Université de Poitiers

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

Diplôme National - Arrêté du 25 Mai 2016

Ecole doctorale Sciences Biologiques et Santé N° 615

Discipline : **Biologie, Médecine, Santé**

Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Présentée par :

Zeinaba DAOUD OMAR

Impact du microenvironnement tumoral dans le processus invasif de glioblastome humain après exposition au Bisphénol A et ses dérivés chlorés : Implication de la Connexine 43

Sous la direction du Professeur **Marc MESNIL** et du Docteur **Norah DEFAMIE**

Soutenue publiquement le 19/12/2019
devant la commission d'Examen

JURY

Pr Denis SARROUILHE	Professeur, Université de Poitiers	Président
Dr B. LE MAGUERESSE-BATTISTONI	Directrice de Recherche INSERM, Université de Lyon	Rapporteur
Dr Ingrid ARNAUDIN	Professeure, Université de la Rochelle	Rapporteur
Dr Mickaël DERANGEON	Maître de Conférences, Université de Nantes	Examinateur
Dr Norah DEFAMIE	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examinateur
Pr Marc MESNIL	Professeur, Université de Poitiers	Examinateur

A mes chers Parents qui m'aiment plus

que tout et que j'aime énormement

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier vivement, Monsieur le Professeur Denis SARROUILHE de l'université de Poitiers d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur le Docteur Michaël Derangeon, maitre de conférences à l'université de Nantes, d'avoir accepté de faire partie de ce membre de jury pour juger mon travail.

Particulièrement, mes remerciements les plus distinguées vont à Mesdames, B. LE MAGUERESSE-BATTISTONI Directrice de recherche INSERM de l'université de Lyon et le Docteur Ingrid ARNAUDIN maitre de conférences à l'université de la Rochelle pour être les rapporteurs de cette thèse.

Mes plus profonds remerciements pour mon directeur de thèse Monsieur le professeur Marc MESNIL. Je vous remercie pour votre patience sans égale et tout votre temps que vous avez investi pour la correction de mon manuscrit. Vous êtes une personne calme et passionné dans votre travail. Je vous admire pour votre personnalité exceptionnelle. Je n'aurais pas pu trouver meilleur encadrant que vous.

Mes chaleureuses remerciement à ma co-directrice de thèse Madame le Docteur Norah DEFAMIE de m'avoir fait confiance, de m'encourager pour faire une thèse et d'intégrer particulièrement cette équipe. (Toute ma famille vous est reconnaissante pour m'avoir supporté à aller plus loin dans mes études). Merci encore pour vos précieuses conseils qui m'ont été d'une grande utilité durant ces années de thèse. Je n'oublierai jamais vos motivation d'or ainsi que votre sens de l'humour qui me réconfortaient durant les moments difficiles (« tout ira bien, ça passe vite, tu seras tranquille après »). Merci également pour toutes vos corrections et remarques apportés pour ce manuscrit. J'ai le sourire aux lèvres à chaque fois que je me rappelle le jour où vous m'avez traité de « tricheuse » parce que je faisais le jeûne de rattrapage du mois de Ramadan durant l'hiver car la durée de la journée est plus courte.

Je souhaite remercier Dr Amandine CHEPIED pour son appuie dans le moment de besoin et de soutiens que j'apprécie beaucoup. Depuis mon master, tu as toujours été là à mes côtés pour me tenir la main afin de mener à bien mon projet. Je te remercie particulière pour ton aide en comptant le nombre d'invadopodes (quel galère ça été !).

Mes remerciements le plus reconnaissant d'adressent au Dr Annie Claire BALANDRE pour sa gentillesse, sa sympathie et sa détermination à trouver tout ce dont j'ai besoin pour mes manips (pour moi vous avez toujours été un ange gardien). Je garderai en mémoire tout le moment partager avec vous. Votre bonne humeur et votre personnalité chaleureuse m'ont toujours réconforté.

Je tiens à remercier mes deux collègues doctorantes Indri et Aurélie ainsi que le Dr Jonathan pour leur soutient morale et leur bonne ambiance. Grace à nos caractères distinctifs et exceptionnels, on dégageait une ambiance de folie et de fous rires (même lorsqu'on déprimait).

Je remercie Ludivine et Cedric pour tout ce moment agréable qu'on a partagé pendant notre pose déjeuner.

Je souhaite remercier tout le membre de l'équipe 4CS ainsi que les personnels de Prébios, sans oublier toutes les personnes qui m'ont aidé au sein de laboratoire de STIM.

Je remercie chacune de mes amis (es) (Ayane, Asma, Aicha, Faiza, Zeinab, Asma Deka, Maha, Karima, Hibo Ahmed, Mouna droit, Mouna chimie, Biliso, Safa, Zamzam, Mariam, Khola, Habiba, Nassima, Asma tchadiennes, Fatima et Fatima-Zahra les marocaines, Salwa, Momina Mohamed Emmanuel, Fathi, Saad, Aden, Ahmed Hassan,Hamadou, Omar papa, Aboubakar) pour leurs bonnes compagnies, leurs soutiens et leur joie de vivre. Merci infiniment d'avoir été présent à mes côtés durant les moments difficiles aussi bien que durant les meilleurs moments de ma vie (particulièrement à mon mariage et à la naissance de mon bébé). Vous êtes des amis (es) d'ange et d'or que je n'oublierais jamais.

Un grand merci à mon cher mari Mohamed et sa famille particulièrement sa sœur Amina pour son soutient morale et sa bonne humeur. Je suis reconnaissant à mon mari d'avoir supporté mes sauts d'humeur durant ces années de galères. Tu m'as été d'un soutient inégale et je te demande pardon pour tous ces années d'absences.

A la prunelle de mes yeux, Fatima-Zahra, j'adresse ma plus grande gratitude pour être mon anti-stress. Quelques soit les galères passés durant la journée, tu réchauffes mon cœur et tu illumines mes yeux par ta seul présence. Merci d'avoir partagé ces années de fin d'étude si importante et si difficile (tu as été une combattante à mes côtés).

Je dois ma plus grande gratitude à ma chère famille, particulièrement ma sœur Fatouma et mes frères (Ahmed, Mohamed, Habib, Masseoud et Souleiman) qui m'ont été d'un soutien exceptionnel

et sans égale. Merci encore Fatouma pour être la meilleur sœur et de m'avoir soutenu physiquement que moralement. A mon frère Habib, un vif remerciement pour son soutien financier dans le moindre besoin ainsi que sa visite chaleureuse durant ces vacances.

Le meilleur pour la fin, je ne saurais jamais remercié suffisamment ma chère mère qui est la femme la plus courageuse que je n'ai jamais connue. Durant mes années études, elle veillait la nuit à mes côtés pour me tenir compagnie pendant que je révisais (et tout ça sans en comprendre un mot !) de loin c'est ma supportrice n°1.

Une pensé à mon défunt père parti très tôt qui serais certainement fier de moi.

Tables des Matières

REMERCIEMENTS **2**

Abréviations 9

Table des figures 13

Table des tableaux 17

Préambule 18

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 19

1. Maladies chroniques 20
   - 1.1 Épidémiologie 20
   - 1.2 Facteurs génétiques 21
   - 1.3 Facteurs environnementaux 21
   - 1.4 Exposome 22
2. Les perturbateurs endocriniens : le cas du Bisphénol A 24
   - 2.1 Définition 24
   - 2.2 Sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens et effets physiologiques 25
   - 2.3 Les modes d'action : différents concepts 29
     - 2.3.1 L'effet à faible dose et la relation dose-réponse 30
     - 2.3.2 La fenêtre de vulnérabilité 30
     - 2.3.3 Les effets cocktails 31
     - 2.3.4 L'effet multigénérationnel 32
   - 2.4 Bisphénol A : BPA 32
     - 2.4.1 Historique et utilisation du BPA 32
     - 2.4.2 Propriétés physico-chimiques du BPA 34
     - 2.4.3 Sources d'exposition et exposition interne au BPA 34
     - 2.4.4 Métabolisme du BPA chez les Mammifères 36
     - 2.4.5 Les mécanismes d'action du BPA 36
     - 2.4.6 Les effets du BPA 37
     - 2.4.7 Données réglementaires sur l'utilisation du BPA 39
     - 2.4.8 Dérivés chlorés du BPA 40

3. Généralités sur le cancer : le cas des gliomes 41
3.1 Définition 41
3.2 Épidémiologie du cancer 41
3.3 Processus de cancérisation 44
3.4 Gliomes et Glioblastomes 46
3.4.1 Les tumeurs cérébrales et leur classification 46
3.4.2 Glioblastomes 47
3.4.3 Altérations génétiques et moléculaires 48
3.4.4 Étiologie de glioblastome 51
3.4.5 Présentation clinique et thérapie 53
3.5 Le microenvironnement tumoral 54
3.5.1 Les cellules du microenvironnement tumoral 55
3.5.1.1 Les cellules souches tumorales 55
3.5.1.2 Les cellules endothéliales 56
3.5.1.3 Les péricytes 57
3.5.1.4 Les cellules immunitaires 58
3.5.1.5 Les astrocytes 58
3.5.2 Vascularisation des glioblastomes 60
3.5.3 La composante moléculaire et les propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral 61
3.6 Processus d'invasion et de migration des glioblastomes 64
3.6.1 Invasion 64
3.6.1.1 Les invadopodes 66
3.6.2 Migration 68
4. Les jonctions communicantes 70
4.1 Historique 70
4.2 Les jonctions gap 71
4.3 Les protéines des jonctions communicantes 72
4.3.1 Les connexines 73
4.3.1.1 Les gènes de connexines 73
4.3.1.2 Nomenclature 74
4.3.1.3 Distribution tissulaire des connexines 74
4.3.1.4 Topologie et organisation structurelle des connexines 76
4.4 Biosynthèse et dégradation de jonction gap 78
4.5 Régulation fonctionnelle des jonctions communicantes 79
4.5.1 Sensibilité fonctionnelle 79
4.5.2 Perméabilité sélective des jonctions gap 80

4.5.3 Partenaires protéiques et phosphorylation des connexines 81
4.6 La fonction hémicanal 83
4.7 Fonctions physiologique et physiopathologique des connexines 85
4.8 Connexine, cancer et Bisphénol A 88
4.8.1 Connexine et cancer 88
4.8.2 Connexines et système nerveux central 91
4.8.2.1 Les connexines dans le cerveau 91
4.8.2.2 Connexines et gliome 92
4.8.3 Connexine et Bisphénol A 93

PARTIE 2 : CONTEXTE ET OBJECTIFS 94

Contexte 95
Objectifs 97

PARTIE 3 : MATERIELS ET METHODES 98

1. Matériels biologiques 99
2. Exposition des souris au BPA et à ses dérivés chlorés 99
3. Culture primaire d'astrocytes 100
4. Culture cellulaire 102
5. Test XTT 103
6. Traitements des cellules 104
7. Western Blot 104
8. RT-PCR quantitative 108
9. Immunofluorescence 110
10. Test d'observation et de quantification des invadopodes 111
11. Test de migration 2D 113
12. Test d'invasion et de migration 3D 113
13. Dye uptake "test des hémicanaux" 116
14. Test de communication (Technique de Parachute) 117
15. Scrape Loading 118
16. Analyses statistiques 118

PARTIE 4 : RESULTATS..... 119

1. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur l'expression et les fonctions de la Cx43 des cellules U251 de glioblastome humain:..... 120

1.1. Caractérisation des cellules U251 de glioblastome humain présentant différents niveaux d'expression de la Cx43..... 120

1.2. Détermination de la concentration de BPA et de ses dérivés chlorés à utiliser sur les cellules U251 121

1.3. Effet du BPA et de ses dérivés chlorés sur le niveau d'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules U251 122

1.4. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les fonctions de la Cx43 dans les cellules U251 127

2. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur l'expression et les fonctions de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes:..... 130

2.2. Etude fonctionnelle de la Cx43 d'astrocytes issus de souriceaux dont les mères ont été traitées au BPA et ses dérivés chlorés..... 135

3. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les capacités de migration et d'invasion des cellules U251 de glioblastome humain 137

3.1. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur la capacité de migration 2D des cellules U251 137

3.2. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les capacités de migration et d'invasion 3D des cellules U251..... 140

3.3. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur la formation d'invadopodes par les cellules U251 142

3.4. Effet du milieu de culture d'astrocytes provenant de souriceaux exposés au cours de leur développement (*in utero* et allaitement) au BPA et ses dérivés chlorés sur la migration et l'invasion 3D des cellules U251..... 144

3.4.1. Migration 3D..... 144

3.4.2. Invasion 3D 146

3.5. Effet des milieux de culture d'astrocytes sur la formation d'invadopodes par les cellules U251 149

PARTIE 5 : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES 152

Annexes 166

Références bibliographiques..... 266

Abréviations

ADN	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ANSES	**A**gence **N**ational de **Sé**curité **S**anitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AR	**A**ndrogen **R**ecptor
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm	ARN **m**essager
ATP	**A**dénosine **T**ri**P**hosphate
BPA	**B**is**P**hénol **A**
BSA	**B**ovine **S**erum **A**lbumin
Calcéine-AM	Calcéine-**A**cétoxy**M**éthyle ester
Cav	**C**avéoline
Cdc	**C**yclin-**D**ependent **K**inase
CDKN2A/B	**C**yclin **D**ependent **k**inase inhibitor 2A/B
CIRC	**C**entre **I**nternational de **R**echerche sur le **C**ancer
CSC	**C**ellule **S**ouche **C**ancéreuse
CSN	**C**ellule **S**ouche **N**eurale
Cx	**C**onnexine
DES	**D**i**E**thyl**S**tilbestrol
DMEM	**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium
DMSO	**D**i**M**éthyl**S**ulf**O**xyde
dNTP	**D**ésoxy**N**ucléotide **T**ri**P**hosphate
DO	**D**ensité **O**ptique
ECL	**E**nhanced **C**hemi**L**uminescence
ECM	**E**xtra**C**ellulaire **M**atrix (MEC)
EDTA	**E**thylène **D**iamine **T**étra **A**cétique
EFSA	**E**uropean **F**ood **S**afety **A**uthority (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)
EGF	**E**pidermal **G**rowth **F**actor
EGFR	**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor
EGTA	**E**thylène **G**lycol **T**étra **A**cétique

EPA	**E**nvironnemental **P**rotection **A**gency
ER	**E**stradiol **R**eceptor
ERR gamma	**E**strogen **R**elated **R**eceptor gamma
FFA	**F**ul**F**enamique **A**cid (acide fulfénamique)
GAPDH	**G**lycer**A**ldehyde-3-**P**hosphate **D**es**H**ydrogenase
GBM	**G**lioBlastome **M**ultiforme
GFAP	**G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein
GPR30	**G** **P**rotein-coupled **R**ecptor 30
HC	**H**émi**C**anal
HCl	Acide Chloridique
HIF	**H**ypoxic **I**nduced **F**actor
HEPES	acide 4-(2-**H**ydroxy**E**thyl)-1-**P**iperazine **E**thane **S**ulfonique
HRP	**H**orse**R**adish **P**eroxidase
IDH	**I**socyante **D**es**H**ydrogenase
IL	**I**nter**L**eukine
IP3	**I**nositol **triP**hosphate
KCl	Chlorure de Potassium
KDa	**K**ilo**Da**lton
LOAEL	**L**owest **O**bserved **A**dverse **E**ffect **L**evel (dose minimum avec effet toxique observable)
LOH 10q	**L**oss **O**f **H**eterozygositiy on chromosom 10q
MAP	**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein
MEC	**M**atrice **E**xtra**C**ellulaire
$MgCl_2$	Chlorure de Magnésium
MGMT	O_6-**M**ethyl**G**uanine DNA **M**ethyl**T**ransferase
MMP	**M**atrix **M**etallo**P**roteinase (Métalloprotéinase matricielle)
MT-MMP	**M**embrane-**T**ype **MMP** (métalloprotéinase matricielle de type membranaire)
Na_3VO_4	Sodium orthovanadate
NaCl	Chlorure de Sodium
NaF	Fluorure de Sodium

NaH_2PO_4	Dihydrogénophosphate de Sodium
$NaHCO_3$	Bicarbonate de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NOAEL	**N**o **O**bserved **A**dverse **E**ffect **L**evel (Dose sans effect toxique observable)
OMS	**O**rganisation **M**ondial de la **S**anté
PBS	**P**hosphate **B**uffered **S**aline
PCR	**P**olymerase **C**hain **R**eaction
PDGF	**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor
PDGFR	**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor **R**ecptor
PE	**P**erturbateur **E**ndocrinien
PFA	**P**ara**F**orm**A**ldéhyde
pH	**p**otentiel **H**ydrogène
PI3K	**P**hospho**I**nositide 3-**K**inase
PKA/C	**P**rotéine **K**inase A/C
PMSF	**F**luorure de **P**hényl**M**ethyl**S**ulfonyl
PTEN	**P**hosphatase and **Ten**sin homolog
PXR	**P**regnane **X** **R**eceptor
qPCR	**q**uantitative- **P**olymerase **C**hain **R**eaction
RB	gène de **R**étino**B**lastome
RT-PCR	Real Time - **P**olymerase **C**hain **R**eaction
SDS	**S**odium **D**odecyl **S**ulfate
SERM	**S**elective **E**strogen **R**eceptor **M**odulator
ShRNA	**S**mall **H**airpin **R**ibo**N**ucleic **A**cid
SNC	**S**ystème **N**erveux **C**entral
Src	**S**a**rc**oma thyrosine kinase
SVF	**S**érum de **V**eau **F**œtal
TBS-T	**T**ris-**B**uffered **S**aline **T**ween-20
TKS5	**T**yrosine **K**inase **S**ubstrate with 5 SH3 domains
TNF	**T**umor **N**ecrosis **F**actor
VEGF	**V**ascular **E**ndothélial **G**rowth **F**actor

VEGFR	**V**ascular **E**ndothélial **G**rowth **F**actor **R**ecptor
(N)-WASP	(**N**euronal)-**W**iskott-**A**ldrich **S**yndrome **P**rotein
WT	**W**ild **T**ype (phenotype sauvage)
ZO	**Z**ona-**O**ccludens
ZSV	**Z**one **S**ous **V**entriculaire

Les unités :

Rpm	Rotation par minute
HTZ (+/-)	hétérozygote
WT (+/+)	sauvage
%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius
h	heures
min	minutes
Hz	Hertz
G	grammes
L ou l	Litres
M	molaire
p/n/µ /m	pico/nano/micro/milli

Table des figures

Figure 1 : Pourcentage des causes de mortalite en France par maladies chroniques, tous ages et sexes confondus (OMS, 2016). 20

Figure 2: La complexite de l'exposome *(Wild, 2012)*. 23

Figure 3: Variation temporelle des differentes expositions au cour de la vie *(Athersuch, 2012)*... 23

Figure 4: Glandes endocrines ciblees par les PE (Diamanti-Kandarakis et al, 2009)..... 26

Figure 5: Les cibles et les mecanismes d'action des PE sur le systeme endocrinien ("Perturbateurs endocriniens, le temps de la precaution," n.d.). 27

Figure 6: Exemple de voies de signalisation de recepteurs d'hormones steroïdiennes (Schug et al., 2011). 28

Figure 7: L'exposition aux PE peut induire des alterations epigenetiques a l'origine de pathologies chez l'individu expose (F0) et dans sa descendance (Schug et al., 2011). 29

Figure 8 : Courbes dose-reponse monotone et non monotone (Vandenberg et al., 2012). 30

Figure 9 : Illustration des expositions precoces entrainant des modifications fonctionnelles a l'origine de pathologies chez l'adulte (Schug et al., 2011). 31

Figure 10: Structure chimique du Bisphenol A (BPA), du Diethylstilbestrol (DES) et de l'Estradiol (Rubin, 2011)..... 33

Figure 11 : Les diverses utilisations du BPA et de ses derives dans le domaine industriel ("Bisphenol A," n.d.)..... 33

Figure 12 : Structure chimique du BPA et de ses derives chlores (Fukazawa et al., 2001). 40

Figure 13: Incidence et mortalite par cancer en France metropolitaine ("Projection de l'incidence et de la mortalite par cancer en France metropolitaine en 2017 / 2018 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et syntheses / Publications et outils / Accueil," n.d.). 42

Figure 14: Incidence des tumeurs solides en France metropolitaine chez les femmes (vert) et les hommes (rouge) (INCa, 2017). 43

Figure 15: Mortalite par cancer (tumeurs solides) en France metropolitaine chez les femmes (vert) et les hommes (rouge) (INCa, 2017). 43

Figure 16: Les differentes caracteristiques des cellules cancereuses (Hanahan and Weinberg, 2011). 44

FIGURE 17: LES DIFFERENTES ETAPES DE LA CANCEROGENESE (INITIATION, PROMOTION ET PROGRESSION) (LIU ET AL., 2015). 45

FIGURE 18: LES DIFFERENTS GRADES DES GLIOMES SELON L'OMS (LOUIS ET AL., 2016). 47

FIGURE 19: REPARTITION DES GLIOMES PAR SOUS-TYPES HISTOLOGIQUES *(N = 96 448), RAPPORT STATISTIQUE CBTRUS : NPCR ET SEER, 2007-2011 (OSTROM ET AL., 2014).* 48

FIGURE 20: ALTERATIONS GENETIQUES ET DES VOIES DE SIGNALISATION A L'ORIGINE DES GLIOBLASTOMES (MASUI ET AL., 2012)..... 49

FIGURE 21: ALTERATIONS GENETIQUES DE TROIS VOIES DE SIGNALISATION (A, RTK/RAS/PI-3K ; B, P53 ET C, RB) FREQUEMMENT OBSERVEES DANS LES GLIOBLASTOMES ("COMPREHENSIVE GENOMIC CHARACTERIZATION DEFINES HUMAN GLIOBLASTOMA GENES AND CORE PATHWAYS," 2008)..... 50

FIGURE 22: ALTERATIONS GENETIQUES SEQUENTIELLES OBSERVEES DANS LA PATHOGENESE DES DIFFERENTS SOUS-GROUPES DE GLIOBLASTOME *(VAN MEIR ET AL., 2010).* 51

FIGURE 23: ORIGINES CELLULAIRES POSSIBLE DES GLIOBLASTOMES (VAN MEIR ET AL., 2010). 52

FIGURE 24: INTERACTIONS COOPERATIVES ENTRE LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES (CSC), LES CELLULES TUMORALES ET LEUR MICROENVIRONNEMENT (BONAVIA ET AL., 2011). 54

FIGURE 25: LES COMPOSANTES CELLULAIRES DU MICROENVIRONNEMENT D'UN GLIOBLASTOME (DE VLEESCHOUWER AND BERGERS, 2017). 55

FIGURE 26: LES ASTROCYTES MODULENT LA PROGRESSION TUMORALE EN FAVORISANT LA PROLIFERATION, L'INVASION, LA CHIMIOPROTECTION ET LA PROTECTION IMMUNITAIRE (PLACONE ET AL., 2016)..... 59

FIGURE 27: LES DIFFERENTS MECANISMES DE NEOVASCULARISATION DES GLIOMES (HARDEE AND ZAGZAG, 2012) 61

FIGURE 28: DIVERSES FONCTIONS DES MMPS DANS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL (KESSENBROCK ET AL., 2010). 62

FIGURE 29: LES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA MASSE TUMORALE HYPOXIQUE (BRAHIMI-HORN ET AL., 2007). 63

