation of MSX2 enhances the malignant phenotype and is associated with twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 172, 926-939.
- Savagner, P. (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol* 21 Suppl 7, vii89-92.
- Savagner, P. and Arnoux, V. (2009) [Epithelio-mesenchymal transition and cutaneous wound healing]. *Bull Acad Natl Med* 193, 1981-1991; discussion 1992.

- Savagner, P., Kusewitt, D.F., Carver, E.A., Magnino, F., Choi, C., Gridley, T. and Hudson, L.G. (2005) Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 202, 858-866.
- Savagner, P., Vallés, A.M., Jouanneau, J., Yamada, K.M. and Thiery, J.P. (1994) Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 5, 851-862.
- Schattenberg, J.M., Schuchmann, M. and Galle, P.R. (2011) Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 213-219.
- Schneider, M., Hansen, J.L. and Sheikh, S.P. (2008) S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)* 86, 507-522.
- Sheahan, S., Bellamy, C.O., Harland, S.N., Harrison, D.J. and Prost, S. (2008) TGFbeta induces apoptosis and EMT in primary mouse hepatocytes independently of p53, p21Cip1 or Rb status. *BMC Cancer* 8, 191.
- Shen, W., Chen, D., Fu, H., Liu, S., Sun, K. and Sun, X. (2011) S100A4 protects gastric cancer cells from anoikis through regulation of αv and $\alpha 5$ integrin. *Cancer Sci* 102, 1014-1018.
- Shi, Y.H., Ding, W.X., Zhou, J., He, J.Y., Xu, Y., Gambotto, A.A., Rabinowich, H., Fan, J. and Yin, X.M. (2008) Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology* 48, 497-507.
- Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M. and Roninson, I.B. (2006) Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66, 11370-11380.
- Siemens, H., Jackstadt, R., Hüntten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U. and Hermeking, H. (2011) miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* 10.
- Singh, A. and Settleman, J. (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741-4751.
- Singh, M., Kaur, P., Sandhir, R. and Kiran, R. (2008) Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutat Res* 654, 145-149.
- Slotkin, T.A. (2011) Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reprod Toxicol* 31, 297-301.
- Smets, F.N., Chen, Y., Wang, L.J. and Soriano, H.E. (2002) Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 75, 344-352.
- Smulevich, V.B., Fedotova, I.V. and Filatova, V.S. (1988) Increasing evidence of the rise of cancer in workers exposed to vinylchloride. *Br J Ind Med* 45, 93-97.

- Song, M.O., Lee, C.H., Yang, H.O. and Freedman, J.H. (2012) Endosulfan upregulates AP-1 binding and ARE-mediated transcription via ERK1/2 and p38 activation in HepG2 cells. *Toxicology* 292, 23-32.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., Kirchner, T., Behrens, J. and Brabletz, T. (2008) The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 68, 537-544.
- Sperry, R.B., Bishop, N.H., Bramwell, J.J., Brodeur, M.N., Carter, M.J., Fowler, B.T., Lewis, Z.B., Maxfield, S.D., Staley, D.M., Vellinga, R.M. and Hansen, M.D. (2010) Zyxin controls migration in epithelial-mesenchymal transition by mediating actin-membrane linkages at cell-cell junctions. *J Cell Physiol* 222, 612-624.
- Su, J., Zhang, A., Shi, Z., Ma, F., Pu, P., Wang, T., Zhang, J., Kang, C. and Zhang, Q. (2011) MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin. *Int J Oncol*.
- Suda, K., Tomizawa, K., Fujii, M., Murakami, H., Osada, H., Maehara, Y., Yatabe, Y., Sekido, Y. and Mitsudomi, T. (2011) Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol* 6, 1152-1161.
- Sullivan, N.J., Sasser, A.K., Axel, A.E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T.M. and Hall, B.M. (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28, 2940-2947.
- Sun, C.K., Ng, K.T., Lim, Z.X., Cheng, Q., Lo, C.M., Poon, R.T., Man, K., Wong, N. and Fan, S.T. (2011) Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes cell motility of hepatocellular carcinoma through induction of epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One* 6, e18878.
- Sun, S., Poon, R.T., Lee, N.P., Yeung, C., Chan, K.L., Ng, I.O., Day, P.J. and Luk, J.M. (2010) Proteomics of hepatocellular carcinoma: serum vimentin as a surrogate marker for small tumors (≤ 2 cm). *J Proteome Res* 9, 1923-1930.
- Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M. and Hazan, R.B. (2002) A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2, 301-314.
- Swarbrick, A., Roy, E., Allen, T. and Bishop, J.M. (2008) Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5402-5407.
- Takahashi, Y., Nishikawa, M. and Takakura, Y. (2008) Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 α expression in tumor cells and hepatocytes. *Gene Ther* 15, 572-582.
- Takata, Y., Nakamoto, Y., Nakada, A., Terashima, T., Arihara, F., Kitahara, M., Kakinoki, K., Arai, K., Yamashita, T., Sakai, Y., Mizukoshi, E. and Kaneko, S. (2011) Frequency of CD45RO⁺ subset in CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 307, 165-173.

Tang, D.J., Dong, S.S., Ma, N.F., Xie, D., Chen, L., Fu, L., Lau, S.H., Li, Y. and Guan, X.Y. (2010) Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51, 1255-1263.