FIGURE 30: LES DIFFERENTES ETAPES DU PROCESSUS D'INVASION D'UNE CELLULE CANCEREUSE (VEISEH ET AL., 2011). 64

FIGURE 31: LES ETAPES DE FORMATION ET DE MATURATION DES INVADOPODES *(OSER ET AL., 2009).* 68

FIGURE 32: DIVERSITE DES MECANISMES DE MIGRATION TUMORALE (FRIEDL AND WOLF, 2003). 69

FIGURE 33: ILLUSTRATION DES DIFFERENTES FORCES IMPLIQUEES DANS LA MIGRATION CELLULAIRE (LAUFFENBURGER AND HORWITZ, 1996). 70

FIGURE 34: OBSERVATION DE JONCTIONS GAP D'HEPATOCYTES DE SOURIS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (GOODENOUGH ET AL 2009). 72

FIGURE 35: STRUCTURE DE GENE DE CONNEXINE (SÖHL AND WILLECKE, 2004). 74

FIGURE 36: STRUCTURE ET ASSEMBLAGE DES CONNEXINES EN JONCTIONS GAP (LAIRD, 2006)..... 77

FIGURE 37: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE BIOSYNTHESE ET DE DEGRADATION DES JONCTIONS GAP (SEGRETAIN AND FALK, 2004). 79

FIGURE 38: PERMEABILITE SELECTIVE DES JONCTIONS GAP AUX SECONDS MESSAGERS (MESE ET AL., 2007).... 81

FIGURE 39: LES DIFFERENTS SITES DE PHOSPHORYLATION PRESENTS DANS LE DOMAINE C-TERMINAL DE LA CX43 (LAMPE AND LAU, 2004). 83

FIGURE 40: REPRESENTATION SCHEMATIQUE ET PERMEABILITE DES CANAUX INTERCELLULAIRES ET DES HEMICANAUX FORMES DE CONNEXINES (MAYORQUIN ET AL., 2018)..... 84

FIGURE 41: LES DIFFERENTS ROLES PHYSIOLOGIQUES DES CONNEXINES EN TANT QUE MEDIATEURS DE LA COMMUNICATION JONCTIONNELLE OU EN TANT QU'HEMICANAUX DANS DIVERS ORGANES (KAR ET AL., 2012). 86

FIGURE 42 : ROLE DES CONNEXINES DANS LA PROGRESSION TUMORALE (AASEN ET AL., 2016)..... 89

FIGURE 43 : ROLE FONCTIONNELS ET CIRCUITS REGULATEURS DE LA CX43 DANS LA PROGRESSION TUMORALE (WU AND WANG, 2019). 90

FIGURE 44 : L'EXPRESSION DES DIFFERENTES CONNEXINES DANS LE RESEAU GLIAL (LAPATO AND TIWARI-WOODRUFF, 2018). 91

FIGURE 45 : POURCENTAGE DE SURVIE DES SOURIS F1 APRES EXPOSITION AU BPA ET SES DERIVES CHLORES DURANT LA GESTATION ET LA LACTATION. 97

FIGURE 46: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EXPOSITIONS DES SOURIS AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES. 100

FIGURE 47: CULTURES SUR INSERTS (PORES 1µM) POUR L'OBSERVATION ET LE COMPTAGE DES INVADOPODES FORMES PAR LES CELLULES U251. 112

FIGURE 48 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE CIM-PLATE 16 PERMETTANT D'ANALYSER LES CAPACITES DE MIGRATION ET D'INVASION 3D DES CELLULES TESTEES..... 114

FIGURE 49 : NIVEAU D'EXPRESSION DE LA CX43 DANS LES CELLULES U251 MOCK ET SHRNA..... 120

FIGURE 50 : ESTIMATION DE LA TOXICITE IN VITRO DU BPA ET DE SES DERIVES CHLORES SUR LES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA 122

FIGURE 51 : ESTIMATION DE L'EFFET DU BPA ET DE SES DERIVES CHLORES SUR L'EXPRESSION DE LA CX43 (ARNM ET PROTEINE) DANS LES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA..... 124

FIGURE 52 : LOCALISATION DE LA CX43 DANS LES CELLULES U251 MOCK TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES. 125

FIGURE 53 : LOCALISATION DE LA CX43 DANS LES CELLULES U251 SHRNA TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES 126

FIGURE 54 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE COMMUNICATION JONCTIONNELLE DES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA TRAITEES AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES PAR LA TECHNIQUE DU PARACHUTE..... 127

FIGURE 55 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE COMMUNICATION JONCTIONNELLE DES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES PAR LA TECHNIQUE DU SCRAPE LOADING..... 128

FIGURE 56 : ÉTUDE DE L'ACTIVITE HEMICANAL DANS LES CELLULES U251MOCK ET U251SHRNA TRAITEES OU NON PAR LE BPA ET SES DERIVES CHLORES..... 129

FIGURE 57 : EXPRESSION DE LA CX43 (ARNM ET PROTEINE) DANS LES ASTROCYTES PRIMAIRES ISSUS DE SOURICEAUX ($Cx43^{+/-}$ ET $Cx43^{+/+}$) TRAITES OU NON DURANT LEUR GESTATION ET L'ALLAITEMENT AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES (C, D, C+D) 132

FIGURE 58 : LOCALISATION DE LA CX43 DANS LES CULTURES PRIMAIRES D'ASTROCYTES WT (ASTRO WT) ISSUES DE SOURICEAUX DONT LES MERES ONT ETE TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES..... 133

FIGURE 59 : LOCALISATION DE LA CX43 DANS LES CULTURES PRIMAIRES D'ASTROCYTES +/- (ASTRO +/-) ISSUES DE SOURICEAUX DONT LES MERES ONT ETE TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES..... 134

FIGURE 60 : ETUDE DE L'ACTIVITE HEMICANAL DE LA CX43 DANS LES CULTURES PRIMAIRES D'ASTROCYTES (WT ET +/-) ISSUES DE SOURICEAUX DONT LES MERES ONT ETE TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES..... 135

FIGURE 61 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE COMMUNICATION JONCTIONNELLE D'ASTROCYTES (WT ET +/-) ISSUS DE SOURICEAUX DONT LES MERES ONT ETE TRAITEES OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES. 136

FIGURE 62 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE MIGRATION 2D DES ASTROCYTES (WT, +/-) ET DES CELLULES U251 DE GLIOBLASTOME HUMAIN (U251 MOCK, U251 SHRNA) PAR LA TECHNIQUE DU WOUND HEALING APRES TRAITEMENT OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES..... 139

FIGURE 63 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE MIGRATION ET D'INVASION 3D DES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA APRES TRAITEMENT OU NON AU BPA ET A SES DERIVES CHLORES. 140

FIGURE 64 : QUANTIFICATION DES INVADOPODES FORMES PAR LES CELLULES U251 MOCK ET U251 SHRNA APRES TRAITEMENT OU NON PAR LE BPA ET SES DERIVES CHLORES. 143

FIGURE 65 : ESTIMATION DE LA CAPACITE DE MIGRATION 3D DES CELLULES U251 MOCK ET SHRNA EN PRESENCE DU MILIEU CONDITIONNE D'ASTROCYTES WT OU +/- PROVENANT DE SOURICEAUX TRAITES OU NON AU BPA ET SES DERIVES CHLORES..... 145

FIGURE 66 : ESTIMATION DE LA CAPACITE D'INVASION 3D DES CELLULES U251 MOCK ET SHRNA EN PRESENCE DU MILIEU CONDITIONNE D'ASTROCYTES WT OU +/- PROVENANT DE SOURICEAUX TRAITES OU NON AU BPA ET SES DERIVES CHLORES. 148

FIGURE 67 : NOMBRE D'INVADOPODES FORMES PAR CELLULE U251 MOCK ET PAR CELLULE U251 SHRNA EN PRESENCE DE MILIEUX CONDITIONNES D'ASTROCYTES PROVENANT DE SOURICEAUX EXPOSES OU NON AU BPA ET SES DERIVES CHLORES 150

Table des tableaux

TABLEAU 1 : CONCENTRATION DE BPA DANS L'ENVIRONNEMENT ET DANS LES FLUIDES ET TISSUES HUMAINES (MICHALOWICZ, 2014; PJANIC, 2017) 35

TABLEAU 2 : EFFETS DE BPA CHEZ L'ANIMAL ET CHEZ L'HOMME (ANSES, 2011) 38

TABLEAU 3: NOMENCLATURE DES CONNEXINES ET DISTRIBUTION TISSULAIRE CHEZ L'ETRE HUMAIN ET LA SOURIS (OYAMADA ET AL., 2005). 75

TABLEAU 4: FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DES CONNEXINES (D'APRES (KAR ET AL., 2012)). 87

TABLEAU 5: REPRESENTATION DE LA CONCENTRATION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS PREPARES AVEC L'HUILE POUR LES EXPOSITIONS DES SOURIS. 100

Préambule

De nombreuses pathologies humaines, dites chroniques, sont la conséquence d'expositions prolongées à des substances présentes dans l'environnement. Parmi ces pathologies, les cancers représentent un fléau mondial dont une partie de l'augmentation de l'incidence semble être la conséquence d'expositions à des polluants environnementaux. Si les pesticides constituent une part croissante de ces pollutions à risque, dénoncés régulièrement dans les médias, la présence persistante de perturbateurs endocriniens dans l'environnement depuis des décennies a des répercussions encore mal connues sur la santé des populations exposées. Cette répercussion est encore moins comprise lorsqu'on sait que le perturbateur endocrinien le plus répandu, le bisphénol A (BPA), interdit récemment en France, peut être transformé en dérivés chlorés aux effets sanitaires inconnus. Sachant que le BPA, en plus d'être perturbateur endocrinien, est un cancérigène potentiel, il est important d'identifier les effets cellulaires de ces dérivés chlorés et de leurs conséquences sur la santé humaine. Une cible cellulaire souvent altérée par l'exposition à des polluants est celle de la communication intercellulaire par les jonctions gap (CIJG), garante de l'homéostasie tissulaire, dont tout dysfonctionnement peut mener au développement tumoral. Cette cible est d'autant plus importante à considérer que les constituants des jonctions gap, les connexines, sont connues pour être impliquées dans le contrôle de l'invasion de tumeurs dont les gliomes sont les représentants les plus invasifs.

Dans un tel contexte, un aspect intéressant à considérer est celui de l'impact des expositions chroniques à des perturbateurs endocriniens (BPA et ses dérivés chlorés) sur le microenvironnement tumoral (astrocytes dans le cas des gliomes) et de ses conséquences possibles sur le comportement des cellules cancéreuses (migration et invasion) en agissant sur la Cx43, impliquée dans la formation des invadopodes. En effet, si l'impact direct de polluants sur des cibles cellulaires a été largement étudié, celui sur le microenvironnement des cellules tumorales et de ses conséquences potentielles sur leur comportement demeure encore très largement inexploré.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Maladies chroniques

Les maladies chroniques sont des affections de longue durée qui évoluent lentement et impactent la vie des patients ainsi que leur entourage **("Les maladies chroniques," n.d.)**. Il en existe différents types tels que les maladies non transmissibles, les maladies transmissibles, les maladies rares ou orphelines, ou encore, les maladies psychiques de longue durée. Cette classification des maladies chroniques permet de préciser les enjeux de santé publique et de définir des priorités d'action menées par l'OMS. Par leur caractère durable et évolutif, ces pathologies engendrent des incapacités physiques et des difficultés d'ordre personnel, familial ou socioprofessionnel importantes **(Lecordier, 2016)**.

1.1 Épidémiologie

Les maladies chroniques sont un véritable fléau de santé publique, responsables de plus de 71% de la mortalité dans le monde. Et parmi elles, les maladies dites non transmissibles (MNT) sont la cause du plus grand nombre de décès (41 millions, en 2018) dont 37% étaient prématurés (patients entre 30 et 69 ans) **("Maladies non transmissibles," n.d.)**. Les principales MNT sont les maladies cardiovasculaires, les cancers, les affections respiratoires et le diabète qui sont responsables de 65% des décès en France (Figure 1) **("OMS | Maladies chroniques," n.d.)**.

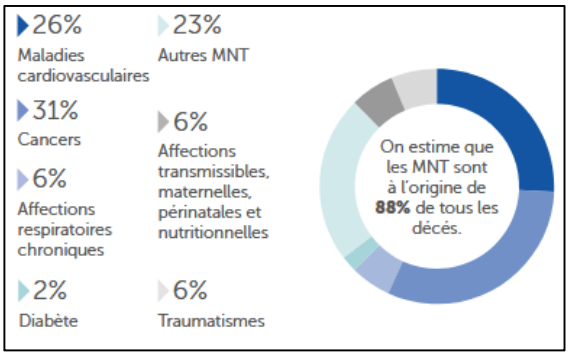


Figure 1 : Pourcentage des causes de mortalité en France par maladies chroniques, tous âges et sexes confondus *(OMS, 2016).*

Auparavant, considérées comme affectant principalement les populations riches et âgées, les MNT sont actuellement connues pour affecter les personnes quels que soient leur âge et leur

catégorie socio-professionnelle **(Busse et al., 2010)**. Et le nombre des personnes atteintes ne cesse d'augmenter, non seulement du fait de l'accroissement démographique et de l'allongement de l'espérance de vie par les progrès de la médecine, mais aussi à cause d'expositions aux nombreux facteurs de risque qui en sont à l'origine.

Les causes de ces pathologies les plus courantes sont complexes. Elles semblent être multiples et interdépendantes comportant à la fois des composantes génétiques et environnementales, liées au mode de vie, aux facteurs socio-économiques, à la condition physique, etc… **("10 Santé et environnement - Définitions," n.d.)**.

1.2 Facteurs génétiques

Les dommages génétiques sont considérés comme étant un mécanisme important à l'origine des maladies chroniques, en particulier dans le contexte de la cancérogenèse et de la tératogenèse. De fait, certaines études indiquent que l'environnement joue ainsi un rôle majeur dans la survenue des cancers par exposition à des facteurs capables d'altérer l'ADN alors que la part d'hérédité, par transmission de gènes de prédisposition, ne serait que minime et ne représenterait que 5 à 10% des cas **(Czene et al., 2002; Rezg et al., 2014)** .

Mais si certaines MNT peuvent effectivement être la conséquence de phénomènes génétiques, au début des années 2000, la compréhension de l'étiologie de certaines d'entre elles suggérait que des expositions à des environnements toxiques pouvaient avoir des effets transgénérationnels sans composante génétique évidente ni infectieuse **(Lecordier, 2016)**.

1.3 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux tels que le mode de vie, l'activité professionnelle, les traitements médicamenteux, l'alimentation peuvent agir directement sur la santé humaine. Ainsi, selon l'OMS, l'environnement serait impliqué dans plus de 80% des principales maladies, et environ 24% des pathologies sont causés par des expositions environnementales qui pourraient être évitées.

L'évaluation précise de ces expositions environnementales reste un défi, en particulier dans le domaine de l'épidémiologie du cancer **(Wild, 2005)**. Une telle évaluation est, en effet, compliquée par le fait que les voies d'expositions sont multiples et concernent généralement de faibles doses dont les effets ne sont ressentis qu'après de longs temps de latence. De plus, les réactions à ces expositions sont très variables du fait des sensibilités individuelles aux divers polluants et autres risques environnementaux.

Face à un tel défi, il est nécessaire de mettre en place des approches susceptibles d'évaluer plus précisément les expositions environnementales auxquelles l'être humain est confronté.

1.4 Exposome

C'est dans le but de répondre à la nécessité d'évaluer précisément les expositions environnementales que la notion d'exposome a été définie. Celle-ci vise à estimer la totalité des expositions environnementales accumulées au cours de la vie et ce, dès la période prénatale **(Wild, 2005)**. Cette notion a ensuite été revue comme étant une estimation cumulative, non seulement des influences environnementales sur l'organisme, mais aussi des réponses biologiques qui y sont associées, et ce, durant toute l'existence **(Miller and Jones, 2014)**.

Contrairement au génome, fixé dès la conception, l'exposome ne cesse de varier tout au long de l'existence en raison de changements du niveau de vie ou des conditions climatiques (**« sources externes générales »**) ou encore, de la variété des expositions à des agents potentiellement toxiques qu'ils soient physiques ou chimiques (**« sources externes spécifiques »**). De plus, l'exposome peut aussi varier par des fluctuations de **« sources internes »**, comme, par exemple, la sécrétion et la régulation d'hormones endogènes influencées par le métabolisme et le stress oxydatif, l'activité physique, la morphologie corporelle, le microbiote intestinal et le vieillissement (Figure 2) **(Wild, 2012)**.

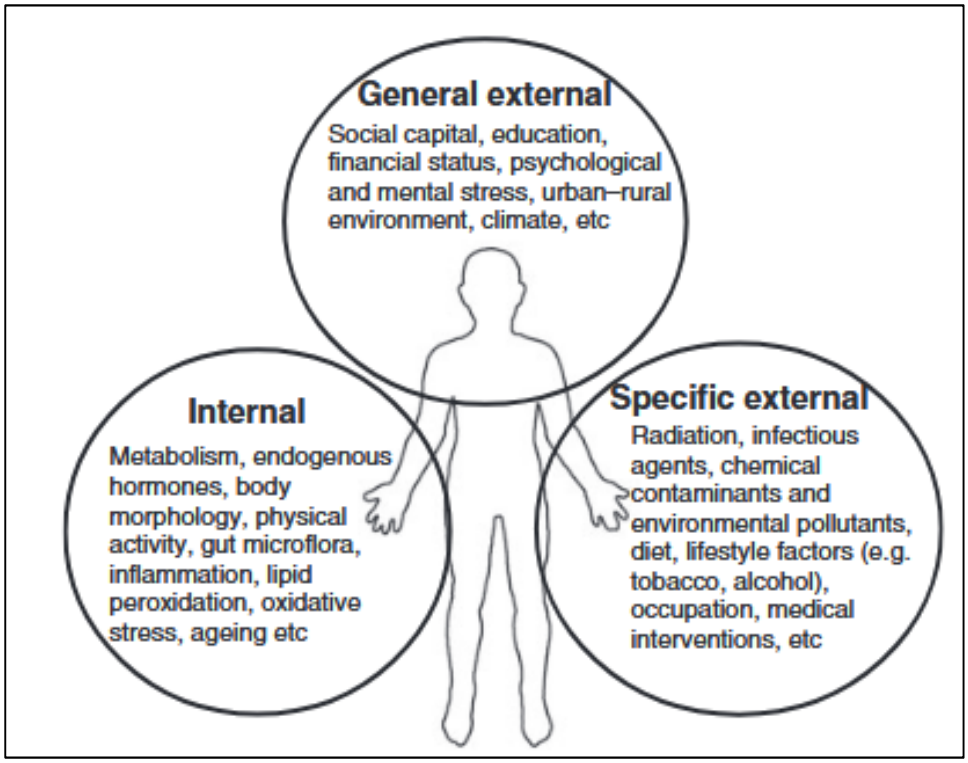


Figure 2: La complexité de l'exposome. *Trois sources différentes de l'exposome sont présentées sous forme de listes non exhaustives d'expositions (ou de conditions d'expositions) pour chacune d'entre elles* ***(Wild, 2012)***.

Il s'avère ainsi qu'il existe plusieurs types d'expositions, toutes fluctuantes, auxquelles un individu est exposé selon son âge et selon l'endroit où il vit (Figure 3) **(Athersuch, 2012)**.

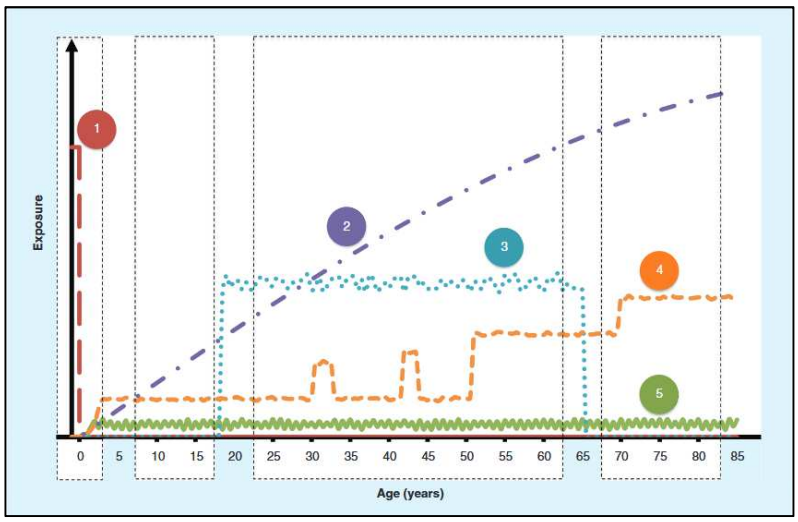


Figure 3: Variation temporelle des différentes expositions au cour de la vie. *1. In-utero ; 2. Exposition environnementale accumulée ; 3. Exposition professionnelle ; 4. Exposition aux médicaments ; 5. Expositions saisonnières* ***(Athersuch, 2012)***.

Compte tenu de cette variabilité, l'estimation de l'exposome nécessite un échantillonnage « longitudinal » des expositions, au cours du temps, particulièrement durant les stades critiques de l'existence tels que le développement fœtal, la petite enfance, la puberté et les années de fécondité **(Rappaport, 2011)**.

L'environnement joue un rôle important sur le déclenchement, le développement, et l'aggravation de nombreuses maladies. Cependant, il reste très difficile de déterminer avec certitude quel est l'effet d'un polluant particulier présent dans l'air, l'eau ou le sol sur l'émergence d'une quelconque maladie.

Mais depuis plusieurs décennies, certaines expositions d'origine chimique, telles que celles aux perturbateurs endocriniens, s'avèrent être particulièrement impliquées dans la survenue de pathologies chroniques.

2. Les perturbateurs endocriniens : le cas du Bisphénol A

2.1 Définition

C'est en 1991 que le concept des « perturbateurs endocriniens » (PE) a été évoqué pour la première fois au cours de la conférence de Wingspread (Wisconsin, USA). Lors de cette conférence, des scientifiques de diverses disciplines présentaient leurs données au sujet de l'état écologique des grands lacs américano-canadiens. A la lumière de leurs observations, le but de cette conférence était d'évaluer l'ampleur de la pollution du site et d'en estimer les conséquences sur l'environnement et les espèces animales présentes.

C'est au terme de cette conférence que les scientifiques présents ont déclaré que « de nombreux produits chimiques de synthèse libérés dans la nature, ainsi que quelques composés naturels, sont capables de dérégler le système endocrinien des animaux et de l'être humain. Ces composés comprennent certains pesticides et produits chimiques, ainsi que d'autres produits synthétiques et certains métaux ». En outre, ils ont affirmé que « de nombreuses populations d'animaux sauvages sont d'ores et déjà affectées par ces composés ». Ils concluaient en affirmant que ces composés agiraient en mimant l'action

d'hormones naturelles et seraient ainsi susceptibles de perturber le développement de l'organisme **("Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution," n.d.)**.

Depuis cette conférence, les critères pour définir les PE ont évolué **(Multigner and Kadhel, 2008)**. Ainsi, selon la définition admise lors du colloque de Weybridge (Royaume-Uni), en 1996, un PE « est une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur celui-ci ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale ». Cette définition a été ensuite reprécisée par l'agence américaine de protection de l'environnement (Environnemental Protection Agency EPA), selon laquelle, le PE est « un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action, ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme ». Mais, c'est finalement la définition proposée par l'OMS, en 2002, qui est actuellement la plus largement acceptée. Elle définit les PE comme étant « des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle, étrangères à l'organisme, capables d'interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et d'induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants ».