Tarin, D., Thompson, E.W. and Newgreen, D.F. (2005) The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65, 5996-6000; discussion 6000-5991.

Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., Hollier, B.G., Ram, P.T., Lander, E.S., Rosen, J.M., Weinberg, R.A. and Mani, S.A. (2010) Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15449-15454.

Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M. and Brenner, D.A. (2010) Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51, 1027-1036.

Tchounwou, P.B., Wilson, B.A., Ishaque, A.B. and Schneider, J. (2001) Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 222, 49-59.

Theise, N.D., Park, Y.N. and Kojiro, M. (2002) Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis* 6, 497-512.

Théveneau, E., Duband, J.L. and Altabef, M. (2007) Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS One* 2, e1142.

Thiery, J.P. and Huang, R. (2005) Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6. *Dev Cell* 8, 456-458.

Thiery, J.P. and Sleeman, J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.

Thomson, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Mercado, P., Bean, J., Monaghan, M., Seymour, S.L., Argast, G.M., Epstein, D.M. and Haley, J.D. (2011) A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis* 28, 137-155.

Tobar, N., Villar, V. and Santibanez, J.F. (2010) ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem* 340, 195-202.

Trojanovsky, R.B., Laur, O. and Trojanovsky, S.M. (2007) Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol Biol Cell* 18, 4343-4352.

van Malenstein, H., van Pelt, J. and Verslype, C. (2011a) Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. *Eur J Cancer* 47, 1789-1797.

van Malenstein, H., Verslype, C., Windmolders, P., van Eijnsden, R., Nevens, F. and van Pelt, J. (2011b) Characterization of a cell culture model for clinically aggressive hepatocellular carcinoma induced by chronic hypoxia. *Cancer Lett*.

- van Zijl, F., Mair, M., Csiszar, A., Schneller, D., Zulehner, G., Huber, H., Eferl, R., Beug, H., Dolznig, H. and Mikulits, W. (2009) Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge. *Oncogene* 28, 4022-4033.
- Vardouli, L., Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Kardassis, D. and Stournaras, C. (2008) A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* 275, 4074-4087.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I. and Nieto, M.A. (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 18, 1131-1143.
- Venkov, C.D., Link, A.J., Jennings, J.L., Plieth, D., Inoue, T., Nagai, K., Xu, C., Dimitrova, Y.N., Rauscher, F.J. and Neilson, E.G. (2007) A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 482-491.
- Vered, M., Dayan, D., Yahalom, R., Dobriyan, A., Barshack, I., Bello, I.O., Kantola, S. and Salo, T. (2010) Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 127, 1356-1362.
- Villar, V., Kocić, J. and Santibanez, J.F. (2010) Spred2 inhibits TGF-beta1-induced urokinase type plasminogen activator expression, cell motility and epithelial mesenchymal transition. *Int J Cancer* 127, 77-85.
- Vinken, M., Doktorova, T., Decrock, E., Leybaert, L., Vanhaecke, T. and Rogiers, V. (2009) Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 201-222.
- Vlodavsky, I., Beckhove, P., Lerner, I., Pisano, C., Meirovitz, A., Ilan, N. and Elkin, M. (2011) Significance of Heparanase in Cancer and Inflammation. *Cancer Microenviron*.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J.P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J.B. and Ivaska, J. (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 30, 1436-1448.
- Wang, F., Fu, X., Chen, X. and Zhao, Y. (2010a) Mitochondrial uncoupling inhibits p53 mitochondrial translocation in TPA-challenged skin epidermal JB6 cells. *PLoS One* 5, e13459.
- Wang, L., Li, Z., Wang, C., Yang, Y., Sun, L., Yao, W., Cai, X., Wu, G., Zhou, F. and Zha, X. (2009) E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression. *Arch Biochem Biophys* 481, 116-122.
- Wang, X., Nie, J., Zhou, Q., Liu, W., Zhu, F., Chen, W., Mao, H., Luo, N., Dong, X. and Yu, X. (2008) Downregulation of Par-3 expression and disruption of Par complex integrity by TGF-beta during the process of epithelial to mesenchymal transition in rat proximal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1782, 51-59.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A.S., Kong, D., Banerjee, S. and Sarkar, F.H. (2010b) Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat* 13, 109-118.

Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., Hermanson, M., Hung, H. and Bidleman, T. (2010) Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci Total Environ* 408, 2966-2984.

Wells, A., Yates, C. and Shepard, C.R. (2008) E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 25, 621-628.

Wen-Sheng, W. (2003) ERK signaling pathway is involved in p15INK4b/p16INK4a expression and HepG2 growth inhibition triggered by TPA and Saikosaponin a. *Oncogene* 22, 955-963.

Wen-Sheng, W. (2006) Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett* 239, 27-35.

Whittaker, S., Marais, R. and Zhu, A.X. (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29, 4989-5005.

Willis, B.C. and Borok, Z. (2007) TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L525-534.

Wisdom, R. (1999) AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 253, 180-185.

Wu, J., Ru, N.Y., Zhang, Y., Li, Y., Wei, D., Ren, Z., Huang, X.F., Chen, Z.N. and Bian, H. (2011a) HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF- β signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene*.

Wu, J., Ru, N.Y., Zhang, Y., Li, Y., Wei, D., Ren, Z., Huang, X.F., Chen, Z.N. and Bian, H. (2011b) HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF- β signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene* 30, 4410-4427.

Wu, W.S. and Hsu, H.Y. (2001) Involvement of p-15(INK4b) and p-16(INK4a) gene expression in saikosaponin a and TPA-induced growth inhibition of HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 183-187.

Wu, W.S., Tsai, R.K., Chang, C.H., Wang, S., Wu, J.R. and Chang, Y.X. (2006) Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. *Mol Cancer Res* 4, 747-758.

Yam, J.W., Tse, E.Y. and Ng, I.O. (2009) Role and significance of focal adhesion proteins in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 24, 520-530.

Yanagisawa, M., Huvelde, D., Kreinest, P., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Parker, A.S., Copland, J.A. and Anastasiadis, P.Z. (2008) A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J Biol Chem* 283, 18344-18354.

- Yang, J.D., Nakamura, I. and Roberts, L.R. (2011) The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 21, 35-43.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
- Yang, M.H., Chen, C.L., Chau, G.Y., Chiou, S.H., Su, C.W., Chou, T.Y., Peng, W.L. and Wu, J.C. (2009) Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 50, 1464-1474.
- Yang, M.H. and Wu, K.J. (2008) TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle* 7, 2090-2096.
- Yates, C.C., Shepard, C.R., Stolz, D.B. and Wells, A. (2007) Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *Br J Cancer* 96, 1246-1252.
- Yauch, R.L., Januario, T., Eberhard, D.A., Cavet, G., Zhu, W., Fu, L., Pham, T.Q., Soriano, R., Stinson, J., Seshagiri, S., Modrusan, Z., Lin, C.Y., O'Neill, V. and Amler, L.C. (2005) Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 8686-8698.
- Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J.X., Shetuni, B. and Barsky, S.H. (2010) ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. *Oncogene* 29, 1451-1462.
- Yi, Z.Y., Feng, L.J., Xiang, Z. and Yao, H. (2011) Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *J Invest Surg* 24, 67-76.
- Yilmaz, M. and Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.
- Yilmaz, M. and Christofori, G. (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 8, 629-642.
- Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V. and Perkovic, P. (2006) Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicol In Vitro* 20, 923-935.
- Zhai, B., Yan, H.X., Liu, S.Q., Chen, L., Wu, M.C. and Wang, H.Y. (2008) Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 14, 5665-5673.
- Zhang, J., Zhang, H., Liu, J., Tu, X., Zang, Y., Zhu, J., Chen, J. and Dong, L. (2012) miR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 1100-1105.

Zhang, L., Lei, W., Wang, X., Tang, Y. and Song, J. (2010a) Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. *FEBS Lett* 584, 4646-4654.

Zhang, N., Li, R., Tao, K.S., Cao, D.Y., Ti, Z.Y., Ding, R., Cai, L., Zhang, F.Q. and Dou, K.F. (2010b) Characterization of a stem-like population in hepatocellular carcinoma MHCC97 cells. *Oncol Rep* 23, 827-831.

Zhang, Y., Li, L., Wang, Y., Zhang, J., Wei, G., Sun, Y. and Shen, F. (2007) Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 124-129.

Zhao, X.L., Sun, T., Che, N., Sun, D., Zhao, N., Dong, X.Y., Gu, Q., Yao, Z. and Sun, B.C. (2011) Promotion of hepatocellular carcinoma metastasis through matrix metalloproteinase activation by epithelial-mesenchymal transition regulator Twist1. *J Cell Mol Med* 15, 691-700.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M. and Hung, M.C. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.

Zhu, L.S., Shao, B., Song, Y., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W. and Hou, X.X. (2011) DNA damage and effects on antioxidative enzymes in zebra fish (*Danio rerio*) induced by atrazine. *Toxicol Mech Methods* 21, 31-36.

Zhu, Z., Edwards, R.J. and Boobis, A.R. (2008) Proteomic analysis of human breast cell lines using SELDI-TOF MS shows that mixtures of estrogenic compounds exhibit simple similar action (concentration additivity). *Toxicol Lett* 181, 93-103.

ANNEXES



Clotrimazole Protects the Liver Against Normothermic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

A. Iannelli, G. de Sousa, N. Zucchini, L. Peyre, J. Gugenheim, and R. Rahmani

ABSTRACT

Objective. To investigate the possible antiapoptotic prosurvival role of the pregnane X receptor (PXR) in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats using clotrimazole (CTZ), a strong PXR transactivator.

Materials and Methods. Male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups of 6 each: sham-treated, control, and CTZ-treated animals. Control and CTZ-treated animals were subjected to 30 minutes of normothermic ischemia of the whole liver followed by 6 hours of reperfusion. The animals were then killed, and the liver was excised and blood samples collected.

Results. Clotrimazole induced a significant increase in expression of the *CYP3A* gene, indicating PXR transactivation, whereas expression of the antiapoptotic *Bcl-xL* gene was not increased. Serum concentrations of aspartate aminotransaminase and alanine aminotransaminase were lower in CTZ-treated animals than in control animals (difference not significant). Levels of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase, a caspase-3 substrate, remained significantly higher in the CTZ-treated group compared with controls ($P < .05$). Clotrimazole increased the expression of phospho-p 44/42 extracellular signal-regulated kinase 1,2 ($P < .05$). The gene expression of the *heat shock proteins 27, 70 and 90* was significantly lower in CTZ-treated animals than in controls ($P < .05$).