2.2 Sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens et effets physiologiques

Les principaux PE, confirmés ou potentiels, appartiennent à de nombreuses familles chimiques (Bisphénols, Phtalates, Alkiphénols, Polychlorobiphényles, Parabènes, Dioxines, Polybromés, Perfluorés) et certains sont utilisés en tant que pesticides ou présents dans de nombreux secteurs d'activité (industriel, domestique, pharmaceutique, cosmétique, phytosanitaires). Par leur utilisation intensive, de nombreux PE ont contaminé l'eau et l'alimentation, mais aussi l'air auxquels sont exposées les populations **(Multigner and Kadhel, 2008; "Perturbateurs endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel - Article de revue - INRS," n.d.).** Ces contaminations à grande échelle, et les expositions qui en découlent, ont fait naître de nombreuses interrogations quant à leurs effets possibles sur la santé humaine et notamment sur le fonctionnement du système endocrinien.

Celui-ci est un système complexe constitué par un réseau de glandes dispersées dans l'organisme (Figure 4) dont les principales sont l'hypothalamus, l'hypophyse, la thyroïde, les parathyroïdes, le thymus, le pancréas, les surrénales, les ovaires ou les testicules. Et les hormones qu'elles sécrètent ont des rôles divers et essentiels de maintien et de contrôle de processus fondamentaux tels que l'homéostasie, le métabolisme, la reproduction, le développement et la croissance de l'organisme **(Diamanti-Kandarakis et al., 2009)**.

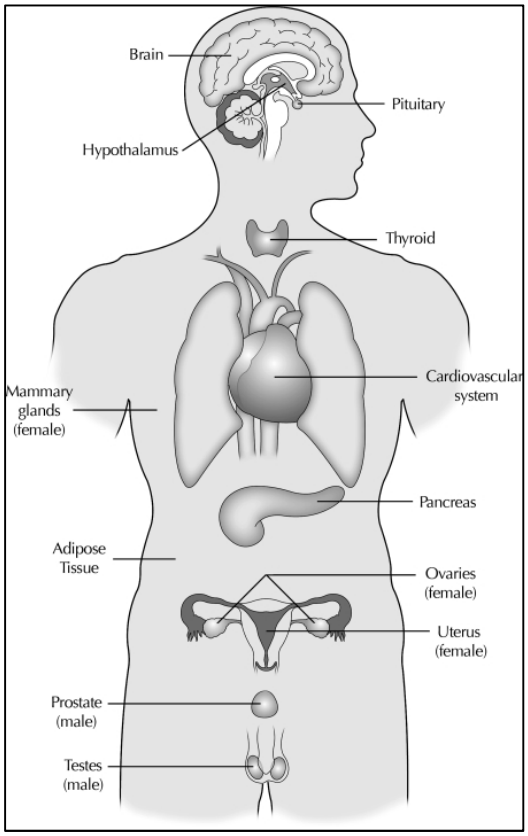


Figure 4: Glandes endocrines ciblées par les PE. *Cette figure montre que tous les systèmes physiologiques sensibles aux hormones sont vulnérables aux PE, y compris le cerveau : l'hypothalamus et l'hypophyse, la thyroïde, le système cardiovasculaire, les glandes mammaires, les tissus adipeux, le pancréas, ovaire et utérus chez la femme, et testicules et prostate chez l'homme.* ***(Diamanti-Kandarakis et al, 2009)***.

Les PE interfèrent avec les hormones de l'organisme soit en modifiant leur production, soit en les empêchant d'agir ou en imitant leur action. Si cette interférence peut entraîner des conséquences sur la santé de l'individu exposé et sur sa descendance (Figure 5), il est important de considérer que les PE ne sont pas toxiques en tant que tels, mais que c'est leur mécanisme d'action qui est susceptible d'être nocif pour l'organisme **("Perturbateurs**

endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel - Article de revue - INRS," n.d.).

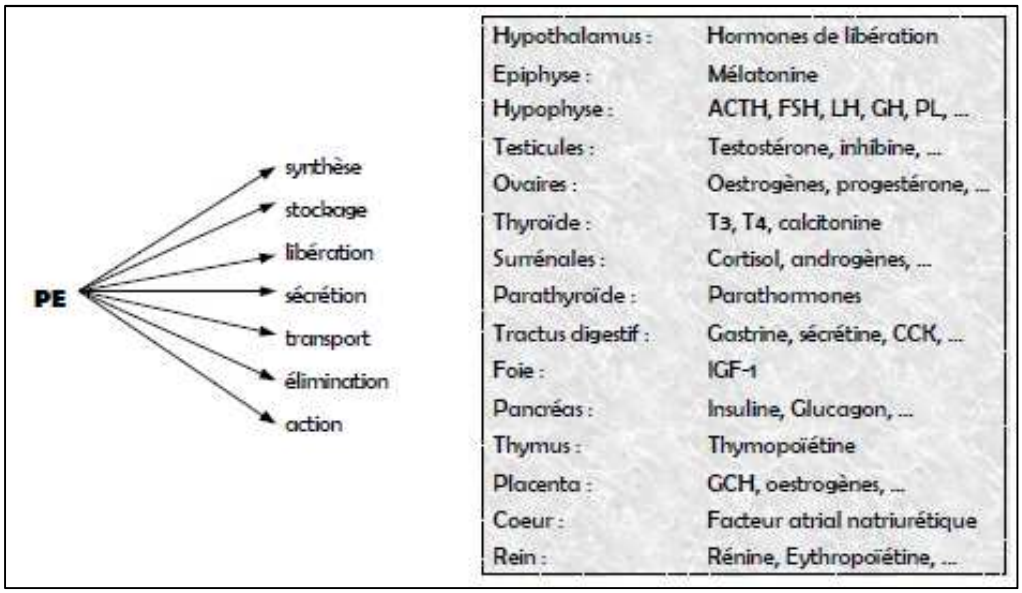


Figure 5: Les cibles et les mécanismes d'action des PE sur le système endocrinien ("Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution," n.d.).

A ce titre, des études réalisées sur des modèles animaux sont particulièrement évocatrices en montrant que les PE sont capables de provoquer des dysfonctionnements thyroïdiens, une diminution de la fertilité, des déficits immunitaires, des anomalies du métabolisme et du comportement, une féminisation des mâles et une masculinisation des femelles. En conséquence, les PE sont soupçonnés d'être à l'origine de nombreuses pathologies ou dysfonctionnements tels que les infertilités dues à l'altération du fonctionnement du système reproducteur, les anomalies de développement, les cancers hormonaux –dépendants, les troubles métaboliques à l'origine du diabète et de l'obésité **("Perturbateurs endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel - Article de revue - INRS," n.d.)**.

Initialement, on pensait que les PE exercent leurs actions en interagissant avec les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes, et plus généralement, liposolubles (Figure 6). Ces récepteurs sont variés et comprennent ceux aux œstrogènes, aux androgènes, à la progestérone, aux hormones thyroïdiennes et aux rétinoïdes. Aujourd'hui, les recherches effectuées montrent que les mécanismes d'action des PE sont beaucoup plus larges que ceux

exercés par la simple activation de ces récepteurs, car ils peuvent s'étendre aux coactivateurs transcriptionnels, aux voies enzymatiques impliquées dans la biosynthèse et /ou le métabolisme des stéroïdes et à de nombreux autres mécanismes qui impliqueraient les systèmes endocriniens en général et les organes reproducteurs en particulier (**Diamanti-Kandarakis et al., 2009**).

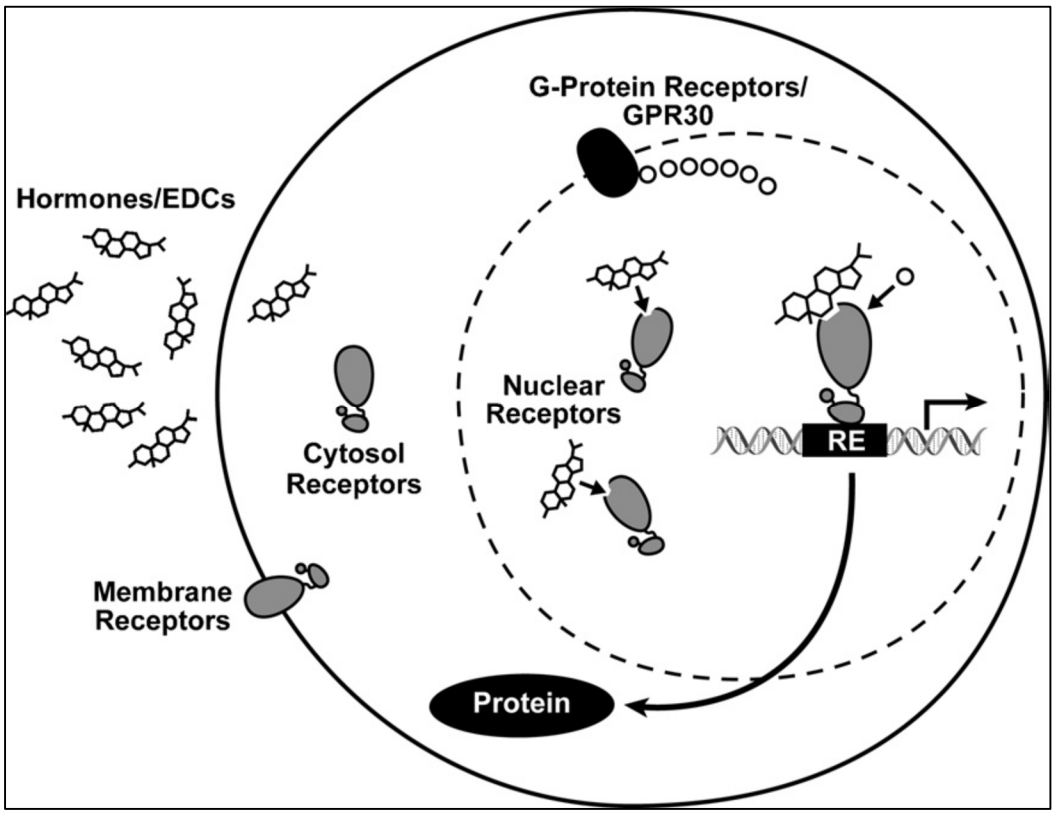


Figure 6: Exemple de voies de signalisation de récepteurs d'hormones stéroïdiennes. *Les hormones ou les agonistes/antagonistes hormonaux se lient à des récepteurs membranaires, cytosoliques ou nucléaires capables de réguler la transcription de gènes et finalement la production de protéines. Les PE peuvent altérer ce processus de signalisation en se liant aux récepteurs des stéroïdes ou, plus généralement, d'hormones liposolubles, et activer ou inhiber la réponse transcriptionnelle. EDCs (Endocrine Disrupting chimicals), RE (Response Element)* ***(Schug et al., 2011)***.

Une autre action possible des PE serait leur impact épigénétique. En effet, des altérations épigénétiques (par exemple, par méthylation de l'ADN) peuvent être à l'origine de reprogrammation d'expressions géniques durant le stade précoce du développement et entraîner ainsi des changements phénotypiques plus ou moins tardifs, voire dans la descendance et induire des effets transgénérationnels **(Schug et al., 2011)**.

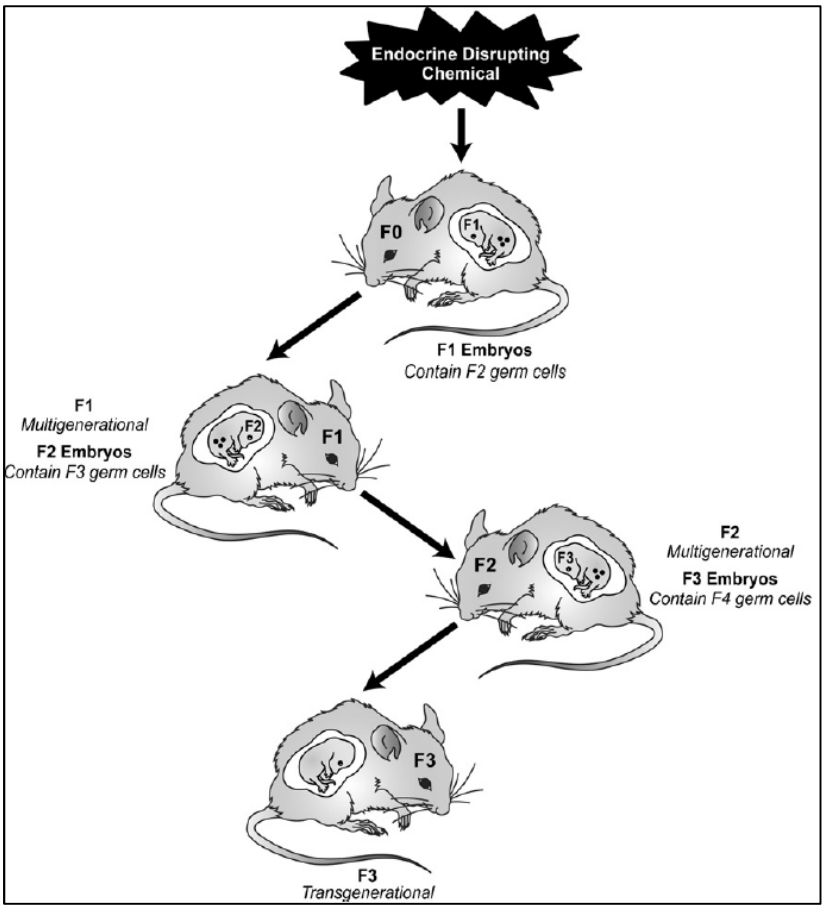


Figure 7: L'exposition aux PE peut induire des altérations épigénétiques à l'origine de pathologies chez l'individu exposé (F0) et dans sa descendance. *Chez des souris gravides, l'exposition aux PE peut entraîner des modifications épigénétiques au niveau du fœtus et de sa lignée germinale dont les effets seront ressentis au cours des prochaines générations (F1 et F2 ; effet multigénérationnel). L'effet sur les générations suivantes (F3 et au-delà) est considéré comme étant un phénotype transgénérationnel* ***(Schug et al., 2011)***.

Les modes d'action des PE tels que l'effet à faible dose, la relation dose-réponse, les effets cocktails, la fenêtre de vulnérabilité et les effets multigénérationnels étant aujourd'hui mal connus, il reste très difficile de mettre précisément en évidence les effets des PE sur l'organisme et le lien existant entre expositions et pathologies.

2.3 Les modes d'action : différents concepts

L'étude des PE est très importante pour préserver l'environnement et la santé des êtres vivants. Cependant, cette étude reste un défi majeur dû à la particularité et la complexité des mécanismes et des modes d'action des PE.

2.3.1 L'effet à faible dose et la relation dose-réponse

La faible dose est définie comme étant une dose inférieure à celle utilisée généralement en toxicologie. Illustrée par la célèbre phrase de Paracelse « la dose fait le poison », la toxicité des substances chimiques est souvent évaluée selon une courbe dose-réponse monotone classique. Cependant, ce concept semble scientifiquement dépassé par le fait que dans certaines périodes du développement, et en particulier durant la période périnatale et l'adolescence, l'exposition à de très faibles doses de PE semble avoir des effets plus importants qu'à des doses élevées. La courbe de toxicité, en forme en « U », est alors non monotone **(Vandenberg et al., 2012)**.

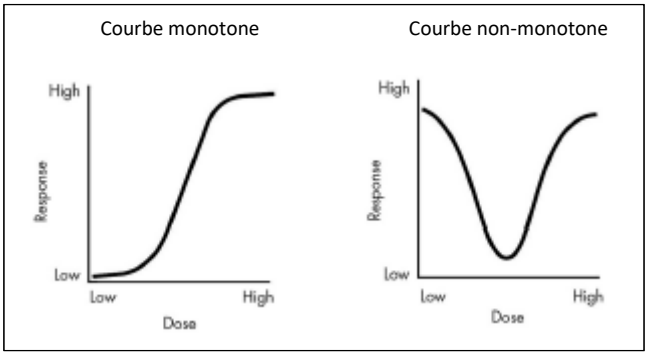


Figure 8 : Courbes dose-réponse monotone et non monotone *(Vandenberg et al., 2012)*.

L'effet à faible dose reste controversé par le fait qu'il est difficile de déterminer les concentrations internes (intra-organiques) des PE, les métabolites actifs et l'exposition quotidienne réelle aux PE. De plus, la durée et la voie d'exposition peuvent avoir une grande influence sur la façon dont le PE est métabolisé, et s'il reste biologiquement actif **(Schug et al., 2011)**.

2.3.2 La fenêtre de vulnérabilité

La fenêtre de vulnérabilité, ou de spécificité, correspond aux périodes durant lesquelles les tissus et organes de l'individu sont en développement, comme lors du stade embryonnaire, la petite enfance ou l'adolescence. Le concept, dit des « origines développementales de la santé

et de la maladie de l'adulte » (Developmental Origins of Health and Disease ; DOHaD), postule que des influences défavorables survenues au début du développement, en particulier pendant la vie intra-utérine, peuvent être à l'origine d'effets néfastes sur la santé de l'adulte. Le concept de DOHaD initialement axé sur les effets d'une mauvaise nutrition *in utero* s'est étendu à d'autres facteurs non nutritionnels qui se sont avérés capables de modifier la physiologie de l'organisme. L'effet des PE observé chez l'adulte dépendrait alors de l'âge et de l'état de santé de l'individu lors de l'exposition **(Schug et al., 2011; Vaiserman, 2014)**.

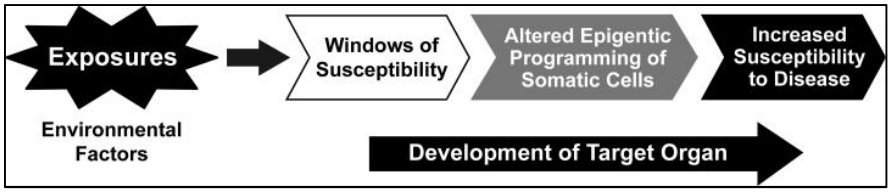


Figure 9 : Illustration des expositions précoces entrainant des modifications fonctionnelles à l'origine de pathologies chez l'adulte *(Schug et al., 2011)*.

2.3.3 Les effets cocktails

L'Homme est exposé quotidiennement à de nombreuses substances exogènes comme les polluants environnementaux et des composants alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Tous ces composés, pris individuellement, sont susceptibles d'avoir des effets néfastes pour la santé humaine et leur combinaison peut accentuer leurs effets nocifs respectifs (effet cocktail) **(Delfosse et al., 2015)**. De tels mélanges de composés peuvent avoir des effets selon cinq modes d'action qui sont soit additifs, synergiques, de potentialisation, antagonistes ou d'indépendance. La toxicité de ces mélanges peut être prédite par la similarité des composés en présence en ce qui concerne leur structure chimique, leur mode d'action et les effets générés **(Lapierre, n.d.)**.

Les effets de tels mélanges, ou effets cocktail, ont été mis en évidence par une étude *in vitro* utilisant un œstrogène pharmaceutique (éthinylestradiol) et un pesticide organochloré (trans-nonachlor). Utilisés séparément, ces composés ne présentaient qu'une faible activité alors que leur utilisation simultanée, sous forme de mélange, entraînait une activation synergique par liaison coopérative au récepteur du prégnane X. L'analyse des résultats a montré que chaque composé augmente l'affinité de liaison de l'autre composé et permettait ainsi au

mélange d'induire un effet nocif à des doses auxquelles chaque substance isolée est inactive **(Delfosse et al., 2015)**.

2.3.4 L'effet multigénérationnel

L'exposition aux PE, durant la période de vulnérabilité (évoquée ci-dessus), montre que les effets de ces substances peuvent être multigénérationnels (1ère génération et 2ème génération) voire, transgénérationnel (3ème génération, etc…).

Un exemple illustrant de tels effets multigénérationnels est celui du Distilbène (diéthylstilbestrol, DES) qui avait été administré à des femmes enceintes. Il est apparu que ces traitements avaient entraîné des stérilités et des cancers de l'appareil reproducteur chez leurs filles et, des malformations congénitales (hypospadias/cryptorchidies) et des anomalies du spermogramme chez leurs fils **("Perturbateurs endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel - Article de revue - INRS," n.d.)**

2.4 Bisphénol A : BPA

2.4.1 Historique et utilisation du BPA

Considéré comme PE, le bisphénol A (BPA) a été synthétisé pour la première fois par un chimiste russe, Alexandre Dianin en 1891, en associant une molécule d'acétone à deux molécules de phénols. Ce composé a été ensuite étudié en vue d'une éventuelle commercialisation, dans les années 1930, en tant qu'œstrogène de synthèse **(Rubin, 2011)**.

Le BPA, capable de se fixer aux récepteurs alpha et bêta des œstrogènes, présente effectivement une activité œstrogène mimétique. Cependant, cette activité étant inférieure à celle du diéthylstilbestrol (DES), l'utilisation du BPA comme œstrogène de synthèse a été abandonnée en faveur du DES (Figure 10). Ce dernier a été alors administré, dans les années 1940 à 1970, aux femmes enceintes afin de prévenir les fausses couches et les naissances prématurées **(Erler and Novak, 2010; Michałowicz, 2014; Rubin, 2011)**.

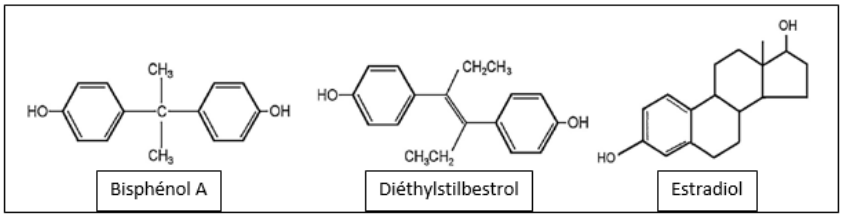


Figure 10: Structure chimique du Bisphénol A (BPA), du Diéthylstilbestrol (DES) et de l'Estradiol. *Noter la similitude des structures chimiques du BPA et du DES* ***(Rubin, 2011)***.

A partir des années 1950, le BPA est utilisé pour la synthèse de polycarbonates et de résines époxydes, mais également, pour l'impression des papiers thermosensibles **(Alonso-Magdalena et al., 2012)**. Les résines époxydes ont été largement utilisées pour les revêtements des boîtes de conserve, de pièces automobiles et aérospatiales et des tuyaux en PVC. Quant aux polycarbonates, ils ont été utilisés dans la fabrication de produits manufacturés d'une grande diversité (CDs, automobiles, appareils ménagers, emballages alimentaires, bouteilles en plastique, etc…) du fait de leur dureté, transparence et résistance aux fortes températures ainsi qu'à de nombreux acides et huiles **(Kang et al., 2006)**. En conséquence, l'utilisation du BPA est devenue rapidement omniprésente dans de nombreux secteurs industriels (Figure 11).

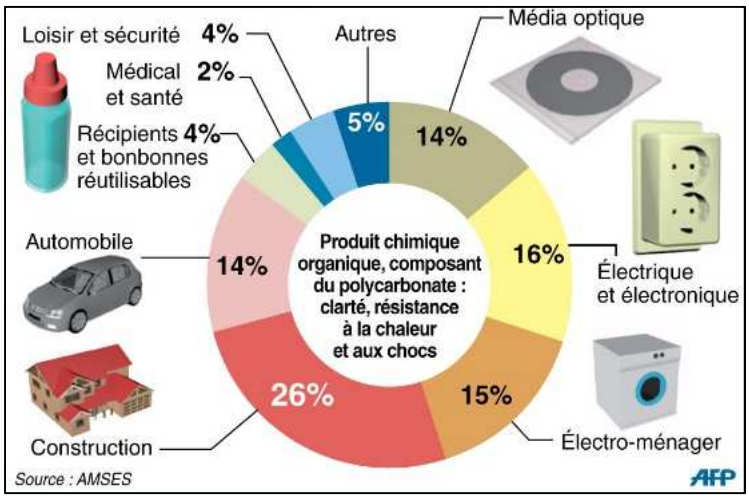


Figure 11 : Les diverses utilisations du BPA et de ses dérivés dans le domaine industriel ***("Bisphénol A," n.d.)*.**

Le Bisphénol A (BPA) est ainsi devenue une des substances chimiques synthétiques les plus produites et utilisées avec une production annuelle excédant 3,8 millions de tonnes **(Michałowicz, 2014)**.