Conclusion. Clotrimazole-mediated PXR transactivation protects the liver against ischemia-reperfusion apoptosis in rats. Phospho-p 44/42 extracellular signal-regulated kinase 1,2 is activated, whereas gene expression of *heat shock proteins 27, 70, and 90* is downregulated by induction of PXR.

LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION (I/R) injury occurs in several clinical conditions including liver trauma, transplantation, and hepatectomy.¹ The inflammatory response that follows I/R and leads to organ dysfunction is caused by hepatocyte necrosis and apoptosis.¹ Necrosis has classically been considered the sole mode of cell death induced by I/R; however, increasing evidence indicates that apoptosis (programmed cell death) also has a critical role.²

The pregnane X receptor (PXR) is a nuclear receptor that induces expression of several genes involved in the metabolism and transport of xenobiotics and endobiotics.³ This receptor binds to molecules of various molecular structures, serving as a xenosensor, and has a pivotal role in protection of cells against xenobiotics and endobiotics.³ Previous *in vitro* studies by our group have provided evidence that transactivation of PXR diminishes the rate of

spontaneous or provoked apoptosis by inducing the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL in human and rat hepatocytes.⁴⁻⁶ To our knowledge, the role of PXR in regulation of apoptosis has not been studied *in vivo*. Herein we describe activation of PXR in an *in vivo* model of liver apoptosis-normothermic I/R of rat whole liver and its

From Service de Chirurgie Digestive et Transplantation Hépatique (A.I., J.G.), Hôpital Archet 2; Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Digestif; Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice and Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire et Génomique, UMR 1089, Centre de Recherches INRA (A.I., G.d.S., N.Z., L.P., R.R.), Sophia Antipolis, France.

Address reprint requests to Antonio Iannelli, MD, Service de Chirurgie Digestive et Transplantation Hépatique, Hôpital Archet 2, 151 Rte Saint Antoine de Ginestière BP 3079, Nice Cedex 3, France. E-mail: antonio_iannelli@hotmail.com

effects on expression of the antiapoptotic *Bcl-xL* and heat shock protein (*hsp*) genes.

The objective of this study was to demonstrate that a prototypic PXR agonist such as clotrimazole (CTZ) is capable of protecting the rat liver against normothermic I/R injury. The mechanism seems to involve activation of the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1,2 pathway and decreased expression of heat shock proteins (*hsp*) 27, 70 and 90.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were performed according to our institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. The study animals were age-matched male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) weighing 250 to 300 g. Animals were housed in individual polymethyl methacrylate (Plexiglas) cages, with free access to food and water before, during, and after the I/R procedure. Light (from 8:00 AM to 7:00 PM) and room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) were kept constant.

Experimental Design and Surgical Procedure

Animals were divided into 3 groups of 6 each. Animals in the drug-treated group received intraperitoneal injections of CTZ (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), 50 mg/kg/d, diluted in 1 mL of corn oil (Sigma) for 3 days before the I/R procedure; animals in the control group received intraperitoneal injections of corn oil, 1 mL/d, for 3 days before the procedure; and sham-treated animals received nothing. Under light anesthesia, animals were placed on an ad hoc operating table, and the abdomen was prepared with povidone-iodine solution (Betadine; Astra Medica, Merignac, France). A midline laparotomy was performed, and the abdominal cavity was explored to rule out any complications from previous intraperitoneal injections. The vascular and biliary pedicles of the liver were cross-clamped with a nontraumatic clamp (201/A; Moria, Antony, France). The abdominal wall was then closed with 1 layer of running sutures. After 30 minutes of ischemia, the abdominal sutures were removed, and the clamp was released to allow reperfusion of the liver. Six hours later, the animals were killed by exsanguination, and blood samples were obtained from the inferior vena cava for determination of serum transaminase concentrations. The retrieved liver was washed in phosphate-buffered saline solution, and samples were snap-frozen in liquid nitrogen. Animals in the sham group underwent laparotomy for 5 minutes without vascular clamping.

Western Blot Analysis

Liver samples, 100 mg, were homogenized mechanically in 1 mL of hypotonic buffer (HEPES, pH 7.5; 25 mmol/L of magnesium chloride, 5 mmol/L of dithiothreitol, 5 mmol/L of phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mmol/L of pepstatin A, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of leupeptin, 5 mmol/L of EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aprotinin, and antiphosphatases; Roche Diagnostics, Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). Protein concentrations were determined with a bicinchoninic acid assay kit (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, Illinois) according to the manufacturer's instructions. Samples were resolved using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylfluoride membrane (Millipore Corp, Billerica, Massachusetts). Membranes were blocked with 5% non-fat skim milk in Tris-buffered saline solution with Tween-20

(TBS-T: 10 mmol/L of Tris, pH 7.5; 140 mmol/L of sodium chloride; and 0.1% Tween-20) for 1 hour at 37°C , washed, and incubated with the corresponding primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin. Membranes were then incubated for 12 hours with the appropriate antibody diluted 1:1000 in TBS: rabbit anti-P-ERK 1,2 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts); mouse monoclonal anti-(adenosine diphosphate-ribose)polymerase (PARP; Becton-Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey). The membranes were washed extensively in TBS. Detection was performed using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies and enhanced chemiluminescence reagents; the reagents (Millipore Corp) were used according to the manufacturer's instructions. The signal was recorded using a CCD camera (ChemImager 2; SynGene, Frederick, Maryland), and analyzed using Gene Tools software (SynGene).

Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using acid phenol extraction.⁷ One microgram of total RNA was reverse transcribed using a kit (SuperScript II; Invitrogen Corp, Carlsbad, California) following the manufacturer's instructions. The resultant complementary DNA was diluted 100-fold (conditions set to obtain 98% efficacy), and for each gene (target genes *Bcl-xL*, *CYP3A*, *hsp 27*, *hsp 60*, *hsp 70*, and *hsp 90* or reference genes *Psck1* and ribophorin-encoding genes) and each condition (CTZ, corn oil, or sham), a mixture of Taq polymerase, 6.4 mmol/L of magnesium chloride, deoxynucleotide triphosphate, primer, and the probe (<https://www.roche-applied-science.com>) was added. The cDNA was then amplified in a thermocycler (LightCycler 480; Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) for 45 cycles using conditions of 95°C and 60°C for 10 seconds each. Commercially available software (LightCycler 480; Roche Applied Science) was used for relative quantitative analysis.

Measurement of Plasma Transferase Concentrations

Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes at room temperature. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) concentrations were measured using an automatic analyzer (AU5400; Olympus Corp, Tokyo, Japan). Values are given as units per liter.

Statistical Analysis

Results are given as mean (SD). The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare mean values. $P < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

CTZ Protection Against Normothermic I/R-Induced Apoptosis

Animals treated with CTZ exhibited significantly lower serum concentrations of AST and ALT ($P < .05$) (Fig 1). The caspase target substrate, PARP, an important regulator of apoptosis was significantly decreased in the livers of corn oil-treated animals ($P < .05$) (Fig 2). This demonstrates that less cleavage of this protein occurred after ischemia in CTZ-treated animals.

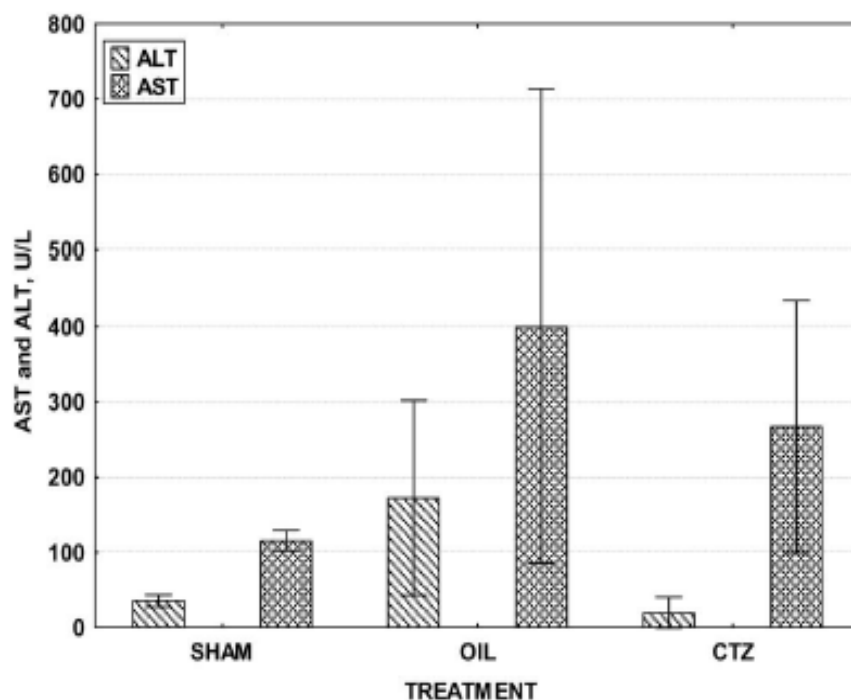


Fig 1. Serum concentrations of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) after ischemia-reperfusion of the whole liver. Animals in the clotrimazole (CTZ)-treated group demonstrated lower serum concentrations of ALT and AST; however, the difference was not statistically significant ($P < .05$). OIL = control group (corn oil).

PXR Transactivation and *Bcl-xL* gene Expression

Expression of *CYP3A1*, a known PXR target gene, was investigated to assess PXR transactivation in the mechanism of hepatic protection. The *CYP3A1* messenger RNA, as measured using quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, was expressed 5- to 6-fold in the

animals treated with CTZ, which indicates PXR transactivation ($P < .05$) (Fig 3). Inasmuch as we previously showed that activation of PXR promotes hepatocyte survival in vitro through modulation of the antiapoptotic protein *Bcl-xL* in rats,⁴⁻⁶ we investigated the level of expression of *Bcl-xL* gene after an apoptotic stimulus such as I/R of the