2.4.2 Propriétés physico-chimiques du BPA

Le BPA (4,4-isopropylidènediphénol; 2,2-bis (4-hydroxyphényl) propane) est un composé chimique solide, de couleur blanche, d'un poids moléculaire de 228,29 g, dont les points de fusion et d'ébullition sont de 156°C et de 220°C, respectivement. Très liposoluble, il présente une forte réactivité chimique grâce à la présence de groupes hydroxyles (Figure 10). De plus, il peut subir une substitution électrophile et, comme les autres phénols, peut être converti en éthers, esters et sels **(Michałowicz, 2014)**.

2.4.3 Sources d'exposition et exposition interne au BPA

Du fait de son usage multiple et de sa présence ubiquitaire dans les produits de consommation, la population humaine a été largement exposée au BPA pendant plusieurs décennies. Cette exposition revêt différentes formes. Il peut s'agir soit d'une exposition environnementale directe par contact ou indirecte par inhalation pendant sa production ou son traitement. En effet, le processus de dégradation des polymères et des résines époxydes par hydrolyse des liaisons éthers entraînant la libération de monomères de BPA, il peut s'agir aussi d'une exposition due à la contamination d'aliments par l'emballage utilisé **(Kamrin, 2004)**.

L'environnement et les produits de consommation non alimentaires restent des sources négligeables d'exposition au BPA. La principale source d'exposition est réalisée par voie alimentaire due à la diffusion de BPA, présent dans les contenants en polycarbonates et en résines époxydes, vers les aliments. Les aliments et l'eau peuvent aussi être contaminés par des monomères de BPA à la suite de la cuisson ou de conditions de pH durant leur stockage **(Nappi et al., 2016)**.

Cette exposition des aliments (ou autres) se traduit ensuite par la présence de BPA dans l'organisme humain, localisé dans différents fluides biologiques (sérum, urines, sang) ou tissus humains (tissus adipeux, tissu placentaire) mais à des concentrations variables (Tableau 1).

Tableau 1 : Concentration du BPA dans l'environnement et dans les fluides et tissus humains *(Michałowicz, 2014; Pjanic, 2017).*

BPA	Concentration	références
Atmosphère		
Région polaire	1–17 pg/m^3	Fu et Kawamura (2010)
Zones côtières	1–32 pg/m^3	Fu et Kawamura (2010)
Bavière, Allemagne	5–15 pg/m^3	Berkner et al. (2004)
Osaka, Japon	10–1920 pg/m^3	Matsumoto et al. (2005)
Zones urbaines (États-Unis, Nouvelle-Zélande, Chine)	20–17,400 pg/m^3	Fu et Kawamura (2010)
Eau et effluents		
Eau de rivière (Portugal)	28,7–98,4 µg/dm^3	Rocha et al. (2013)
(Elba, Allemagne)	4–92 µg/dm^3	Stachel et al. (2003)
(Taïwan)	0,01–44,63 µg/dm^3	Lee et al. (2013a)
Eaux souterraines - contaminées (Osaka, Japon)	740 µg/dm^3	Kawagoshi et al. (2003)
Lixiviat brut (Allemagne de l'Ouest)	3,61 mg/dm3	Coors et al. (2003)
Lixiviat des décharges (Osaka, Japon)	0–17,2 mg/dm^3	Yamamoto et al. (2001)
Boues d'épuration brutes (Canada)	36,7 mg/kg	Lee and Peart (2000)
Poussière		
Maison (USA)	0,2–17,6 mg/kg	Rudel et al. (2003)
Maison (Est des Etats-Unis)	0,5–10,2 mg/kg	Loganathan et Kannan (2011)
Bureau (Belgique)	4,69–8,38 mg/kg	Geens et al. (2009)
Eau de consommation		
Eau du robinet (Europe, Asie, Amérique du Nord)	0,099–0,317 µg/dm^3	Arnold et al. (2013)
Eau en bouteille (France)	0,07–4,21 µg/dm^3	Colin et al. (2013)
Aliments		
Céréales	1–3,8 µg/kg	Niu et al. (2012)
Viande	0,49–56 µg/kg	Shao et al. (2007)
Poisson	7,1–102,7 µg/kg	Munguıa-Lopez et al. (2005)
Légumes et fruits	11–95,3 µg/kg	Yoshida et al. (2001)
Fruits de mer en conserve	1–99,9 µg/kg	Cunha et al. (2012)
Fruits et légumes en conserve	3,7–265,6 µg/kg	Cunha and Fernandes (2013)
Boissons gazeuses en conserve	0,032–4 µg/kg	Cao et al. (2009)
Lait	1,32–176 µg/kg	O'Mahony et al. (2013)
Fluides corporels		
Urines (Norvège, femmes enceintes)	4,50 µg/dm^3	Ye et al. (2009)
(Belgique, adultes)	2,55 µg/dm^3	Pirard et al. (2012)
(Allemagne, adultes)	1,49 µg/dm^3	Koch et al. (2012)
(USA, adultes)	2,50 µg/dm^3	Calafat et al. (2008)
(Danemark, enfants et adolescents)	1,49 µg/dm^3	Frederiksen et al. (2013)
(USA, enfants)	4,50 µg/dm^3	Calafat et al. (2008)
(USA, prématurés avec des soins médicaux intenses)	30,0 µg/dm^3	Calafat et al. (2009)
Transpiration	10–82 µg/dm^3	Genuis et al. (2012)
Lait maternel	7,3 ng/ml	Ye et al., 2006
Colostrum	3,4 ng/ml	Kuruto-Niwa et al., 2007
Liquide amniotique	8,3 ng/ml	Ikezuki et al., 2002
Sérum	0,32 et 4,4 ng/ml	Vandenberg et al., 2007
Tissus		
Placenta	11,2 ng/ml	Schönfelder et al., 2002
Cordon ombilical	4,4 ng/ml	Todaka et Mori, 2002
Tissu adipeux (adultes)	3,19 µg/kg	Fernandez et al. (2007)
Foie (adultes)	1,48 µg/kg	Geens et al. (2012)
Cerveau (adultes)	0,91 µg/kg	Geens et al. (2012)

2.4.4 Métabolisme du BPA chez les Mammifères

Une fois ingéré, le BPA peut être métabolisé aux niveaux hépatique et intestinal *via* deux voies, à savoir la glucuronidation (BPA-glucuronide, forme majoritaire) et la sulfatation (BPA sulfo-conjugué, forme rare) **(Jalal et al., 2017)**.

Des études sur les rats ont montré que le BPA est rapidement absorbé et converti en un certain nombre de métabolites dont, principalement, le BPA-glucuronide dans le foie. Après 2 à 3 jours, l'excrétion du BPA et de ses métabolites, surtout dans les fèces, est presque complète. Seule, une très petite fraction (<1%) est retenue dans les tissus et est susceptible d'être transférée à la progéniture à travers le placenta et par le lait maternel. Cependant, si cette transmission a pu être révélée chez les rongeurs, aucune accumulation de BPA n'a pu être démontrée dans le fœtus **(Kamrin, 2004)**.

Une étude réalisée auprès de volontaires montre que la majorité du BPA subit une glucuronidation dans le foie puisqu'il représente environ 90% de la forme circulante, avec une demi-vie inférieure à 6h. Le BPA métabolisé est éliminé plus rapidement et principalement par voie urinaire. De plus, le BPA-glucuronide ne présente aucune activité œstrogénique et correspond au métabolite de détoxification de l'organisme **(Völkel et al., 2002)**. Seule, une très petite fraction de la forme inchangée de BPA se réparti dans les différents tissus et peut potentiellement agir sur différentes cibles de l'organisme.

2.4.5 Les mécanismes d'action du BPA

La molécule de BPA avec sa structure phénolique possède un mode de liaison aux récepteurs œstrogéniques, Erα et Erβ, similaire à l'estradiol, mais avec une affinité 1 000 à 10 000 fois inférieure. Mais le BPA n'est pas un simple « imitateur » d'œstrogène. En effet des études ont montré que le recrutement des co-facteurs transcriptionnels était diffèrent selon qu'il s'agisse du BPA ou de l'œstradiol **(Rubin, 2011; Vandenberg et al., 2009)**.

Le BPA est considéré comme un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes (SERM) en agissant comme un agoniste dans certaines conditions et comme un antagoniste des œstrogènes dans d'autres cas **(Wetherill et al., 2007)**. De plus, des études suggèrent que le BPA n'agirait pas que sur un seul type de récepteur, mais se lierait aussi à des récepteurs

membranaires d'ERα et Erβ, récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPR30) **(Seachrist et al., 2016)**. Le BPA peut aussi se lier sur le récepteur de l'hormone thyroïdienne (T3) en agissant comme un antagoniste et supprimer l'activité transcriptionnelle qui est normalement stimulée et ce, d'une manière dose dépendante **(Moriyama et al., 2002)**. Il a également été montré que le BPA se lie aux récepteurs nucléaires des androgènes en tant qu'antagoniste **(Lee et al., 2003)** et aussi au récepteur d'œstrogènes gamma (ERR gamma) avec une affinité de l'ordre de 5nM. Ce dernier est très présent dans le cerveau et le placenta des Mammifères qui sont des sites où les conséquences de l'exposition sont potentiellement importantes pour les nouveau-nés **(Okada et al., 2008; Rubin, 2011)**.

En outre, le BPA peut activer d'autres récepteurs nucléaires tels que les récepteurs xénobiotiques (PXR) et les récepteurs des proliférateurs de péroxysomes **(Acconcia et al., 2015)**, et ainsi agir sur le métabolisme hormonal et sur les régulations génique et épigénétique d'expression de protéines **(Seachrist et al., 2016)**.

Perturbant ainsi le fonctionnement du système endocrinien et en affectant des processus aussi variés que la reproduction et le métabolisme, les conséquences physiologiques qu'entraine le BPA sur l'organisme sont multiples et peuvent se traduire par des effets œstrogéniques, hépatotoxiques, mutagènes et cancérigènes **(Michałowicz, 2014)**.

Cependant, même si ces effets ont été observés sur différents modèles expérimentaux, les preuves manquent quant à savoir si le BPA peut induire de tels effets sur l'être humain par exposition aux concentrations habituellement observées dans l'environnement.

2.4.6 Les effets du BPA

Un rapport d'expertise collective de l'ANSES sur les effets sanitaires du BPA a été publié en 2011. Dans ce rapport, chaque type d'effets est caractérisé et qualifié en termes d'effets avérés, suspectés, controversés et d'effets pour lesquels les données disponibles ne permettent pas de conclure **(Anses, 2011)** (Tableau 2).

Tableau 2 : Effets du BPA chez l'animal et chez l'Homme *(Anses, 2011)*.

Effets	Chez l'animal	Chez l'Homme
Système reproducteur mâle	**Effet avéré** : altération de la production spermatique à l'âge adulte **Effet suspecté** : diminution des concentrations plasmatiques de testostérone et modification du comportement sexuel dû à une exposition pendant la puberté	Effets observés controversés
Système reproducteur femelle	**Effets avérés :** augmentation de la survenue de kystes ovariens, apparition d'hyperplasie de l'endomètre, avancement de l'âge de la puberté suite à des expositions prénatales et postnatales et sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope après exposition *in-utero* et postnatale.	**Effets suspectés** : maturation ovocytaire chez la femme.
Cerveau et comportement	**Effets avérés** après exposition prénatale tels que : modifications du profil de neurodifférenciation, altérations des systèmes aminergique et glutamatergique, modifications de l'expression des récepteurs aux œstrogènes et nombre de neurones sensibles à l'ocytocine et la sérotonine. Expositions prénatale et poste natale : **Effets suspectés :** modification du comportement maternel et **Effets controversés** : anxiété, comportement exploratoire et dimorphisme sexuel comportemental.	Données insuffisantes
Métabolisme lipidique et glucidique et le système cardio-vasculaire	**Effets avérés** : augmentation de la lipidémie, tendance à la surcharge pondérale et activation de la lipogenèse après exposition prénatale et l'âge adulte. **Effets controversés** : métabolisme du glucose après exposition prénatale ou périnatale.	**Effets suspectés** : pathologies cardiovasculaires et diabète
Thyroïde	**Effets suspectés** : antagoniste des hormones thyroïdiennes suite à l'exposition néonatale	Données insuffisantes
Système immunitaire	**Effets avérés** : induction des lymphocytes T avec une surproduction des cytokines	Données insuffisantes
Intestin	**Effets suspectés** : diminution dose dépendante de la perméabilité intestinale après exposition à l'âge adulte et effets inflammatoires et pronociceptifs.	Aucune étude faite
Prostate	**Effets suspectés** : lésion prostatique de type néoplasique prostatique intraépithéliale. **Effets controversés** : poids de la prostate après exposition à l'âge adulte.	Aucune étude faite
Sein : cancérogénicité	**Effets avérés** : accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires après exposition prénatale et périnatale. **Effets suspectés** : développement de lésions de type néoplasique après exposition périnatale et augmentation de la susceptibilité des glandes mammaires à développer ultérieurement des tumeurs mammaires.	Données insuffisantes pour conclure sur la survenue du cancer sein

Deux ans plus tard, l'ANSES a publié un nouveau rapport en s'intéressant plus particulièrement à quatre types d'effets (cerveau et comportement, appareil reproducteur femelle, métabolisme et obésité, glande mammaire) pour lesquels les risques ont été supposés négligeables pour les trois premiers. Cependant, d'après ce rapport, l'exposition de la femme enceinte au BPA semblait susceptible d'augmenter le risque de cancer du sein chez l'enfant à naître en modifiant la structure de la glande mammaire **(Anses, 2013)**.

2.4.7 Données réglementaires sur l'utilisation du BPA

Du fait des risques sanitaires encourus, l'ANSES a recommandé la réduction des expositions au BPA en le remplaçant par d'autres composés, comme le Bisphénol S, dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaires. Et plus récemment, depuis le 1er janvier 2015, son utilisation est interdite dans la composition des contenants alimentaires (bouteilles, conserves, etc.) **(Anses, 2018)**.

Depuis mars 2018, le BPA a été classé selon l'UE en tant que CMR (Cancérigènes, Mutagènes et Reprotoxiques) de catégorie 1B « présumé toxique pour la reproduction ». Et, puisque même pour une faible dose de BPA des effets indésirables ont été observés, l'EPA a établi une dose de référence (50µg/kg/jour) minimale à partir de laquelle un effet indésirable est observé (Lowest Observed Adverse Effect Level ; LOAEL). La dose de référence est établie en divisant d'un facteur 1 000 la dose LOAEL, compte tenu du risque humain établi à partir d'études animales, la variabilité selon la population exposée et l'extrapolation pour les expositions subchroniques à chroniques **(Rubin, 2011; Vandenberg et al., 2009)**.

En 2004, suite à une réévaluation des risques sanitaires dus au BPA, l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) a fixé un nouveau règlement afin de limiter la contamination d'aliments par le BPA présent dans les emballages. La concentration de BPA qui était initialement établie à 3 mg/kg (directive n°90/128/CEE amendée) a été réduite à 0,6 mg/kg (directive n°2002/72/CE modifiée par la directive n°2004/19/CE). Puis, en 2014, l'EFSA a diminué la dose journalière d'exposition au BPA de 50µg/kg à une dose provisoire de 4µg/kg, inférieure à celle de l'exposition alimentaire au BPA **(Situation réglementaire du bisphénol A et des matériaux et objets contenant du bisphénol A dans l'Union Européenne et en France," 2013)**.

2.4.8 Dérivés chlorés du BPA

Le BPA est facilement chloré par l'hypochlorite de sodium, qui est utilisé comme agent de blanchiment dans les usines de papier ainsi que comme agent de désinfection dans les centres de traitements d'eaux usées. Par ces processus, des dérivés chlorés du BPA peuvent être produits et ensuite libérés dans les eaux usées. Les sous-produits de chloration du BPA potentiellement formés sont au nombre de quatre (mono- ; 2,2'di- ; 2,6 di- ; tri- et tétra-chlorés) (Figure 12) **(Fukazawa et al., 2001)**.

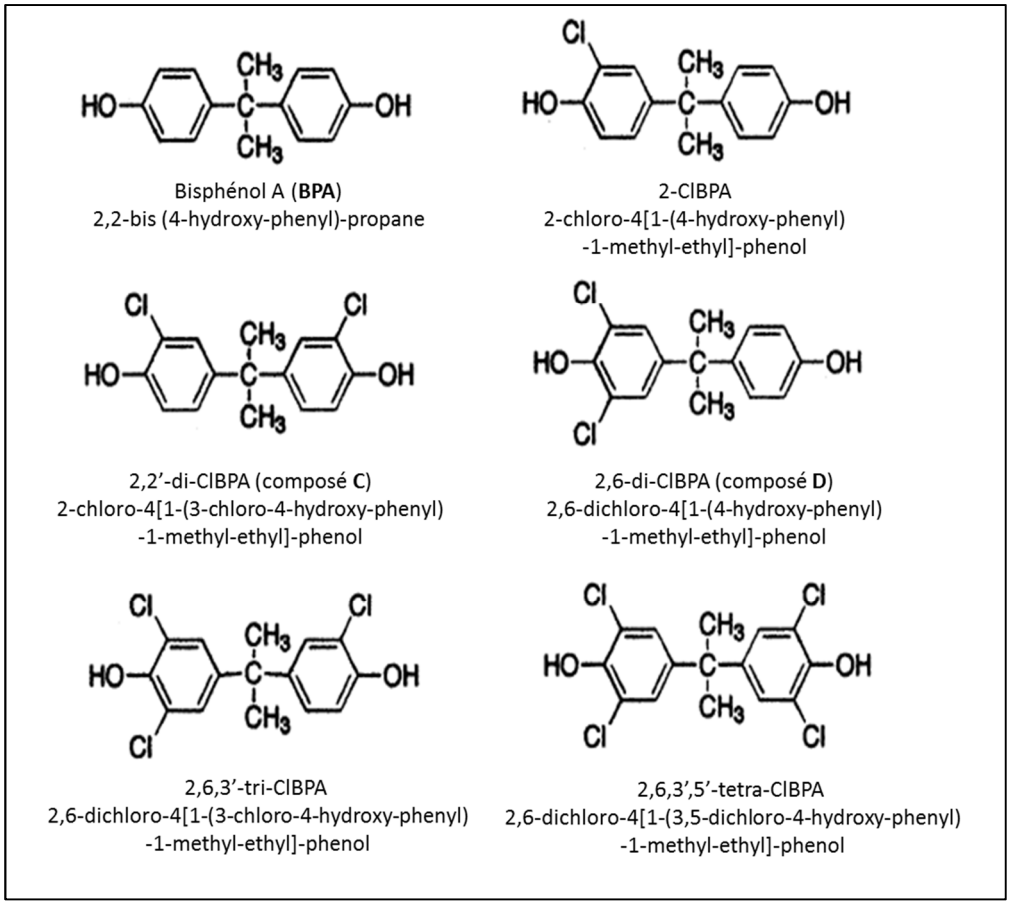


Figure 12 : Structure chimique du BPA et de ses dérivés chlorés *(Fukazawa et al., 2001)*.

Plusieurs études ont montré la présence de dérivés chlorés du BPA dans des échantillons humains tels que le tissu adipeux, les urines, le placenta, le colostrum et le lait **(Jiménez-Díaz et al., 2010; Liao and Kannan, 2012; Migeot et al., 2013)**. Ces dérivés chlorés présentent des affinités de liaisons plus fortes avec les récepteurs des œstrogènes, les récepteurs des

hormones thyroïdiennes, le récepteur activé par le péroxysome-prolifératéur (PPARγ) et le récepteur prégnane X (PXR) **(Riu et al., 2011; Takemura et al., 2005)**. Il se trouve que ces dérivés chlorés ont un effet PE 100 fois supérieur au BPA **(Bacle et al., 2016; Rouillon et al., 2015)**.

3. Généralités sur le cancer : le cas des gliomes

3.1 Définition

Le terme de « cancer » s'applique à un groupe de maladies chroniques pouvant affecter toute partie de l'organisme et dont la caractéristique principale est une prolifération excessive des cellules. Dans la grande majorité des cas, ces cellules cancéreuses forment chez l'adulte une masse, appelée tumeur maligne, dont certaines cellules ont la capacité d'infiltrer les tissus adjacents et de migrer, par les vaisseaux sanguins et lymphatiques, jusque dans des organes éloignés et y former des tumeurs secondaires (métastases). Les métastases affectant les organes vitaux sont la principale cause de décès par cancer **("Cancer," n.d., "Définition cancer," n.d.)**.

3.2 Épidémiologie du cancer

Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde et depuis 2004, il est la première cause de mortalité en France. Dans le monde, selon le dernier rapport du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC ; 2014), plus de 14 millions de nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués et 8,2 millions de décès par cancer ont été enregistrés.

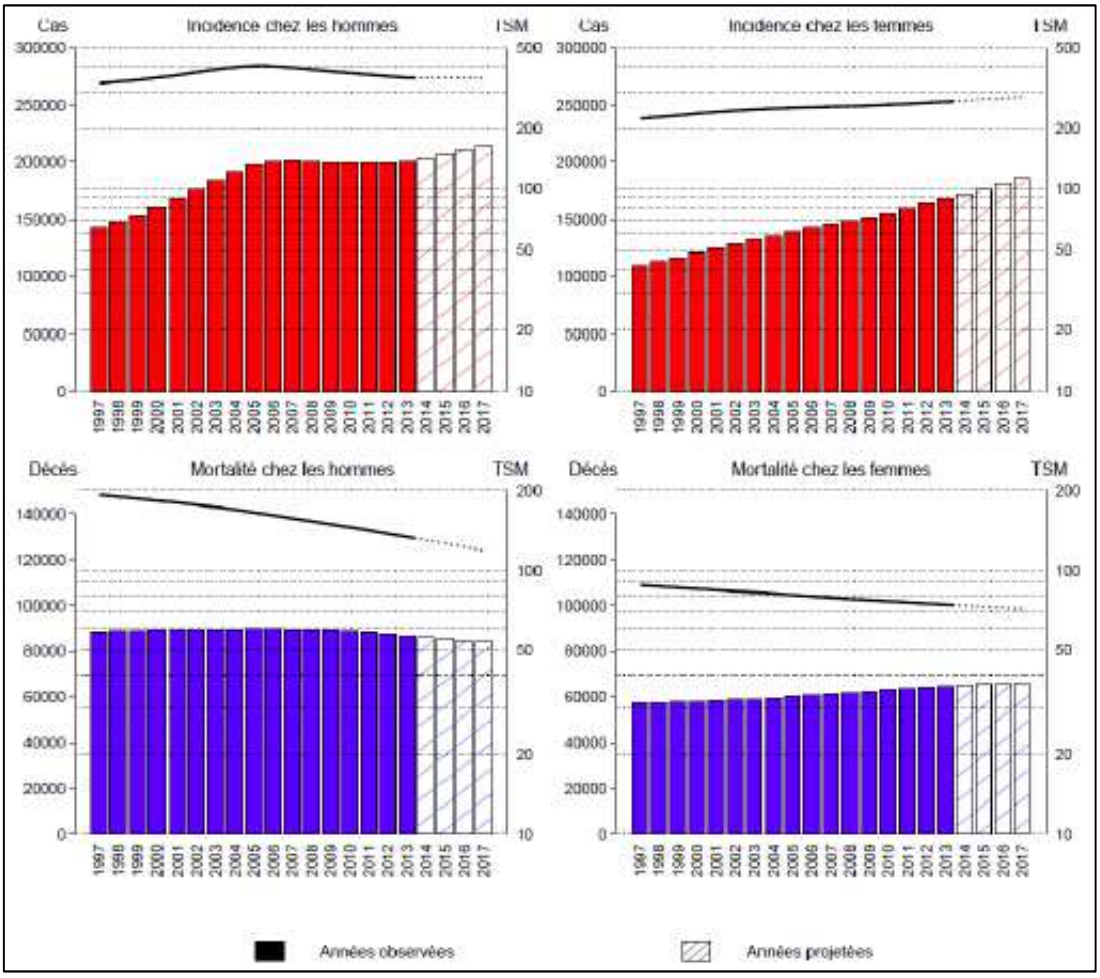


Figure 13: Incidence et mortalité par cancer en France métropolitaine. *Évolution de l'incidence (barres rouges) et de la mortalité (barres bleues) et des taux standardisés monde (TSM) correspondants (courbes, échelle logarithmique) chez l'homme (gauche) et la femme (droite), de 1997 à 2017* ***("Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017 / 2018 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil," n.d.)***.

En France, près de 400 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en 2017 dont 214 000 chez les hommes et 185 500 chez les femmes (Figure 13). Pour les hommes, les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate (48 427 nouveaux cas en 2013), du poumon (32 500 cas) et le cancer colorectal (24 000 cas) alors que pour les femmes, ce sont les cancers du sein (59 000 cas), le cancer colorectal (21 000 cas) et celui du poumon (17 000 cas) (Figure 14). Le nombre de décès atteignait 150 303 (84 100 hommes et 66 203 femmes), avec comme cancers les plus meurtriers celui du poumon pour l'homme et celui du sein pour la femme (Figure 15) **("Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer," n.d.)**.

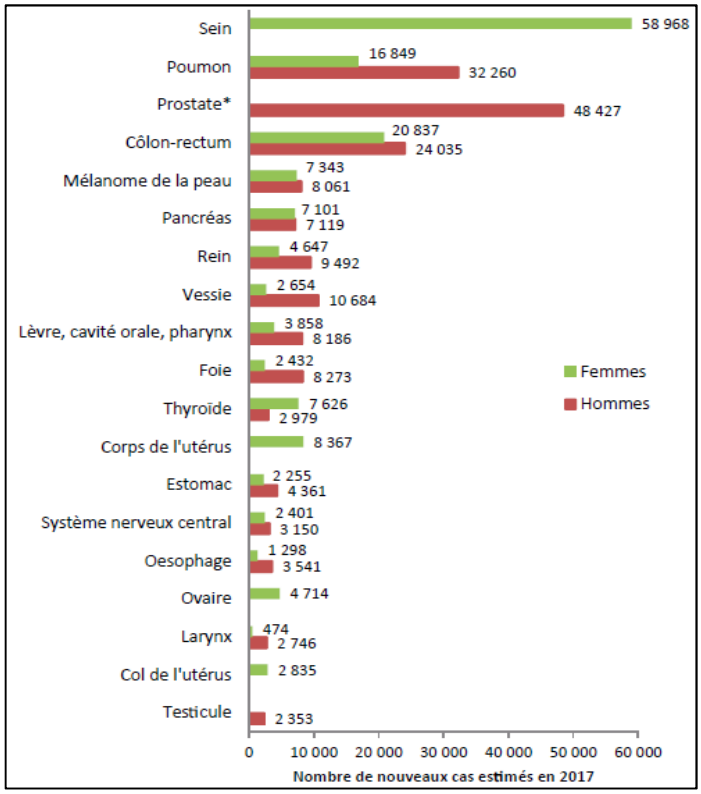


Figure 14: Incidence des tumeurs solides en France métropolitaine chez les femmes (vert) et les hommes (rouge) *(INCa, 2017)*.

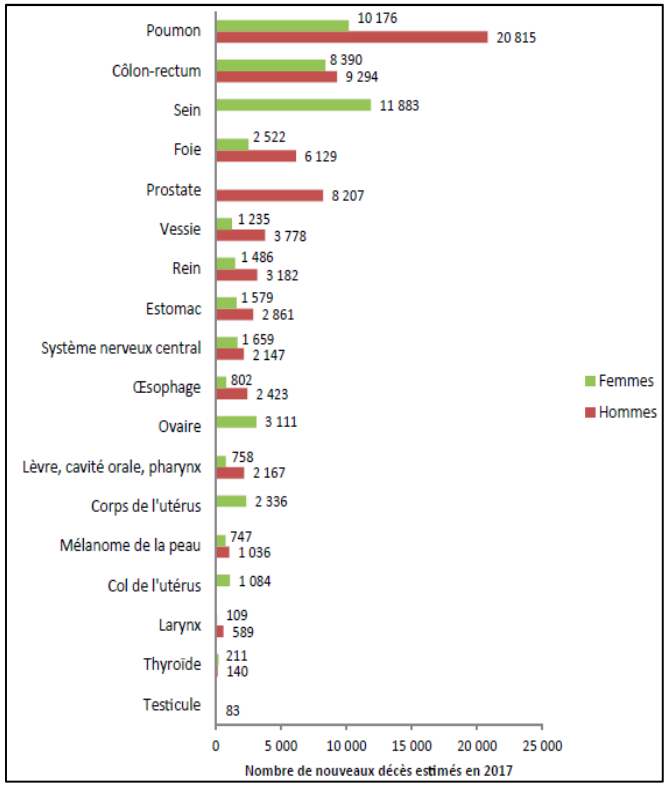


Figure 15: Mortalité par cancer (tumeurs solides) en France métropolitaine chez les femmes (vert) et les hommes (rouge) *(INCa, 2017)*.

De plus, le risque de cancer secondaire est augmenté en moyenne de 36% par rapport au risque de cancer de la population générale. Ces chiffres ne cessent d'augmenter ces dernières années en raison de l'augmentation de la population française et de son âge, de l'amélioration de la détection, du fait des comportements à risque (tabac, alcool, rayons UV), de mode de vie (nutrition, sédentarité, obésité), et de l'environnement (figure 13) **("Réduire les risques de cancer - Comprendre, prévenir, dépister," n.d.).**

3.3 Processus de cancérisation

Globalement, le cancer résulte d'un défaut de contrôle de la prolifération des cellules nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les cellules cancéreuses sont la conséquence généralement de l'accumulation de six modifications essentielles (Figure 16). Ces modifications, ou caractéristiques, favorisent une croissance anormale telle que l'indépendance aux signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), la capacité de prolifération illimitée, la capacité d'induire l'angiogenèse, et l'acquisition de la capacité d'invasion des tissus qui est à l'origine des métastases **(Hanahan and Weinberg, 2000)**.



Figure 16: Les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses *(Hanahan and Weinberg, 2011)*.

L'accumulation de ces caractéristiques phénotypiques se produit lors du développement tumoral qui évolue selon trois étapes successives que sont l'initiation, la promotion et la progression (Figure 17) **(Liu et al., 2015; Oliveira et al., 2007; Trosko, 2001)** :

Lors de l'initiation, une cellule subit un processus irréversible (mutation génétique) pouvant affecter le contrôle de sa prolifération. Cette cellule initiée peut ensuite entrer dans une phase d'expansion clonale qui caractérise l'étape de promotion. Au cours de cette étape, les cellules précancéreuses dont la prolifération est activée par exposition à des agents ou stimuli « promoteurs » peuvent être affectées par de nouvelles mutations, qui les rendent encore plus proliférantes. La promotion est une étape réversible car après la disparition du « promoteur », une régression de la prolifération par apoptose peut se produire. Généralement, on identifie deux catégories de « promoteurs » agissant soit spécifiquement sur des récepteurs soit non spécifiques, mais capables de modifier l'expression de gènes favorisant la prolifération de la cellule initiée. Le développement tumoral dépend alors de la concentration du « promoteur » dans les tissus. Les promoteurs ne provoquent pas nécessairement le cancer par eux-mêmes, mais augmentent la prolifération des cellules initiées et conduisent à l'apparition d'une tumeur (néoplasie).

La progression est la dernière étape de la formation d'une tumeur au terme de laquelle les cellules tumorales peuvent commencer à envahir les tissus environnants susceptibles d'entraîner l'induction de métastases. C'est au cours de cette étape que les cellules tumorales deviennent véritablement cancéreuses par une accumulation d'événements génétiques et épigénétiques favorisant leur prolifération et l'acquisition de nouvelles propriétés, telles que l'instabilité génétique, une croissance rapide, les capacités d'angiogenèse et d'invasion associées à des modifications biochimiques, métaboliques et morphologiques des cellules.

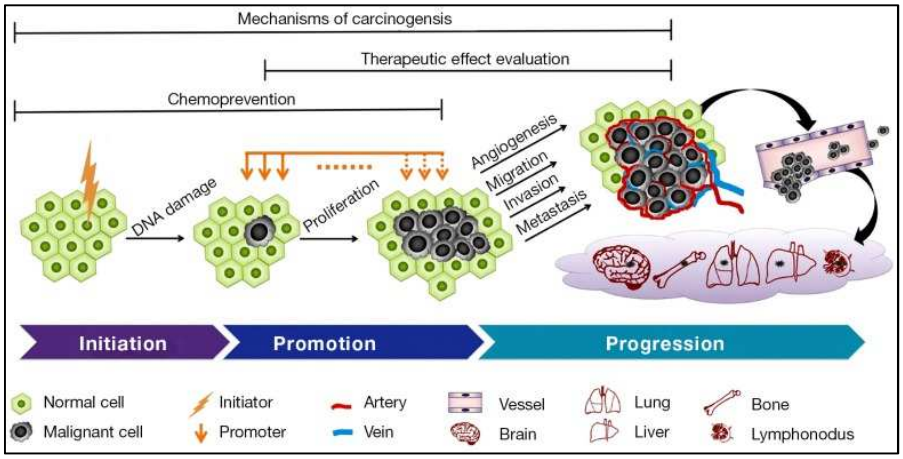


Figure 17: Les différentes étapes de la cancérogenèse (initiation, promotion et progression) ***(Liu et al., 2015)***.

3.4 Gliomes et Glioblastomes

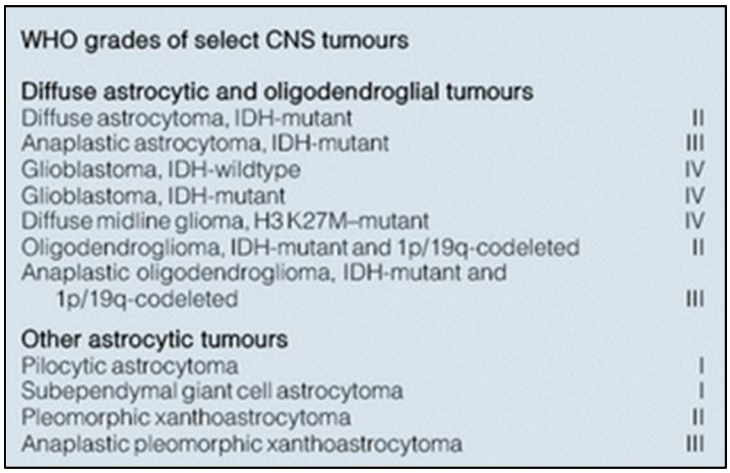
3.4.1 Les tumeurs cérébrales et leur classification

Les gliomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes affectant généralement les hémisphères cérébraux. Les gliomes infiltrants sont composés de trois grandes classes de tumeurs désignées sur la base des types cellulaires qui les composent : les oligodendrogliomes, les astrocytomes infiltrants et les oligoastrogliomes (mixtes). Contrairement aux autres tumeurs du système nerveux central (SNC), les gliomes ont tendance à s'infiltrer le long des structures préexistantes comme la substance blanche, les espaces périvasculaires et les compartiments sous-ventriculaires **(Figarella-Branger et al., 2008)**.

D'après l'OMS, la progression des gliomes est caractérisée par une succession de grades dont l'estimation dépend de critères histologiques et du degré de malignité observé tels que la densité cellulaire, l'atypie nucléaire, la fréquence des mitoses, la néovascularisation et la présence de nécroses **(Figarella-Branger et al., 2008)**. Ainsi, pour les gliomes, il est possible de caractériser quatre grades numérotés de I à IV **(Furnari et al., 2007; Louis et al., 2007)** :

- Les tumeurs de **grade I** (Astrocytomes pilocytiques) sont généralement bénignes, curables par résection chirurgicale, et caractérisées histologiquement par des atypies nucléaires.
- Les tumeurs de **grade II** (Astrocytomes diffus) comprennent les astrocytomes, les oligoastrocytomes (ou gliomes mixtes) et les oligodendrogliomes. Caractérisées par leur activité mitotique, ces tumeurs sont généralement considérées de « bas grade » et sont susceptibles de progresser en grades plus élevés.
- Les tumeurs de **grade III** (Astrocytomes anaplasiques) sont caractérisées par une forte prolifération.
- Les tumeurs de **grade IV** (Glioblastomes) correspondent à la forme la plus maligne du gliome et sont caractérisées par des nécroses, des néovascularisations et une forte capacité d'invasion du parenchyme adjacent.

Cependant, cette classification histologique manquant de reproductibilité inter-observateur, l'OMS l'a remise à jour en 2016. Par cette nouvelle classification, le grade des gliomes a été redéfini, non seulement sur des caractéristiques histologiques traditionnelles, mais aussi, sur la base de paramètres moléculaires (Figure 18).



WHO grades of select CNS tumours	
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3 K27M–mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III
Other astrocytic tumours	
Pilocytic astrocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III

Figure 18: Les différents grades des gliomes selon l'OMS ***(Louis et al., 2016)***.

La précision de cette classification est importante d'un point de vue thérapeutique car le grade de la tumeur est un facteur-clé influant sur le choix de l'utilisation de la radiothérapie adjuvante et de protocoles de chimiothérapies spécifiques **(Louis et al., 2016)**.

3.4.2 Glioblastomes

Le glioblastome (GBM, ou gliome de grade IV selon l'OMS) est la tumeur maligne la plus fréquente et la plus meurtrière du SNC, représentant 12% à 15% de toutes les tumeurs intracrâniennes et jusqu'à 60% des gliomes **(Coleman et al., 2018)**.

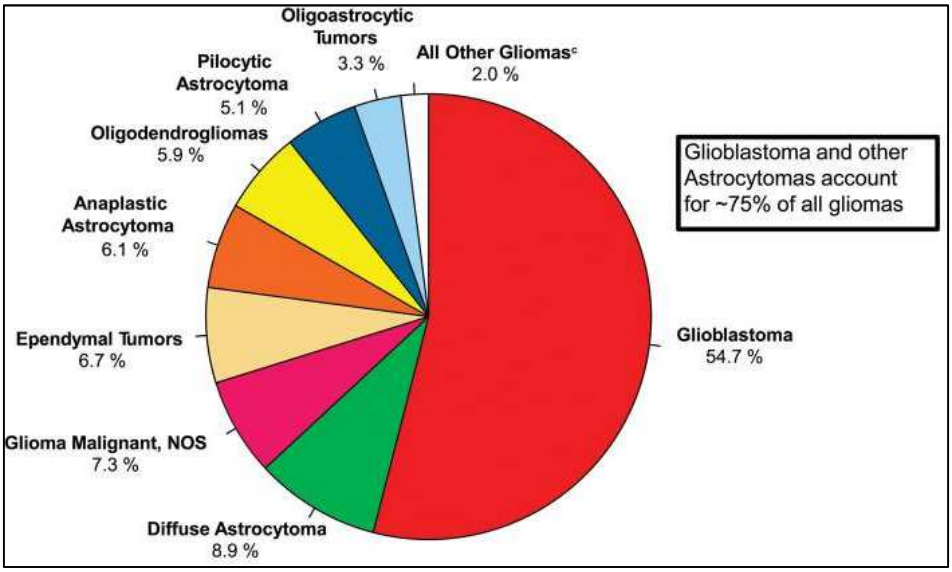


Figure 19: Répartition des gliomes par sous-types histologiques *(N = 96 448), Rapport statistique CBTRUS : NPCR et SEER, 2007-2011* ***(Ostrom et al., 2014)***.

En France, l'incidence du glioblastome est d'environ 2 400 nouveaux cas par an (soit 4 personnes sur 100 000). Affectant majoritairement les hommes, cette tumeur peut survenir à tout âge mais c'est entre 45 et 70 ans que sont diagnostiqués 70% des cas avec un âge médian de 58 ans lors du diagnostic **("Glioblastome, tout savoir, origine, causes, diagnostic, pronostic, traitements, vaccins," n.d.)**.

Parmi les glioblastomes, on distingue deux sous-types principaux. Le glioblastome primaire (*de novo*) représente environ 90 % des glioblastomes et affecte généralement les adultes de plus de 55 ans. Le glioblastome secondaire, plus rare, représente environ 10 % des cas de glioblastome et provient de la progression des astrocytomes de grade II jusqu'au grade IV en passant par le grade III. Ce dernier survient chez les jeunes patients (moins de 45 ans). Cependant, bien que ces sous-types de glioblastome présentent des similitudes au niveau histopathologique, leurs profils génomiques et moléculaires montrent des caractéristiques distinctes (Figure 20) **(Furnari et al., 2007; Louis et al., 2016)**.

3.4.3 Altérations génétiques et moléculaires

Différentes altérations génétiques et moléculaires ont été identifiées dans les glioblastomes telles que le statut de la méthylation du promoteur du gène de l'ADN O^6-méthylguanine

méthyltransférase (MGMT), les mutations des gènes codant pour l'isocitrate déshydrogénase 1/2 (IDH 1/2) et les protéines TP53 et du rétinoblastome (RB1). On note également l'amplification du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et l'altération de la voie de signalisation RTK/RAS/PI-3K ainsi que des pertes d'hétérozygotie **(Thakkar et al., 2014)**. D'une façon plus détaillée, l'évolution des glioblastomes est la conséquence d'événements génétiques particuliers affectant principalement certains oncogènes (EGFR, PDGF et ses récepteurs), des gènes suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, p14ARF, PTEN, RB1 et TP53) et la perte fréquente d'hétérozygotie des chromosomes 1p, 10p, 10q, 19q et 22q **(Ohgaki et al., 2004)**.

Les glioblastomes primaires sont caractérisés par l'amplification du gène de l'EGFR, la mutation du gène de PTEN, du promoteur TERT et l'absence de mutation du gène de l'IDH, tandis que les GBM secondaires sont caractérisés par des mutations affectant la TP53, ATRX, IDH, sans amplification du gène de l'EGFR (Figure 20) **(Aldape et al., 2015)**.

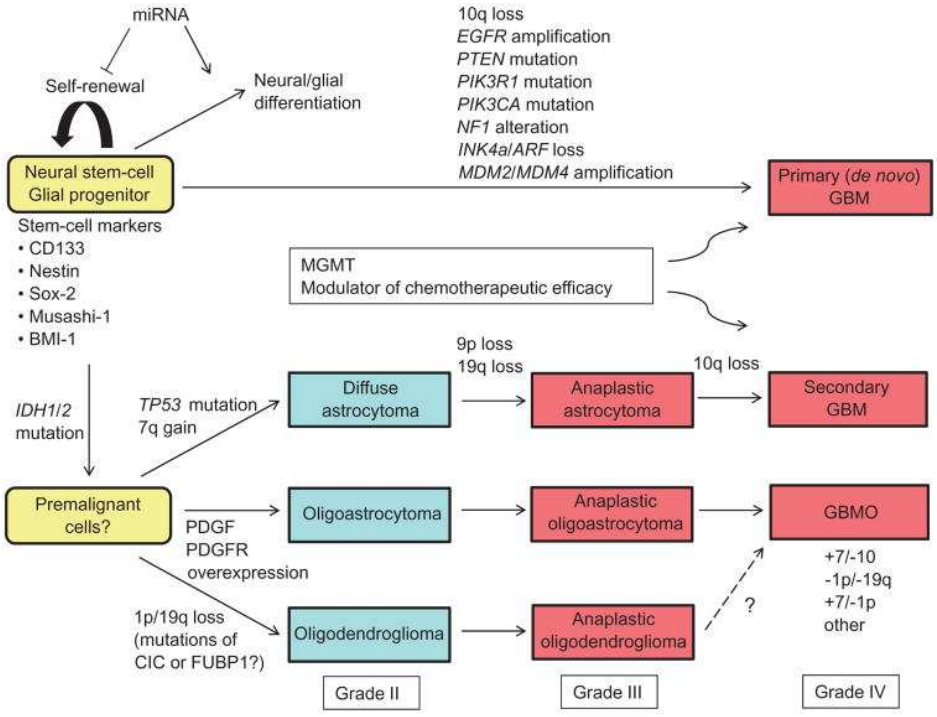


Figure 20: Altérations génétiques et des voies de signalisation à l'origine des glioblastomes. *Sur cette figure, on voit les caractéristiques génétiques à l'origine des glioblastomes primaires et secondaires. CIC : CapICua homologue of the Drosophila gene; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor; FUBP1 : far-upstream element binding protein 1; IDH 1/2 : Isocyanate Dehydrogenase1/2; GBMO : GBM with oligodendroglia component; MDM 2/4 : Murine Double Minute 2/4; MGMT : O^6-MethylGuanine Methyltransferase; NF1 : NeuroFibromatosis 1, PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; PIK3R1 : PhosphoInositide-3-Kinase Regulatory 1; PTEN: Phosphatase and TENsin* ***(Masui et al., 2012)***.

En 2006, une nouvelle classification des glioblastomes a été proposée. Basée selon leur profil transcriptionnel, cette classification répartit les glioblastomes en trois sous-groupes qui sont les « proneuraux », les « proliférants » et les « mésenchymateux » **(Phillips et al., 2006)**. En outre, l'atlas du génome des glioblastomes, réalisé par le consortium TCGA, a permis d'identifier les voies de signalisation qui y sont couramment altérées (Figure 21) **("Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," 2008)** .