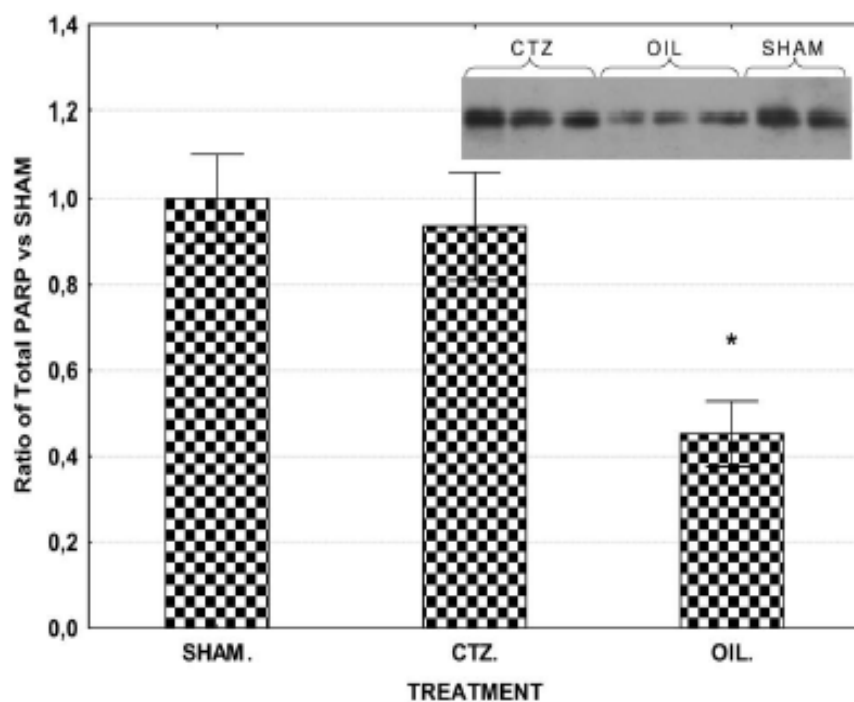
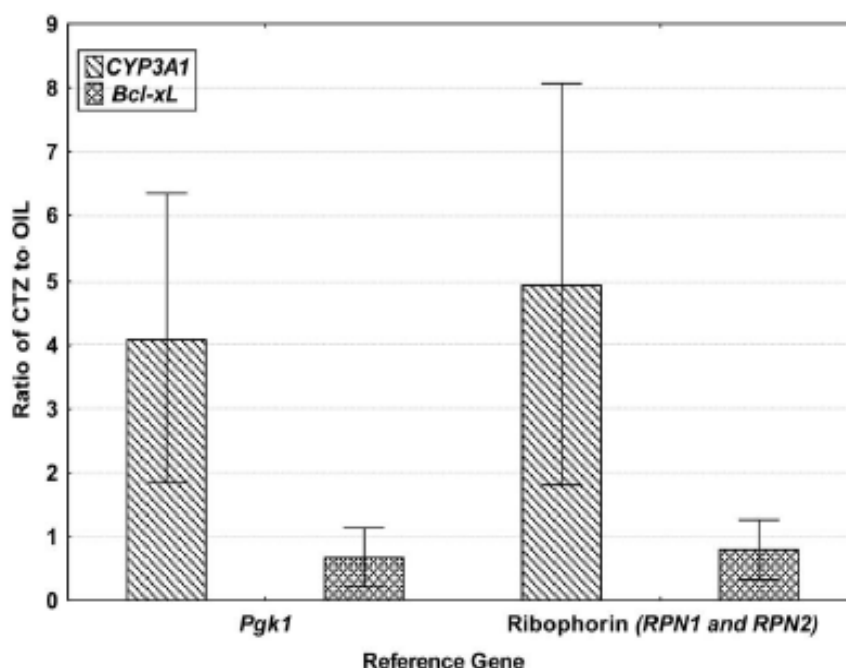


Fig 2. Western blot analysis of the poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase (PARP) concentration in liver tissue after ischemia-reperfusion. The caspase target substrate PARP is highly expressed in the liver of clotrimazole (CTZ)-treated animals compared with control animals ([corn] OIL). Data are expressed as the ratio between groups undergoing liver ischemia (CTZ and OIL) and untreated animals (SHAM group). * $P < .05$, SHAM vs OIL and CTZ vs OIL.

Fig 3. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *CYP3A1* and *Bcl-xL* gene expression in liver tissue after ischemia-reperfusion of the whole liver. Clotrimazole (CTZ) induced expression of *CYP3A1*, a known pregnane X receptor target gene, in the liver in CTZ-treated animals, whereas no expression of *CYP3A1* was detected in the liver in control animals ([com] OIL). Expression of the *Bcl-xL* gene was not significantly increased by CTZ treatment. The target genes (*CYP3A1* and *Bcl-xL*) are normalized to a reference gene (*Pgk1* and ribophorin-encoding genes (*RPN1* and *RPN2*)), and expressed as the mean (SD) ratio between the groups of animals undergoing liver ischemia treated with CTZ to OIL and the untreated group (SHAM).



liver. We observed no increase in expression of the *Bcl-xL* gene after treatment with CTZ (Fig 3).

Phospho-p44/42 ERK 1,2 and hsp27, 60, 70, and 90

Because it has been proposed that ERK 1,2 activation promotes survival in models of hepatic injury,⁸ we investi-

gated the expression of phospho-p44/42 ERK 1,2 in the liver after I/R injury. Expression of phospho-p44/42 ERK 1,2 was significantly increased in the liver in animals treated with CTZ ($P < .05$), which suggests that CTZ protects the liver against I/R-induced apoptosis via activation of phospho-p44/42 ERK 1,2 (Fig 4). Induction of stress response (heat

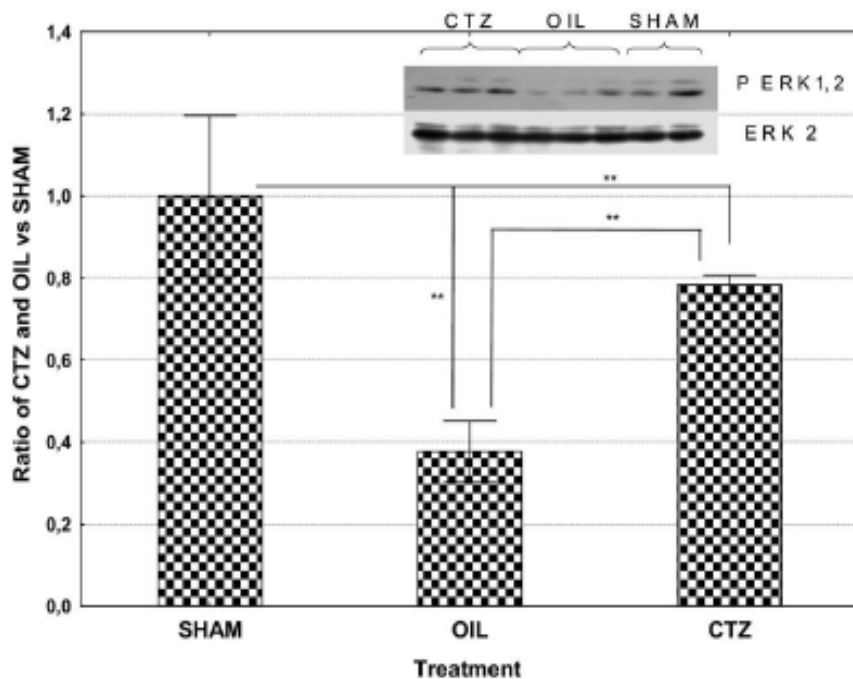


Fig 4. Western blot analysis of ischemia-reperfusion-induced phosphorylation of P-42/44 ERK in liver tissue. Clotrimazole (CTZ)-treated animals demonstrated a significant increase in expression of the antiapoptotic pro-survival P-41/44 ERK compared with control animals ([com] OIL). ERK-2 is used as loading control. Data are expressed as the ratio between the groups undergoing liver ischemia (CTZ and OIL) and the untreated group (SHAM). * $P < .05$.

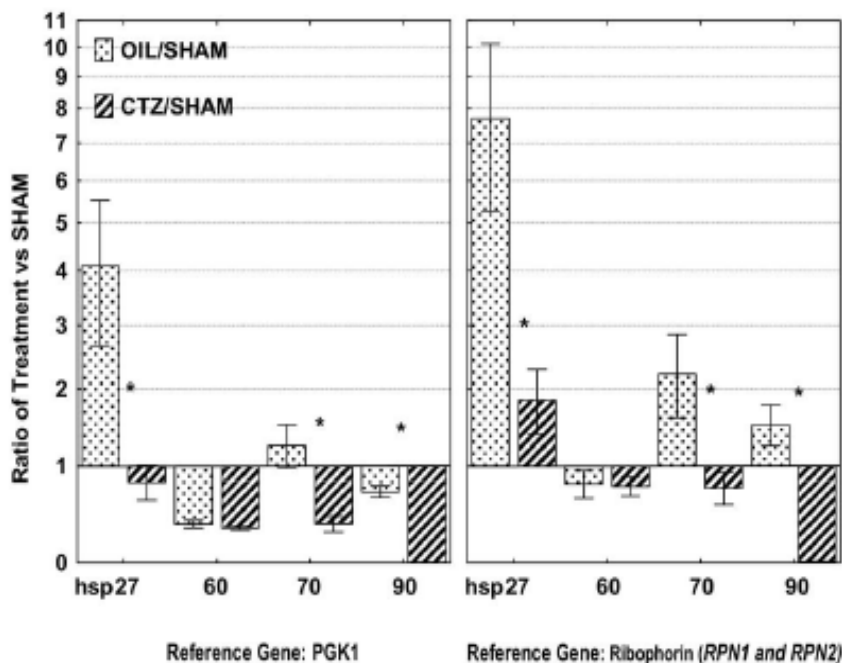


Fig 5. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *hsp 27*, *hsp 60*, *hsp 70*, and *hsp 90* gene expression in liver tissue after ischemia-reperfusion of the whole liver. Clotrimazole (CTZ) downregulated expression of the *hsp 27*, *hsp 70*, and *hsp 90* genes, whereas expression of *hsp 60* was not affected. Expression of target genes (*hsp 27*, *hsp 60*, *hsp 70*, and *hsp 90*) is given as the mean (SD) ratio between the groups of animals undergoing liver ischemia (CTZ and [com] OIL) and the untreated group (SHAM). The ratio is then normalized to a reference gene (Pgk1 or ribophorin-encoding genes (*RPN1* and *RPN2*)). * $P < .05$.

shock) proteins is involved in the process of apoptosis⁹; thus, we examined the effect of I/R injury on expression of *hsp 27*, *70*, *60*, and *90* genes in the liver. Expression of the *hsp 27*, *hsp 70*, and *hsp 90* genes was decreased in the liver in animals treated with CTZ (Fig 5); however, the level of hepatic expression of *hsp 60* mRNA was not affected by treatment with CTZ ($P < .01$). These data suggest that CTZ liver protection against I/R-induced apoptosis involves decreased expression of *hsp 27*, *70* and *90* genes.