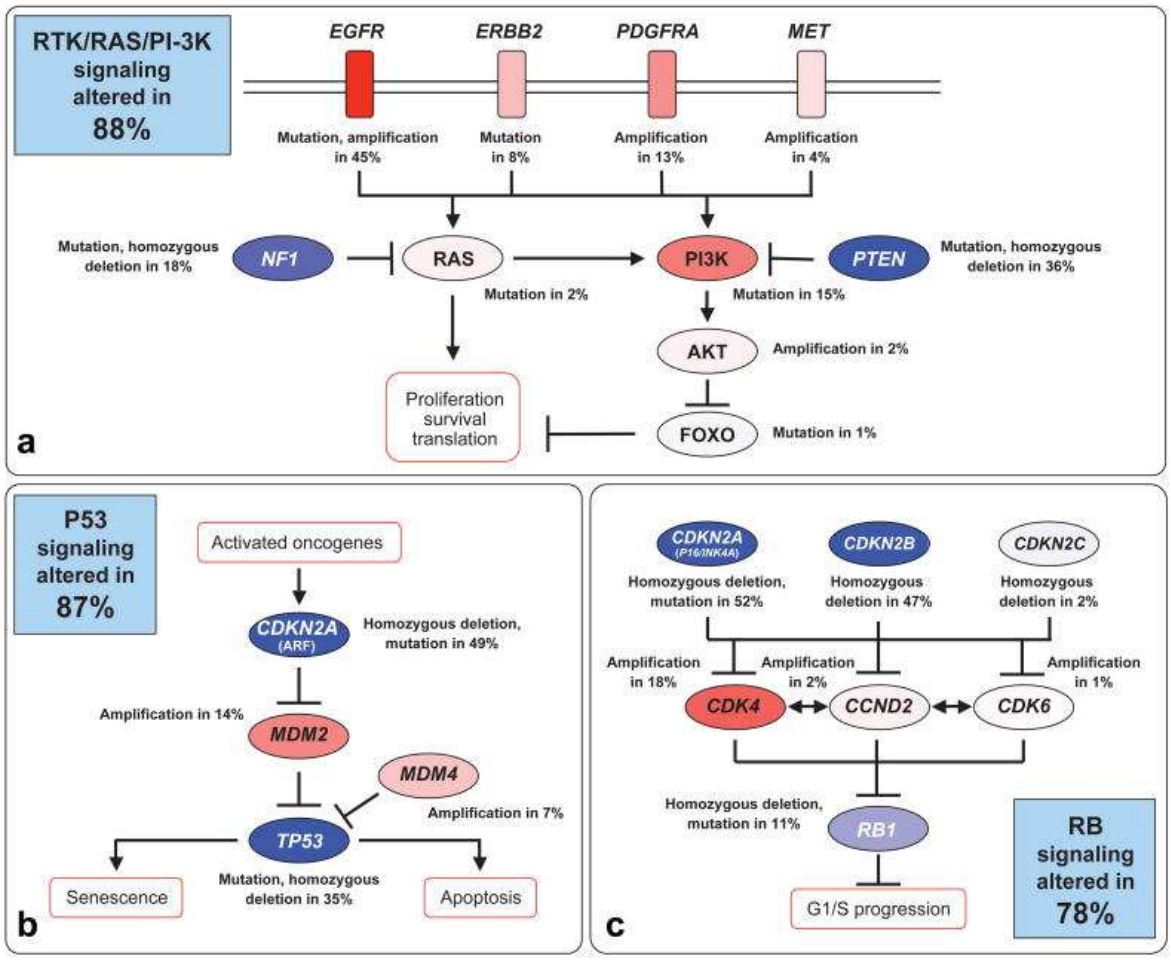


Figure 21: Altérations génétiques de trois voies de signalisation (a, RTK/RAS/PI-3K ; b, p53 et c, RB) fréquemment observées dans les glioblastomes. *La couleur rouge indique des altérations activantes alors que la couleur bleue indique des altérations inactivantes. Plus la couleur est foncée et plus fréquemment les gènes indiqués sont altérés. AKT : Protéine Kinase B; CCND2 : Cyclin D2; CDK4/6 : Cyclin-Dependent Kinase 4/6 ; CDKN2A/B/C : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B/C; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor; ERBB2 : ERythoBlastosis B 2; FOX : Forkhead Box; MDM 2/4 : Murine Double Minute 2/4; MET : Mesenchymal-Epithelial Transition factor Receptor; NF1 : NeuroFibromatosis 1; PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor; PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase; PTEN : Phosphatase and TENsin; RAS : Rat Sarcoma; RB : RetinoBlastoma* ***("Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," 2008)****.*

Ces analyses moléculaires portant sur l'ADN, les ARNm, les microARNs et les profils épigénétiques des glioblastomes ont permis de préciser les classifications antérieures **(Phillips et al., 2006)** et de proposer finalement une répartition en quatre sous-groupes comprenant les glioblastomes « proneuraux », « neuraux », « classiques » et « mésenchymateux » **(Verhaak et al., 2010)**. Chaque sous-groupe de glioblastome comporte ainsi des signatures génétiques différentes et est caractérisé par des altérations moléculaires spécifiques et par l'activation de voies de signalisation particulières (Figure 22) **(Van Meir et al., 2010)**.

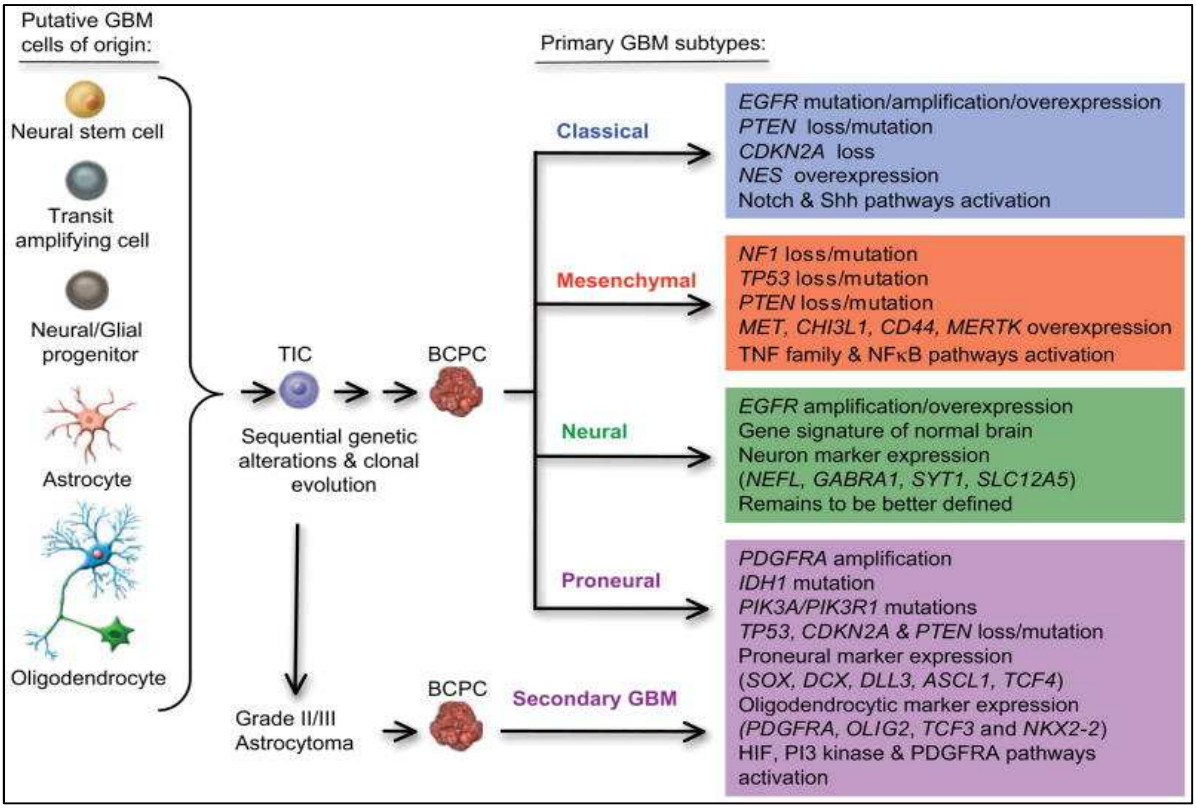


Figure 22: Altérations génétiques séquentielles observées dans la pathogenèse des différents sous-groupes de glioblastome. *GBM : glioblastome multiforme; EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique; PTEN : homologue phosphatase et tensin; TNF : facteur de nécrose tumorale; PDGFRA : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes de type A; IDH : isocitrate déshydrogénase; PI3K : phosphoinositol 3 – kinase; HIF : facteur induit par l'hypoxie* ***(Van Meir et al., 2010)****.*

3.4.4 Étiologie de glioblastome

L'origine du glioblastome demeure inconnue malgré la description physiopathologique de plus en plus approfondie de la tumeur. Cependant, certaines hypothèses, basées sur des observations expérimentales, suggèrent que le glioblastome résulterait de la prolifération de

cellules souches tumorales provenant soit de la transformation des cellules souches neurales ou progénitrices, soit de la dédifférenciation d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. **(Siebzehnrubl et al., 2011; Van Meir et al., 2010)**. Ces cellules normales (cellules souches neurales, astrocytes, oligodendrocytes) peuvent être la cible de mutations à l'origine d'abord des cellules souches tumorales ou initiatrices de gliomes (GIC) puis des glioblastomes (Figure 23). Comme les cellules souches normales pour les tissus sains, les GIC ont la capacité de s'autorenouveler, de proliférer et de générer des cellules cancéreuses **(Singh et al., 2004; Van Meir et al., 2010)**.

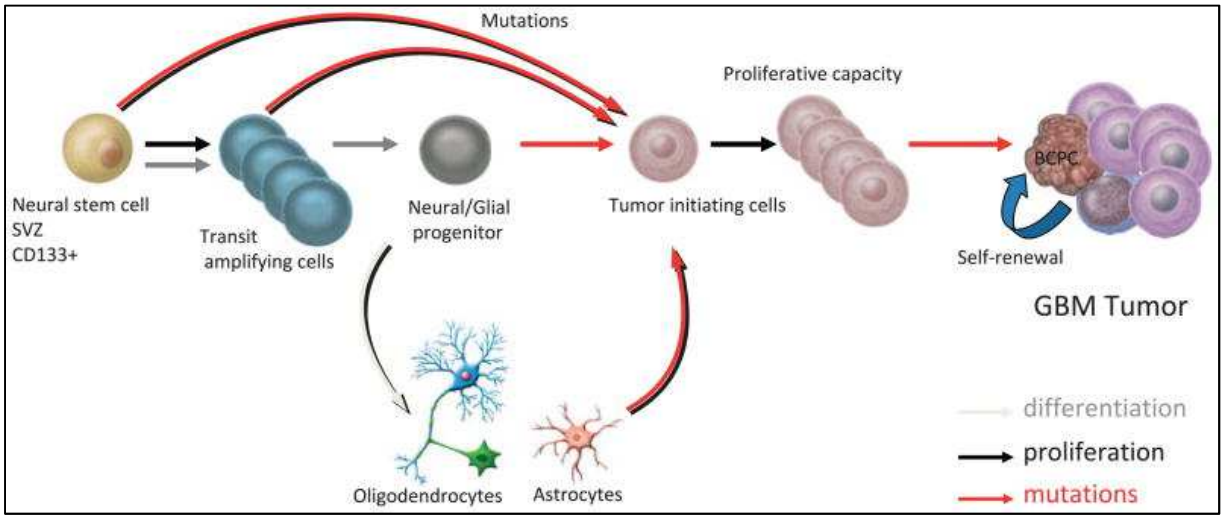


Figure 23: Origines cellulaires possible des glioblastomes. *Dans la situation normale, les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire prolifèrent et se différencient soit en cellules neurales, soit en cellules gliales. Les cellules souches neurales peuvent être la cible de mutations à tous les niveaux de cette lignée générant ainsi des cellules initiatrices de tumeur (CIT). Les CIT ont la capacité de s'autorenouveler, de proliférer et de générer des cellules propagatrices de tumeur dans le cerveau, à l'origine de GBM. BCPC : Brain Cancer-Propagating cells ; CD133+ : marqueur des cellules souches ; SVZ : Zone sous-ventriculaire (Subventricular zone)* ***(Van Meir et al., 2010)***.

Les mutations à l'origine des glioblastomes peuvent être la conséquence d'expositions aux pesticides, à des rayonnements ionisants, à un champ électromagnétique notamment lié à l'utilisation du téléphone portable (contesté) ou suite à un traumatisme crânien, voire à la consommation d'aliments contenant des composés N-nitrosés ou de l'aspartame **(Omuro, 2013)**.

3.4.5 Présentation clinique et thérapie

Le glioblastome se présente cliniquement par de fréquents maux de tête, nausées, vomissements, des difficultés cognitives ou des vertiges, voire une incontinence qui sont autant de symptomes dus à l'augmentation de la pression intracrânienne, induite par la croissance de la tumeur. La variation des symptômes dépend de la région cérébrale affectée pouvant ainsi se traduire par des pertes sensorielles, des troubles de la vision ou d'élocution **(Omuro, 2013)**.

Le traitement standard du glioblastome est la résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie. La résection chirurgicale consiste à retirer complètement la tumeur. La qualité de l'exérèse est un facteur important pour le pronostic puisque la médiane de survie peut varier de 16,9 mois, après résection complète, à 11,8 mois en cas de résection incomplète **(Stummer et al., 2008)**. Cependant, étant donné que le glioblastome est une tumeur diffuse, la résection ne peut être que partielle d'où le risque permanent de récidive. Néanmoins, cet acte chirurgical permet aux patients d'améliorer leur qualité de vie tout en réduisant les symptômes **(Dupont et al., 2018)**. La radiothérapie postopératoire ne montre pas d'avantages significatifs si ce n'est qu'une faible augmentation de la survie selon les cas. L'ajout d'une chimiothérapie postopératoire à la nitrosourée améliore de 6% la survie à 1 an **(Stewart, 2002)**.

L'administration concomitante d'une radio-chimiothérapie augmente de 26,5% la médiane de survie à 2 ans par rapport à la radiothérapie postopératoire seule qui ne l'améliore que de 10,4%. L'adjuvant chimiothérapeutique utilisé est le témozolomide, un agent alkylant qui permet l'inhibition de la réparation de l'ADN. Il entraîne une alkylation des guanines de l'ADN en O^6 et N^7, puis un mésappariement des bases conduisant à la mort cellulaire. Il est important de noter que les patients dont la tumeur est caractérisée par la méthylation du promoteur du gène codant pour l'enzyme MGMT sont plus susceptibles de bénéficier de ce traitement **(Hegi et al., 2004; Stupp et al., 2009b, 2009a)**.

Malgré leur faible taux d'incidence, le pronostic des glioblastomes est très mauvais. En effet, même après les traitements indiqués (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie), la survie moyenne des patients demeure très courte (14,5 mois) du fait de la résistance aux traitements

des cellules tumorales infiltrées. La présence de ces cellules tumorales infiltrées est une conséquence de l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur d'origine et des capacités invasives élevées des cellules tumorales. **("Glioblastome, tout savoir, origine, causes, diagnostic, pronostic, traitements, vaccins," n.d.)**.

Cette hétérogénéité cellulaire provient en grande partie des interactions coopératives établies entre les cellules souches cancéreuses (CSC), les cellules tumorales et leur microenvironnement. Ces interactions permettent ainsi de favoriser la croissance tumorale, la résistance aux traitements, la suppression immunitaire, l'angiogenèse, l'invasion/migration et l'autorenouvellement des CSC (Figure 24) **(Bonavia et al., 2011)**.

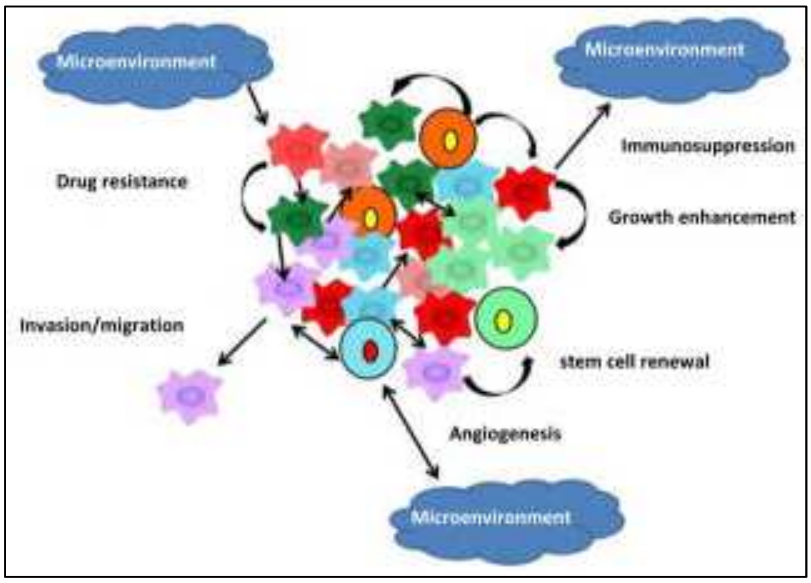


Figure 24: Interactions coopératives entre les cellules souches cancéreuses (CSC), les cellules tumorales et leur microenvironnement. *L'hétérogénéité cellulaire établit des interactions entre les différents types cellulaires présents dans la tumeur qui favorisent la croissance tumorale, la résistance aux traitements, la suppression immunitaire, l'angiogenèse, l'invasion/migration et l'autorenouvèlement des CSC* ***(Bonavia et al., 2011)***.

3.5 Le microenvironnement tumoral

Le concept du microenvironnement tumoral a été proposé initialement par un chirurgien anglais, Stephen Paget, sous la dénomination de la théorie graine-sol (« seed and soil »). Par cette théorie, il suggérait que la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme n'est

pas due au hasard mais que les cellules tumorales (« graines ») prolifèrent préférentiellement dans le microenvironnement de certains organes (« sol ») **(Paget, 1989)**.

Si le microenvironnement tumoral revêt une importance de plus en plus grande en cancérologie depuis plusieurs années, celui-ci a retenu une attention particulière dans la compréhension du glioblastome et de son développement. En effet, plusieurs études montrent que le tissu péritumoral peut participer à la régulation de la tumorigenèse, la progression, l'invasion, l'angiogenèse et la résistance au traitement.

3.5.1 Les cellules du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral du glioblastome est composé de plusieurs types cellulaires, dont des cellules endothéliales, péricytes, cellules immunitaires (macrophages et microglies), cellules souches tumorales et astrocytes (Figure 25).

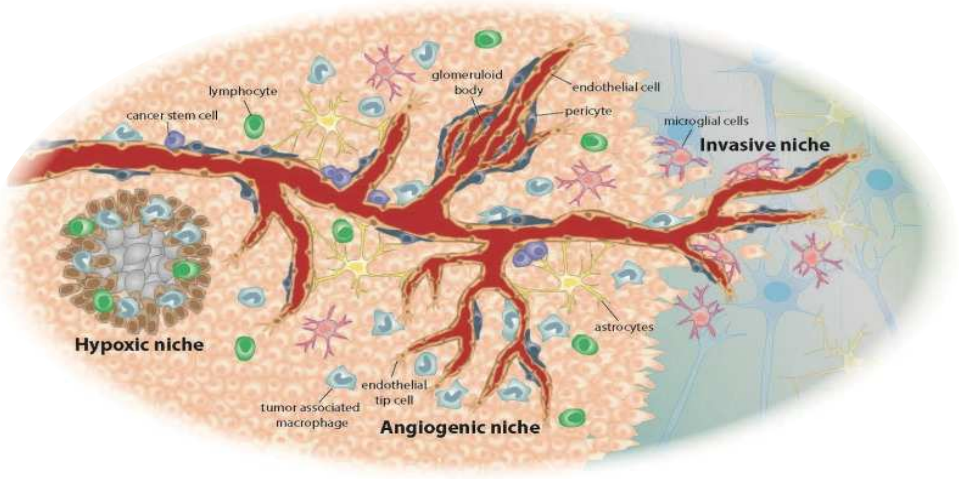


Figure 25: Les composantes cellulaires du microenvironnement d'un glioblastome. *Le glioblastome évolue dans un microenvironnement hétérogène comprenant diverses cellules stromales (astrocytes), vasculaires (cellules endothéliales, péricytes), immunitaires (macrophages, lymphocytes, microglie). Il est également compartimenté dans des régions anatomiques distinctes, appelées niches tumorales, comme les niches angiogéniques, hypoxiques et invasives* ***(De Vleeschouwer and Bergers, 2017).***

3.5.1.1 Les cellules souches tumorales

Les cellules souches normales (CSN) possèdent la capacité d'autorenouvellement et de différenciation. L'autorenouvellement est une fonction essentielle des cellules souches car

elles doivent persister tout au long de la vie de l'organisme afin d'assurer le maintien des tissus dans lesquels elles sont situées.

Les cellules souches cancéreuses (CSC) possèdent la même capacité d'autorenouvellement que les cellules souches normales, sauf qu'elles n'assurent pas, par différenciation, le maintien du tissu normal, mais sont à l'origine d'une population hétérogène de cellules qui constituent la masse tumorale **(Liebelt et al., 2016)**.

Un argument allant dans ce sens est que les CSN et les CSC des glioblastomes possèdent *in vitro* des caractéristiques semblables telles que les capacités d'autorenouvellement, de prolifération sous forme de neurosphères et de multipotence. De surcroît, elles expriment les mêmes marqueurs de surface (CD133, CD15, CXCR4). En revanche, contrairement aux CSN localisées dans des zones particulières du cerveau (zones sous-ventriculaires), les CSC sont localisées au niveau de niches microvasculaires où elles sont maintenues indifférenciées et capables d'autorenouvellement **(Calabrese et al., 2007; Singh et al., 2004)**.

La localisation des CSC dans ce microenvironnement particulier contribue à l'apparition et à la progression de la tumorigenèse. La présence notamment de facteurs de croissance, de cytokines et de microARNs y favorise l'autorenouvellement, la différenciation, la tumorigenèse et les capacités invasives des CSC présentes **(Yu et al., 2012)**. Les CSC, elles-mêmes, favorisent le développement de leurs propres niches périvasculaires en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF.

Si l'angiogenèse est une caractéristique essentielle des glioblastomes, ces tumeurs se caractérisent également par la présence de régions hypoxiques où se développe une nécrose pseudopallisante. De ce fait, l'interaction entre les CSC et la niche demeure complexe puisque celle-ci permet de maintenir un environnement hypoxique qui favorise la progression tumorale **(Heddleston et al., 2009)**.

3.5.1.2 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment la paroi des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Lors de l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales sont activées et

acquièrent des nouvelles capacités de prolifération et de migration les dirigeant vers la masse tumorale. Ce phénomène permet la formation de nouveaux vaisseaux capables d'apporter nutriments et dioxygène aux cellules tumorales. Au cours de ce processus, les cellules endothéliales présentent une altération de prolifération, de migration et d'interactions entre elles et avec la matrice extracellulaire. D'autre part, elles présentent des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques différentes par rapport aux cellules endothéliales normales. En effet, elles surexpriment le récepteur du VEGF (VEGFR), des enzymes (héparinases, uPA) et secrètent par voies autocrines des facteurs qui favorisent leur propre croissance. De plus, la phosphatidylsérine, située normalement sur la face interne de la membrane plasmique, se trouve sur la face externe des cellules endothéliales tumorales augmentant ainsi la charge négative du microenvironnement tumoral. Cette augmentation en charge négative est une des différences phénotypiques les plus utilisées pour cibler spécifiquement les cellules endothéliales tumorales **(Dutour and Rigaud, 2005)**.

3.5.1.3 Les péricytes

Les péricytes sont des cellules adventitielles situées dans la membrane basale des capillaires et des veinules post capillaire. Ce sont des cellules contractiles qui stabilisent les parois des vaisseaux et participent à la régulation du flux sanguin dans la microcirculation. Ils peuvent également influer sur la perméabilité, la prolifération, la survie, la migration et la maturation de l'endothélium **(Morikawa et al., 2002)**.

Dans les vaisseaux tumoraux, les péricytes sont attachés de manière lâche à l'endothélium et présentent des projections cytoplasmiques aberrantes qui envahissent le parenchyme tumoral. La couverture anormale des vaisseaux tumoraux par les péricytes peut avoir des effets sur l'évolution de la tumeur. En effet, leur recrutement au cours de l'angiogenèse par le PDGF-β peut augmenter la stabilité vasculaire et donc favoriser la croissance tumorale. En revanche, une faible couverture en péricytes déstabilise les vaisseaux et favorise la perméabilité facilitant ainsi l'invasion et l'intravasion des cellules tumorales **(Morikawa et al., 2002; Ribeiro and Okamoto, 2015)**.

3.5.1.4 Les cellules immunitaires

Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs sont le fondement de la défense de l'organisme. Pendant le développement du cancer, les cellules tumorales recrutent et maîtrisent les cellules immunitaires afin d'échapper à leur surveillance. Parmi ces cellules, les macrophages dominent jusqu'à constituer environ 30 à 40 % des cellules totales présentes dans le glioblastome. Ces macrophages proviennent de deux sources indépendantes, soit de la microglie, soit de monocytes dérivés de la moelle osseuse **(Chen and Hambardzumyan, 2018)**. Ils peuvent présenter un phénotype activé classiquement (pro-inflammatoires, M1) ou alternativement (anti-inflammatoires, M2).

Les microglies d'où proviennent une partie des macrophages présents dans le glioblastome sont des cellules gliales représentant 10 à 15 % des cellules du cerveau. Leurs rôles dans le cerveau sont d'assurer la réponse immunitaire tout en étant impliquées dans la neurogenèse et la régulation de la mort cellulaire. Les macrophages associés à la tumeur seraient impliquées dans la croissance, l'invasion, l'angiogenèse et l'immunosuppression du gliome en secrétant des facteurs de croissance, des protéases et des protéines de la matrice extracellulaire. Cependant, plusieurs facteurs impliqués dans la promotion de la tumeur par la microglie sont également secrétés par des astrocytes comme IL-6, STAT3, IL-10 et MT1-MMP **(Ghosh and Chaudhuri, 2010; Placone et al., 2016)**.

3.5.1.5 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes et ont été longtemps considérées comme de simples cellules de soutien pour les neurones. Mais peu à peu, il est apparu qu'en plus de ce rôle classique, les astrocytes sont impliqués dans diverses fonctions telles que la protection des neurones, l'activité synaptique, la régulation du flux sanguin, le maintien de l'homéostasie ionique et celui de la barrière hématoencéphalique.

Ils participent également à la réparation et à la cicatrisation post traumatiques du tissu cérébral. Il est connu que les astrocytes répondent activement en cas d'infection, de lésions, d'ischémie et de neurodégénérescence en modifiant leur profil transcriptionnel et leur

morphologie. Cette réactivité astrocytaire, ou astrogliose (astrocytes réactifs), se caractérise notamment par une expression accrue de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) **(O'Brien et al., 2013)**. Elle est aussi observée dans le cas de gliomes astrocytaires et oligodendrocytaires où les astrocytes réactifs sont localisés à une certaine distance de la masse tumorale.

Expérimentalement, ce processus a été vérifié par l'implantation de cellules de gliome (cellules U87 ou U251N) dans le cerveau de souris SCID. Vingt-cinq jours après l'implantation, des astrocytes réactifs ont ainsi été observés à l'interface des masses tumorales formées **(Le et al., 2003)**. De tels astrocytes réactifs sont capables de sécréter des facteurs influençant différents aspects de la biologie tumorale **(Charles et al., 2011)** comme la prolifération, l'invasion, la résistance aux agents chimiothérapeutiques et au système immunitaire (Figure 26) **(Placone et al., 2016)**.

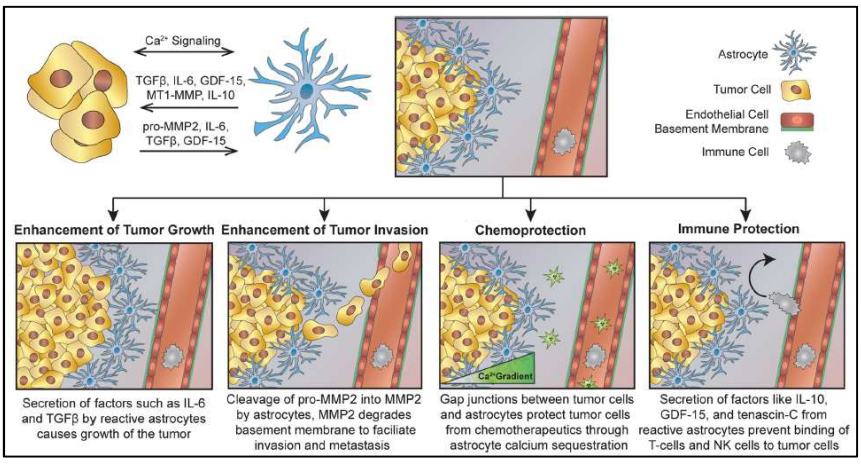


Figure 26: Les astrocytes modulent la progression tumorale en favorisant la prolifération, l'invasion, la chimioprotection et la protection immunitaire. *Les astrocytes sécrètent plusieurs facteurs favorisant la prolifération des cellules tumorales (IL-6, STAT3, TGF-B, GDF-15, IGF-1, bFGF, EGF, PDGF et versican). L'invasion tumorale est favorisée par la présence de la forme active de la MMP2 qui dégrade le collagène et la membrane basale. D'autres facteurs astrocytaires sont impliqués dans cette voie tels que IL-6, STAT3, IL-3 et MT1-MMP. La séquestration de calcium (Ca^{2+}) par les astrocytes entraîne une résistance à la chimiothérapie empêchant ainsi l'apoptose des cellules tumorales. La protection immunitaire est réalisée par la diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires empêchant ainsi les cellules cancéreuses d'être reconnues par le système immunitaire (STAT3) ou inhibant l'activation/prolifération des cellules immunitaires (ténascine C, IL-10)* ***(Placone et al., 2016)***.

3.5.2 Vascularisation des glioblastomes

La forte vascularisation des glioblastomes est une caractéristique de ce type de tumeur **(Charles et al., 2011)**. Plusieurs mécanismes cellulaires intimement liés contribuent à la formation de nouveaux vaisseaux comme le recrutement vasculaire, l'angiogenèse, la vasculogenèse, le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation endothéliale (Figure 27). Et bien qu'ils semblent se situer dans un cadre temporel, il est probable que plusieurs de ces mécanismes se produisent simultanément dans différents microdomaines de la tumeur **(De Pascalis et al., 2018; Hardee and Zagzag, 2012)**.

Les glioblastomes peuvent se connecter au système vasculaire en recrutant des vaisseaux à partir du réseau vasculaire normal existant **(Holash et al., 1999)**. Ces vaisseaux expriment l'angiopoïétine 2 (ANG-2). Lors de la mise en place de l'angiogenèse, la surexpression de l'ANG-2 et de TIE-2 dans les cellules endothéliales et tumorales favorise la rupture des jonctions des cellules endothéliales et des péricytes entraînant une déstabilisation des vaisseaux. Une des étapes clés de ce processus est la protéolyse de la membrane basale et de la matrice extracellulaire due à l'activité des métalloprotéinases (MMPs). En présence de ANG-2, le VEGF favorise la migration et la prolifération des cellules endothéliales et stimule ainsi la formation des nouveaux vaisseaux sanguins **(Reiss et al., 2005)**. L'étape finale de l'angiogenèse qui consiste à « finaliser » la morphologie du capillaire est réalisée par la présence d'intégrines ($\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$) et du CD44 **(Wang et al., 2005)**. La sécrétion du PDGF par les cellules endothéliales activées permet le recrutement des péricytes autour des vaisseaux nouvellement formés mais ce processus angiogénique tumoral aboutit à la formation d'un réseau vasculaire anormal caractérisé par des fuites excessives pouvant entraîner la rupture de la barrière hémato-encéphalique.

Parallèlement à l'angiogenèse, un autre mécanisme, la vasculogenèse, peut se mettre en place. Ce mécanisme se caractérise par une différenciation de cellules circulantes, dérivées de la moelle osseuse, en cellules progénitrices de cellules endothéliales. Le VEGF, qui joue un rôle crucial dans l'angiogenèse, contribuerait également à la migration, à la prolifération et à la différenciation des cellules progénitrices des cellules endothéliales.

Un autre mécanisme de vascularisation présent dans les gliomes est celui du mimétisme vasculaire où des cellules tumorales forment des réseaux vasculaires fonctionnels. Enfin, un mécanisme, plus récemment décrit, serait dû à une transdifférenciation des cellules de gliome en un phénotype endothélial **(Hardee and Zagzag, 2012)**.

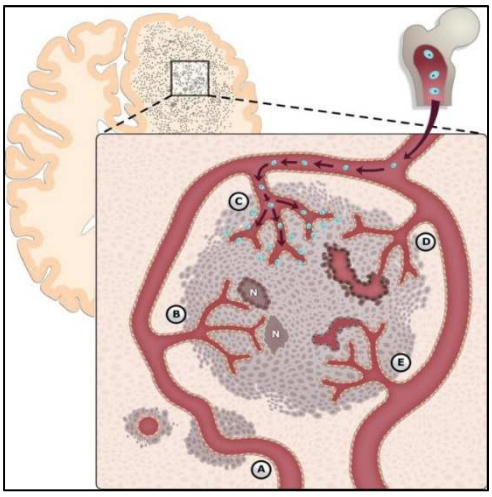


Figure 27: Les différents mécanismes de néovascularisation des gliomes. *Ces mécanismes impliquent cinq voies distinctes : A) le recrutement vasculaire, B) l'angiogenèse, C) la vasculogenèse avec l'intervention des cellules circulantes de la moelle osseuse (Bone Marrow-Deriverted Dentritic Cells) , D) le mimétisme vasculaire et E) la transdifférenciation de cellules de glioblastome en cellules endothéliales. N : nécrose* ***(Hardee and Zagzag, 2012)***

3.5.3 La composante moléculaire et les propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral

La matrice extracellulaire (MEC) est une composante moléculaire fondamentale et importante pour l'organisme en fournissant un support architectural et un ancrage aux cellules. Elle est constituée d'un enchevêtrement de macromolécules formant des réseaux autour des cellules **(Naba et al., 2012)** et comportant des polysaccharides et des protéines glycosylées (collagène, fibronectine, laminine, protéoglycanes) ou non (élastine) **(Mott and Werb, 2004)**. Les cellules adhèrent à la MEC par des intégrines dont les interactions entraînent l'activation de diverses voies de signalisation contrôlant leur prolifération, survie, différenciation et migration. Interagissant avec les protéines sécrétées par les cellules, la MEC sert aussi de réservoirs de facteurs de croissance, de cytokines et d'enzymes **(Nelson and Bissell, 2006)**.

Parmi ces enzymes, on trouve des enzymes de remodelage de la MEC comme des glycosidases capables de dégrader des polysaccharides ainsi que des protéases de différentes catégories, sérine-protéases (urokinase, séprase), cystéine-protéases (cathepsines B et L), aspartyl-protéases (cathepsine D) et métalloprotéinases matricielles (MMP) **(Rao, 2003)**.

Par sa composition et les molécules interagissantes, la MEC tumorale contribue de manière significative à la progression tumorale **(Cukierman and Bassi, 2010; Naba et al., 2012)**. Ainsi par exemple, il a été rapporté une corrélation existant entre le niveau d'expression de MMP et la capacité invasive de gliomes humains. En effet, la dégradation de la MEC par les MMPs augmente l'invasion tumorale, mais affecte également le comportement cellulaire et favorise la progression du cancer (Figure 28). Les MMPs sont des endopeptidases réparties en quatre sous-classes sur la base de leurs substrats ; trois sont des collagénases (MMP -1-8-13), cinq des stromélysines (MMP-3-10-11-7-26), deux des gélatinases (MMP-2-9) et six des MMPs membranaires (MMP14-15-16-17-24-25) également connues sous le nom de MT1-MMP à MT6-MMP **(Rao, 2003)**.

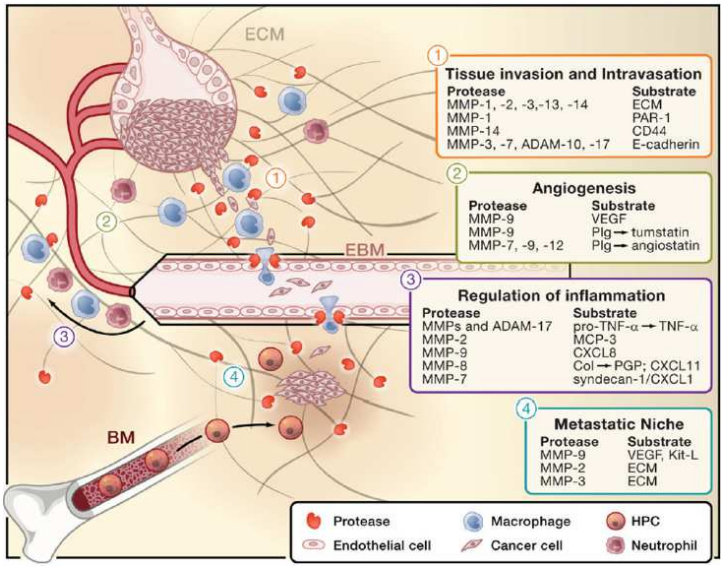


Figure 28: Diverses fonctions des MMPs dans le microenvironnement tumoral *(Kessenbrock et al., 2010)*.

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses doivent s'adapter à des défis biochimiques majeurs comme le manque de nutriments, l'hypoxie et l'acidification du milieu interstitiel (acidose) (Figure 29). Cette situation est la conséquence d'une prolifération

cellulaire incontrôlée entraînant la formation d'un microenvironnement structurellement et fonctionnellement anormal **(Menard et al., 2016)**.

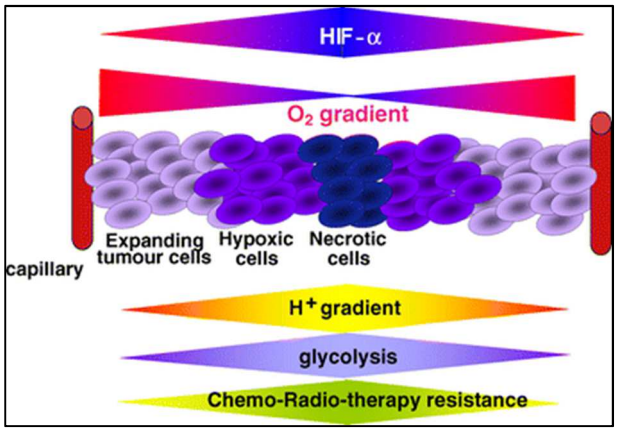


Figure 29: Les caractéristiques biochimiques de la masse tumorale hypoxique. *Plus les cellules tumorales sont éloignées des capillaires sanguins et plus leur apport en oxygène est diminué. Si l'examen macroscopique des tumeurs révèle la présence de cellules tumorales en prolifération à proximité des capillaires, la zone la plus éloignée, souvent centrale, est nécrotique. Ce gradient de viabilité cellulaire qui diminue en s'éloignant des capillaires est parallèle à celui d'un gradient d'oxygène décroissant, qui s'accompagne d'une augmentation des taux d'HIF-1α, d'une diminution du pH extracellulaire et d'une augmentation de la résistance aux traitements* ***(Brahimi-Horn et al., 2007)***.

Du fait de l'hypoxie, les cellules tumorales subissent « l'effet Warburg ». Ce processus observé pendant la glycolyse anaérobie, entraîne, par la lactate déshydrogénase, la conversion du pyruvate en lactate et son expulsion vers le milieu extracellulaire par les transporteurs de monocarboxylates **(Koppenol et al., 2011; Menard et al., 2016; Schulze and Harris, 2012)**. Cela conduit à l'acidification du microenvironnement extracellulaire qui contribue de manière significative à favoriser l'invasion des cellules cancéreuses **(Estrella et al., 2013)**.

De telles conditions hypoxiques induisent des réponses moléculaires, à la fois dans les cellules saines et tumorales comme l'accumulation de HIF-1 (Hypoxia-Induced Factor 1). Ce facteur de transcription régule l'expression d'un large éventail de gènes ayant des conséquences importantes pour les cellules tumorales en termes de survie, de résistance au traitement et de capacité d'invasion.

En réponse au stress hypoxique, tous ces mécanismes agissent sur la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse, la survie ou la mort cellulaire, la régulation du pH et la dégradation de la MEC **(Brahimi-Horn et al., 2007; Menard et al., 2016)**.

3.6 Processus d'invasion et de migration des glioblastomes

Les métastases sont le résultat de la propagation de cellules cancéreuses dans des tissus et organes situés au-delà de la tumeur d'origine. Ce sont ces tumeurs secondaires qui sont responsables de la grande majorité (plus de 90%) des décès par cancer **(Martin et al., 2013)**.

Les cellules de glioblastome métastasent rarement à l'extérieur du cerveau mais migrent activement à travers l'espace périvasculaire et le parenchyme cérébral qu'elles sont capables d'envahir **(Paw et al., 2015)**. Cette capacité invasive associée à la chimiorésistance est responsable des résurgences de glioblastome fréquemment observées après exérèse.

3.6.1 Invasion

Le processus d'invasion se déroule en plusieurs étapes **(Veiseh et al., 2011)**. Les cellules cancéreuses se détachent d'abord de la masse tumorale en formant une protrusion, en avant de la cellule, au sein de la MEC. Ensuite, des points de contacts focaux s'établissent entre la cellule et des composants de la MEC qui permettent une traction en avant nécessaire à la migration cellulaire. Parallèlement, la sécrétion des protéases entraine la dégradation de la MEC et favorise ainsi l'infiltration de la cellule tumorale dans le tissu. Puis, la contraction de la cellule combinée au détachement des points focaux à l'arrière de celle-ci lui permet d'avancer (Figure 30)

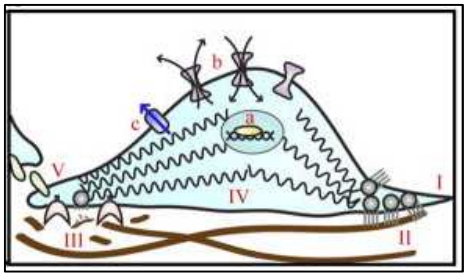


Figure 30: Les différentes étapes du processus d'invasion d'une cellule cancéreuse. ***I****) Détachement de la cellule cancéreuse de la masse tumorale ;* ***II****) Etablissement de contacts focaux entre la cellule et la matrice extracellulaire ;* ***III****) Sécrétion de protéases de dégradation de la matrice extracellulaire ;* ***IV****) Contraction cellulaire ;* ***V****) Détachement de l'arrière de la cellule permettant sa migration. (a) Facteurs de transcription induisant l'expression de molécules nécessaires au processus invasif, (b) Flux entrant et sortant d'ions régulant le volume cellulaire et la fonction protéique, (c) Efflux d'eau modulant le volume cellulaire* ***(Veiseh et al., 2011)****.*

Tout au long de ce processus, de nombreuses biomolécules entrent en interaction et régulent l'adhérence cellulaire, la protéolyse et le transport des ions et de l'eau (Figure 30).

Les cellules tumorales interagissent avec les cellules adjacentes et la MEC par de nombreux sites d'adhérence via des protéines spécifiques exprimées à leur surface. Cependant, pour qu'une cellule devienne invasive, elle doit, d'une part, rompre ses interactions avec les cellules environnantes en réduisant l'expression de la N-cadhérine, et d'autre part, être fixée à la MEC par des intégrines (récepteurs responsables des adhérences cellule-matrice) dont l'expression est augmentée **(Nakada et al., 2007; Veiseh et al., 2011)**.

Le remodelage de la MEC est une étape cruciale du processus invasif. Dans le cas des glioblastomes, son invasion dépend de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMP) telles que les MMP-1, -2, -9 et -14. La MMP-14 activatrice de la MMP-2 est une glycoprotéine de surface cellulaire qui permet l'adhérence des cellules entre elles et à la MEC. La MMP-1 permet le clivage du récepteur PAR1 lié à la membrane cellulaire. La MMP-9 n'a pas de fonction directe sur la MEC mais sa forme inactive « proMMP-9 » favorise l'invasion des cellules par l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire **(Kessenbrock et al., 2010b; Veiseh et al., 2011)**.

Il existe plusieurs cascades protéolytiques interconnectées agissant sur la MEC telles que le système d'activation du plasminogène, composé de la protéase à sérine de type urokinase (uPA), de son récepteur uPAR et de l'inhibiteur de type 1PAI-1. A cela s'ajoutent les MMPs et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) ainsi que les peptidases lysosomales appelées cathepsines **(Figarella-Branger et al., 2010)**. Toutes ces protéinases sont impliquées dans la transduction du signal favorisant le processus d'invasion et sont surexprimées dans les gliomes de haut grade **(Rao, 2003)**.

Parallèlement à l'activité protéolytique, le déplacement de la cellule nécessite une succession de polymérisations et de contractions du cytosquelette d'actine. Différentes protéines sont impliquées dans ce phénomène complexe. Ainsi, par exemple, l'ADF/cofiline est impliquée dans la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine alors que la protéine kinase ROCK permet la formation en réseau de la myosine favorisant la contraction du cytosquelette.

Une cellule cancéreuse invasive doit pouvoir réguler son volume pour passer à travers le réseau dense de la MEC. Pour cela, la modification de l'équilibre osmotique entraîne un écoulement d'eau via des aquaporines. Le volume de la cellule est aussi régulé par l'activité de canaux ioniques membranaires spécifiques (Figure 30). Ainsi, on retrouve un co-transporteur d'ions chlorure, de sodium et de potassium (NKCC1) permettant le maintien du gradient électrochimique. De même, le canal ClC-3 permet le transport d'ions chlorures et régule le volume cellulaire nécessaire à l'invasion. Par ailleurs, le TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6) maintient une concentration intracellulaire en ions calcium élevée nécessaire à l'invasion sans agir sur le volume **(Veiseh et al., 2011)**.

Pour pouvoir se faufiler à travers les espaces extracellulaires dans le cerveau, les cellules de glioblastome subissent des changements morphologiques particuliers en formant des protrusions appelées invadopodes.

3.6.1.1 Les invadopodes

3.6.1.1.1 Définition

Les invadopodes sont des protubérances cellulaires riches en actine, analogues aux podosomes des cellules hématopoïétiques. Formés par les cellules invasives et capables de dégrader la MEC, ils sont nécessaires à leur pénétration à travers la membrane basale et à l'invasion stromale **(Beaty and Condeelis, 2014)**.

3.6.1.1.2 Formation et maturation

La formation des invadopodes débute par l'apparition de précurseurs générés par plusieurs stimuli portés par des facteurs de croissance (EGF, PDGF…), des facteurs oncogéniques (RHO, RAC, CDC42), la transition épithélio-mésenchymateuse, l'hypoxie ou l'activité de MMPs **(Beaty and Condeelis, 2014)**.

L'initiation de la formation d'invadopodes débute par l'interaction entre des intégrines, Src et FAK. La stimulation de la cellule par des facteurs de croissance, par exemple, entraîne une libération de Src qui peut alors phosphoryler Tks5, PKC et PI3k.

Les précurseurs d'invadopodes sont composés de cortactine, de N-WASp, de cofiline et du complexe Arp2/3. La cortactine agit comme une protéine d'échafaudage réunissant N-WASp et Arp2/3 afin de former un noyau de précurseur d'invadopodes. Cependant, il a été montré que la cortactine pourrait être recrutée par Tks5 auquel se lient également NCK1 /2, GRB2 et N-WASp (Figure 31) **(Murphy and Courtneidge, 2011; Oser et al., 2009)**.

La tyrosine kinase Src phosphoryle la cortactine qui libère la cofiline, la rendant capable d'induire la polymérisation de l'actine. Pour que le précurseur d'invadopodes parvienne à maturité, il faut que ce dernier soit stabilisé. Durant cette étape, la cortactine est déphosphorylée entraînant alors la séquestration de la cofiline responsable de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine qui stabilise le précurseur d'invadopode **(MacGrath and Koleske, 2012)**.

Pendant sa maturation, l'invadopode favorise la dégradation de la MEC en coordonnant la sécrétion de MMP-2, MMP-9, MT1MMP, séprase et cathepsines par interactions de composants clés de l'invadopode tels que la cortactine, Tks4/5 et l'intégrine β1 **(Murphy and Courtneidge, 2011)**.