DISCUSSION

Previous *in vitro* studies performed in our laboratory have shown that PXR modulates liver apoptosis.^{4,5} In human beings and in rats, activation of PXR promotes hepatocyte survival *in vitro* via modulation of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL.⁶ In the present study, treatment with CTZ, a known PXR transactivator, induced hepatocyte protection against normothermic I/R-induced injury, as indicated by the decreased serum concentrations of transaminases and significantly lower concentrations of cleaved PARP, which is a substrate of activated executioner caspase 3 and a marker of apoptosis.¹⁰

Treatment with CTZ activated PXR, as demonstrated by increased expression of *CYP3A*, a known target of PXR and an indicator of PXR transactivation.¹¹ However, expression of the *Bcl-xL* gene, which codes for the antiapoptotic protein Bcl-xL, was not increased.

We also investigated the effect of CTZ on regulation of ERK 1,2, a protein of the mitogen-activated protein kinase family. We observed a significant increase in expression of

ERK 1,2, the activated form that has an antiapoptotic prosurvival effect against I/R-induced liver apoptosis.⁸

Induction of hsps is a highly conserved mechanism that protects various cell types from diverse physiologic and environmental stresses. The (hsps) serve as molecular chaperones that facilitate the folding of enzymes and other proteins into functional conformations. They may also be involved in regulation of the process of apoptosis.⁹ Treatment with CTZ was associated with decreased gene expression of *hsp 27*, *hsp 70*, and *hsp 90* but not *hsp 60*. Expression of *hsp 90* was extremely decreased by treatment with CTZ compared with expression of other studied HSPs (Fig 5). Heat shock protein is able to bind the proapoptotic protein twice daily and to maintain it in an inactive form.¹² This model may explain the prosurvival antiapoptotic effects of *hsp 90* depletion after treatment with CTZ.

REFERENCES

- Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski JW: Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplant Rev* 14:106, 2000
- Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al: A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 13:253, 1999
- Kakizaki S, Yamazaki Y, Takizawa D, et al: New insights on the xenobiotic-sensing nuclear receptors in liver diseases: CAR and PXR. *Curr Drug Metab* 9:614, 2008
- Bailly-Maitre B, de Sousa G, Boulukos K, et al: Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ* 8:279, 2001
- Bailly-Maitre B, de Sousa G, Zucchini N, et al: Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes:

molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. *Cell Death Differ* 9:945, 2002

6. Zucchini N, de Sousa G, Bailly-Maitre B, et al: Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1745:48, 2005

7. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987

8. Cursio R, Filippa N, Miele C, et al: Involvement of protein kinase B and mitogen-activated protein kinases in experimental normothermic liver ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 93:752, 2006

9. Beere HM: Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115:2633, 2005

10. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, et al: Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346, 1994

11. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, et al: Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12208, 1998

12. Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, et al: Increased heat shock protein 90 (hsp 90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol* 157:4109, 1996

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus qui interviendrait lors des étapes précoces (fibrose) et tardives (métastases) de cancérogenèse. Elle consiste en la perte des caractères cellulaires épithéliaux tels que les jonctions adhérentes, pour le gain de propriétés mésenchymateuses, et confère ainsi aux cellules la capacité de migration et d'invasion. Nos travaux ont eu pour objectifs d'identifier et de caractériser, sur des cellules d'origine hépatique, des biomarqueurs de TEM, afin d'évaluer de manière prédictive et fiable les effets pro-tumoraux de contaminants chimiques environnementaux. Nous avons d'abord décrypté les événements cellulaires et moléculaires intervenant en réponse à des inducteurs de TEM, tels que le TPA sur la lignée HepG2 et le TGF β sur des hépatocytes humains en culture primaire. Puis, combinés à l'utilisation d'une technologie innovante de mesure de l'impédance cellulaire en temps réel et à d'autres biomarqueurs (apoptose, cycle cellulaire...), ces travaux nous ont permis d'estimer l'impact de pesticides dans l'initiation de la TEM et leur potentiel cancérogène sur le foie.

Mots clés : TEM, biomarqueurs, foie, xénobiotiques environnementaux, cancer.

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a process that occurs during the early (fibrosis) and late (metastases) stages of carcinogenesis. It is defined as the loss of epithelial characteristics such as cell adherent junctions and the gain of mesenchymal properties, thereby conferring to cells the ability to migrate and invade. Our objectives were to identify and characterize, in hepatic cells, EMT biomarkers that could reliably predict pro-tumoral effects of environmental chemical contaminants. We first characterized the cellular and molecular events that occur in response to EMT inducers, such as TPA on cell line HepG2 and TGF β on human hepatocytes in primary culture. Then, using an innovative technology capable of measuring real time cellular impedance alongside other biomarkers of such as apoptosis and the cell cycle, we estimated the impact of pesticides on EMT and assessed their carcinogenic potential on liver.

Key-words: EMT, biomarkers, liver, environmental xenobiotics, cancer