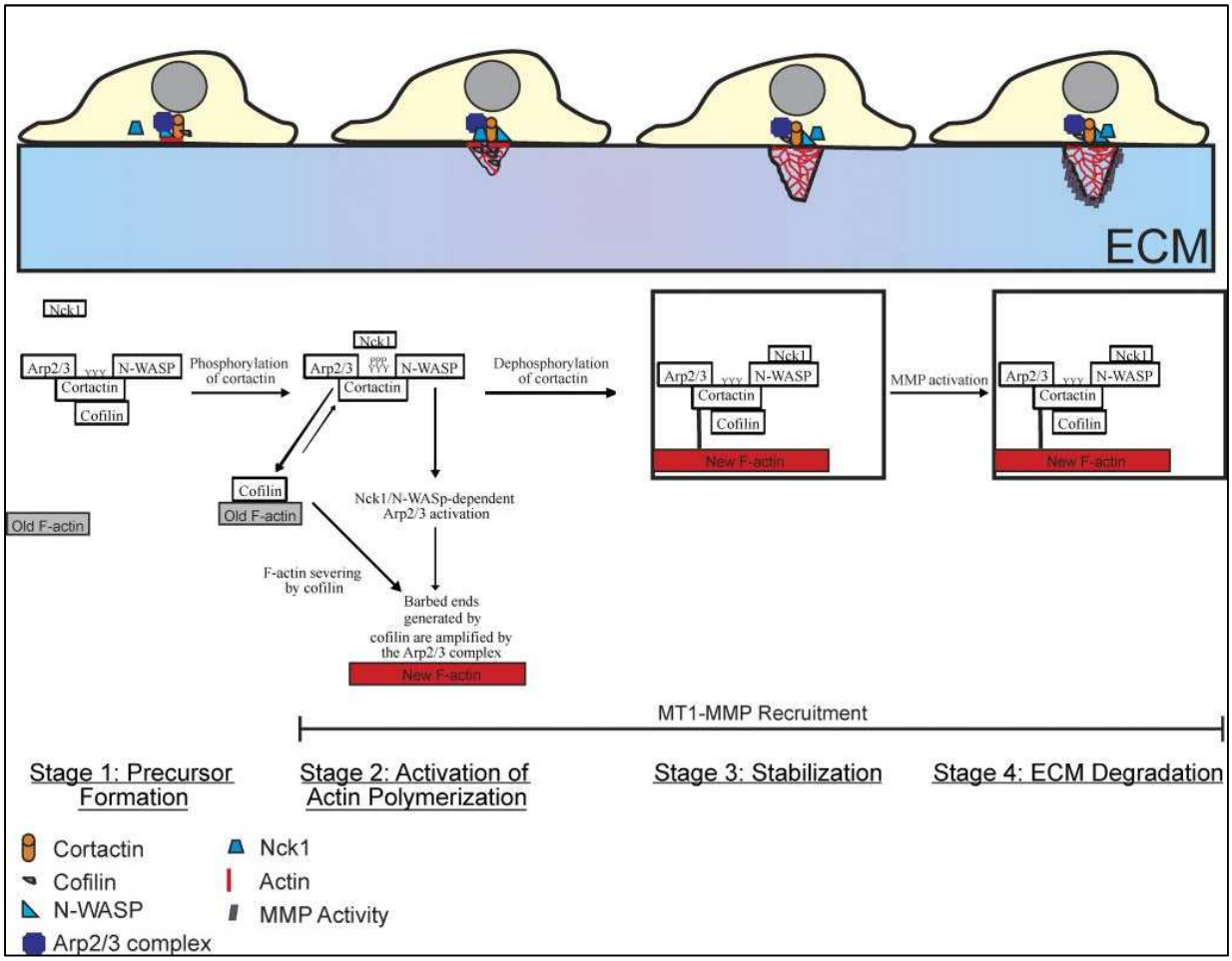


Figure 31: Les étapes de formation et de maturation des invadopodes. *Pendant la formation du précurseur d'invadopode (étape 1), la cortactine, le N-WASp, la cofiline et Arp2 / 3 forment un complexe. La phosphorylation de la cortactine par la tyrosine kinase Src entraîne l'activation de la cofiline permettant la polymérisation de l'actine (étape 2). La déphosphorylation de la cortactine entraîne la stabilisation du précurseur d'invadopode nécessaire à sa maturation (étape 3). Une fois que les invadopodes sont stabilisés et matures, les MMPs sont activées et dégradent la MEC (étape 4)* ***(Oser et al., 2009)***.

3.6.2 Migration

La migration et l'invasion de tissus cérébraux sains par les cellules cancéreuses dépendent de leurs interactions avec la MEC et de sa dégradation mais aussi de la formation de leur propre matrice tumorale capable de créer un environnement favorable à la migration et la croissance tumorales **(Figarella-Branger et al., 2010)**.

Les cellules tumorales infiltrent les régions voisines selon une migration cellulaire individuelle ou collective. De telles différences reflètent des variations moléculaires utilisées lors de la migration. En effet, dans le cas de la migration collective, les cellules adhèrent entre elles par

l'intermédiaire de cadhérines, d'intégrines et de jonctions gap tout en sécrétant une quantité importante de protéases. Alternativement, dans le cas de la migration individuelle, les cellules perdent leurs contacts cellulaires, se détachent et migrent selon différentes variantes morphologiques dépendant du type cellulaire, de l'engagement des intégrines, de la structure du cytosquelette et des protéases sécrétées. Généralement, les cellules cancéreuses migrent alors de façon soit amiboïde soit mésenchymateuse (Figure32) **(Friedl and Wolf, 2003)**. Cette dernière façon étant celle généralement employée par les cellules de glioblastome.

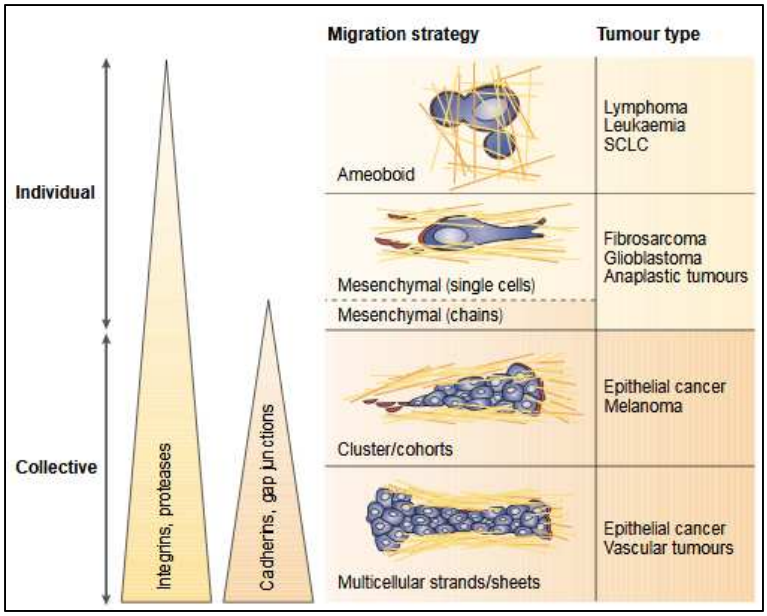


Figure 32: Diversité des mécanismes de migration tumorale. *Les cellules migrant collectivement communiquent et adhèrent entre elles par la présence de jonctions gap, de cadhérines et d'intégrines* ***(Friedl and Wolf, 2003)****.*

La migration cellulaire est réalisée en plusieurs étapes. Elle débute par une polarisation morphologique de la cellule suivie par une extension de la membrane cellulaire formant des lamellipodes et des filopodes dans le sens de sa migration. Ensuite, la cellule adhère à la MEC via les intégrines avant de se contracter. Le relâchement de l'adhérence à l'arrière de la cellule provoque alors une rétraction de celle-ci et son mouvement vers l'avant (Figure 33) **(Lauffenburger and Horwitz, 1996)**

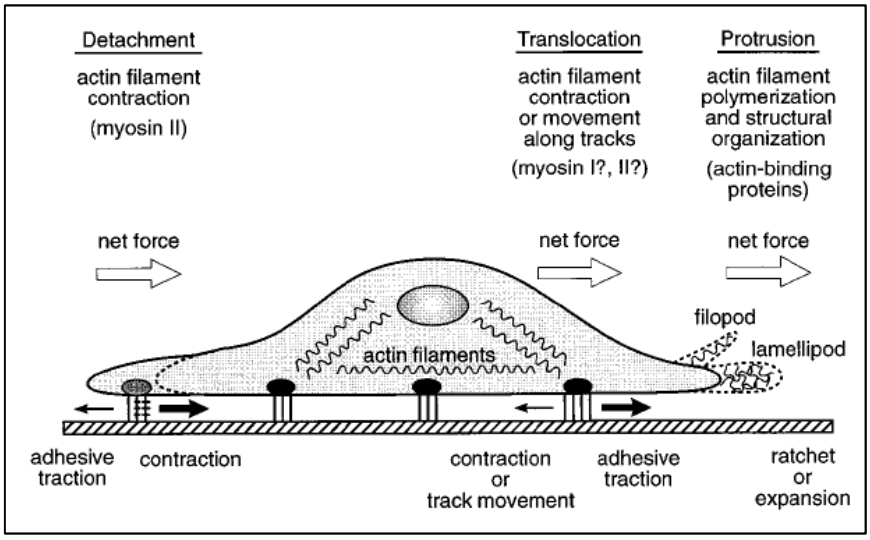


Figure 33: Illustration des différentes forces impliquées dans la migration cellulaire *(Lauffenburger and Horwitz, 1996)*.

La migration cellulaire nécessite une coordination dynamique entre l'organisation du cytosquelette et l'adhérence cellulaire. Cette coordination implique plusieurs voies de transduction du signal dans lesquelles interviennent les GTPases de la famille Rho qui ont pour effecteurs les formines, les WASP / WAVE et le complexe Arp2/3 ainsi que la protéine motrice de la myosine II. D'autres voies se liant au GTPases Rho sont les GTPases Ras, TorC2 et PI3K **(Devreotes and Horwitz, 2015)**.

4. Les jonctions communicantes

4.1 Historique

Au cours des années 1940 et 1950, des études de perméabilité et de mesures électriques réalisées sur des cellules sanguines, des gamètes, des neurones et des fibres musculaires squelettiques ont démontré que les cellules sont entourées d'une barrière étanche et constituent ainsi des « unités autonomes ». Dans les années 1950, des observations ultérieures, réalisées par microscopie électronique, ont confirmé cette notion selon laquelle la membrane cellulaire ou membrane plasmique constitue une barrière continue entre toutes les cellules **(Pour revue (Loewenstein, 1981)**.

Cependant, en 1952, Weidmann travaillant sur le muscle cardiaque a constaté que la conduction des fibres de Purkinje se comportent comme des axones **(Weidmann, 1952)**. Il en a suggéré que ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence d'une voie intercellulaire de faible résistance électrique. Par la suite, la découverte de l'absence de délai synaptique (synapse électrique) a fourni des preuves solides de l'existence d'une voie intercellulaire **(Furshpan and Potter, 1959)**. Puis, plus tard, ce type de voie a été mis en évidence dans d'autres cellules excitables (par propagation intercellulaire de potentiels d'action) mais aussi dans des cellules non excitables (par diffusion intercellulaire de colorants fluorescents microinjectés) **(Pour revue (Sáez et al., 2003)**. Enfin, en 1964, le concept de cette voie de communication intercellulaire a été précisé par le fait que non seulement des ions pouvaient l'emprunter mais aussi des molécules hydrophiles telles que la fluorescéine (330 daltons) **(Kanno and Loewenstein, 1964)**.

A partir de cette époque, il a été admis puis vérifié que les cellules d'invertébrés et de vertébrés peuvent communiquer avec leurs voisines via une voie intercellulaire dénommée selon les périodes ou les systèmes étudiés « nexus », « macula communicans » ou « gap junctions » **(Sáez et al., 2003)**.

4.2 Les jonctions gap

Comme les jonctions serrées et les desmosomes, les jonctions gap sont localisées au niveau des contacts intercellulaires **(Söhl and Willecke, 2004)**. Cependant, elles s'en différencient par la présence d'un espace extracellulaire étroit (« gap ») qui a été détecté grâce à l'observation fine des connexions présentes entre cardiomyocytes de souris et entre hépatocytes **(Revel and Karnovsky, 1967)**.

Les jonctions gap sont ainsi caractérisées par la présence d'une fente de 2 à 3 nm de largeur séparant les membranes plasmiques des cellules adjacentes (Meşe et al., 2007). Des études de microscopie électronique et de cryofracture ont montré des striations au niveau des jonctions gap qui se sont révélé être la conséquence de la présence de canaux intercellulaires reliant les cytoplasmes des cellules en contact. Ces canaux intercellulaires sont regroupés de

telle façon qu'ils forment des plaques jonctionnelles pouvant comporter des milliers de canaux au sein d'une surface de plusieurs micromètres de diamètre (Figure 34) **(Lauf et al., 2002)**.

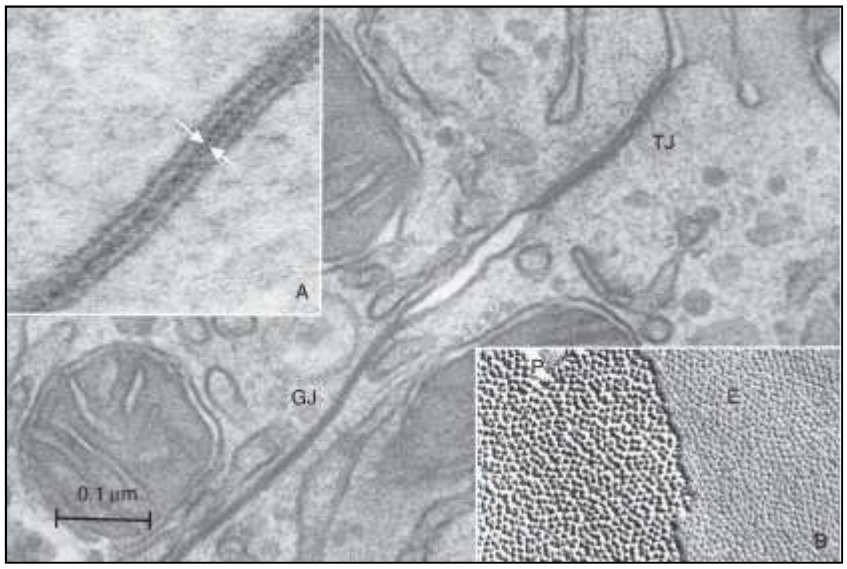


Figure 34: Observation de jonctions gap d'hépatocytes de souris par microscopie électronique. *La jonction gap (GJ) est vue comme une zone d'apposition de membranes plasmiques de cellules adjacentes clairement distincte de la jonction serrée (TJ). (A) Vue à fort grossissement de la GJ révélant le « gap »de 2-3 nm (flèches blanches) séparant les membranes plasmiques. (B) Réplique par cryofracture d'une GJ montrant les particules transmembranaires caractéristiques de la face protoplasmique (P) de la fracture et les creux de la face ectoplasmique (E). Les particules et les creux sont présents en très forte densité au niveau de la plaque jonctionnelle avec un espacement moyen de 9 nm entre elles. Chaque particule représente un canal intercellulaire dont l'empreinte « en creux » est visible dans la face ectoplasmique de la fracture* ***(Goodenough et al 2009)***.

Le diamètre du pore des canaux des jonctions gap, d'environ 2 nm, permet la diffusion passive d'ions et de petites molécules (< 1000 Da) hydrophiles (oses, nucléotides, acides aminés, peptides, etc.). Ce type de communication intercellulaire est probablement fondamental par son importance car les jonctions gap sont présentes dans la quasi-totalité des types cellulaires, à l'exception des fibres musculaires squelettiques, certains neurones, les hématies et les spermatozoïdes matures (Mesnil, 2004).

4.3 Les protéines des jonctions communicantes

De nombreuses études ont montré, notamment par la technique de diffraction aux rayons X, que les canaux intercellulaires des jonctions gap (ou jonctions communicantes) résultent chacun de la juxtaposition de deux demi-canaux (hémicanaux ou connexons) provenant

chacun d'une des deux cellules adjacentes (Makowski et al., 1977). D'autres observations plus récentes réalisées par microscopie à force atomique (AFM) et de cryofracture permettent de déceler une forte densité de connexons, d'aspect hexagonal, et dont les centres sont distants de 9 à 10 nm les uns des autres. Par ces approches, les connexons apparaissent comme étant des structures larges de 3,8 nm avec en leur centre un pore de 2 nm de diamètre. Par la suite, les études réalisée par microscopie électronique combinée au traitement d'images et les analyses hydrodynamiques ont montré que chaque connexon est constitué de 6 sous-unités protéiques appelées connexines (Cx) **(Sáez et al., 2003)**.

Pendant longtemps, les connexines semblaient être les seuls composants des jonctions gap jusqu'au jour où il s'est avéré que les jonctions gap des invertébrés sont composées d'une autre famille de protéines, les innexines, n'ayant aucune homologie de séquences avec les Cxs. Plus récemment, un autre groupe de protéines appelées pannexines (Panxs) a été identifié chez les vertébrés. Ces protéines présentent des homologies lointaines avec les innexines mais ne semblent pas être capables de former des jonctions gap dans les tissus. Elles constituent des canaux transmembraires (pannexons) permettant une communication directe d'ions et de petites molécules hydrophiles entre les espaces extracellulaire et intracellulaire (Hervé et al., 2005; Meşe et al., 2007).

4.3.1 Les connexines

4.3.1.1 Les gènes de connexines

À ce jour, 20 gènes des connexines ont été identifiés dans le génome de la souris et 21 dans le génome humain. La plupart de ces gènes sont organisés simplement, comportant un premier exon (5'-UTR) suivi d'un intron de longueur variable, puis d'un second exon contenant la séquence entière de la protéine et les séquences 3'-UTR (Figure 35). Néanmoins, plusieurs gènes de connexines présentent des exceptions à ce niveau telles qu'un épissage différentiel des séquences 5'-UTR ou la présence d'introns supplémentaires **(Söhl and Willecke, 2004; Wei et al., 2004a; Willecke et al., 2002)**.

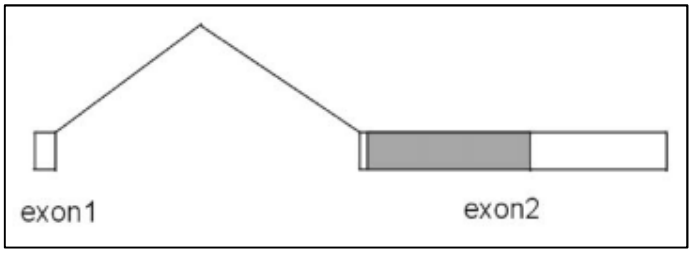


Figure 35: Structure de gène de connexine *(Söhl and Willecke, 2004)*.

4.3.1.2 Nomenclature

Les connexines ont été dénommées selon deux systèmes de nomenclature différents qui considèrent soit la masse moléculaire attendue de la protéine, soit son homologie de séquence. Ainsi, en considérant le poids moléculaire, la connexine de 43 kDa est appelée connexine 43 (Cx43). Les variations de leurs poids moléculaires permettent de classer ces protéines de la plus petite, Cx23, à la plus grande, Cx62. D'après le système de nomenclature par homologie de séquence, les connexines, appelées GJ (gap junction) sont réparties en au moins trois sous-groupes (α, β, ϒ) dans lesquels elles sont numérotées selon l'ordre de leur découverte. Ainsi, par exemple, la Cx43 étant la première connexine découverte du groupe α est appelée Gja1 (a pour alpha) et la Cx32 étant la première connexine découverte du groupe β est appelée Gjb1. La première nomenclature est la plus couramment utilisée pour désigner les connexines en tant que protéines alors que la seconde est surtout utilisée pour désigner leur gène (GJA1, GJB1 pour les gènes de Cx43 et Cx32, respectivement) (Tableau 3) **(Söhl and Willecke, 2004; Wei et al., 2004a)**.

4.3.1.3 Distribution tissulaire des connexines

A part de rares exceptions (hématies, fibres musculaires squelettiques, certains neurones, spermatozoïdes matures), les connexines sont présentes dans tous les types cellulaires. Certaines d'entre elles ont une distribution très étendue, voire quasiment ubiquitaire, comme pour la Cx43 alors que d'autres semblent être spécifiquement exprimées dans des organes particuliers, comme les Cx46 et Cx50 dans le cristallin (Tableau 3). D'autre part, certains organes sont particulièrement riches en connexines comme le cerveau dans lequel au moins

onze types différents sont présents. Cette spécificité et cette variabilité d'expression sont probablement la conséquence de perméabilités particulières nécessaires au maintien de la différenciation et de la fonction des tissus considérés.

Tableau 3: Nomenclature et distribution tissulaire des connexines chez l'être humain et la souris *(Oyamada et al., 2005).*

Etre humain			Souris	Expression tissus/organes
Nomenclature (Protéine)	**Nomenclature (Gène)**	**Chromosome**	**Nomenclature (Protéine)**	
hCx23		?	mCx23	-
hCx25	-	6		-
hCx26	GJβ2	13q11-q12	mCx26	Foie, Rein, Pancréas, Sein, Cochlée, Placenta, Peau, Intestin
hCx30	GJβ6	13q12	mCx30	Cerveau, Cochlée, Peau
hCx30.2	GJE1	7q22.1	mCx29	Cerveau, Moelle épinière, Cellules de Schwann
hCx30.3	GJβ4	1p35-p34	mCx30.3	Peau, Rein
hCx31	GJβ3	1p34	mCx31	Cochlée, Placenta, Peau
hCx31.1	GJβ5	1p35.1	mCx31.1	Peau
hCx31.9	GJC1 (GJα11)	17q21.1	mCx31.2	-
hCx32	GJβ1	Xq13.1	mCx32	Hépatocytes, Cellules de Schwann
-	-	-	mCx33	Cellules de Sertoli
hCx36	GJα9	15q13.2	mCx36	Neurones, Cellules β du pancréas
hCx37	GJα4	1p35.1	mCx37	Endothélium, Cellules granulosa, Poumon, Peau
hCx40	GJα5	1q21.1	mCx40	Système de conduction cardiaque, Endothélium, Poumon
hCx40.1	-	-	mCx39	-
hCx43	GJα1	6q21-q23.2	mCx43	Expression ubiquitaire
hCx45	GJα7	17q21.31	mCx45	Système de conduction cardiaque, Cellules musculaires lisses, Neurones
hCx46	GJα3	13q11-q12	mCx46	Cristallin
hCx47	GJα12	1q41-q42	mCx47	Cerveau, Moelle épinière
hCx50	GJα8	1q21.1	mCx50	Cristallin
hCx59	GJα10	1p34	-	-
hCx62	-	6q15-q16	mCx57	Cellules horizontales rétiniennes

4.3.1.4 Topologie et organisation structurelle des connexines

A partir de l'analyse de la séquence en acides aminés des connexines, leur topologie a pu être confirmée par des approches biochimiques et immunocytochimiques classiques **(Yeager and Nicholson, 1996)**. Elles apparaissent ainsi comme étant des protéines à quatre domaines transmembranaires en hélice α, deux boucles extracellulaires (EL-1 et EL-2) hautement conservées, une boucle intracellulaire (CL) variable par sa longueur et sa séquence d'acides aminés et deux extrémités amine (AT) et carboxyle cytoplasmiques (CT).

Le positionnement de trois cystéines dans les deux boucles extracellulaires est identique pour toutes les connexines sauf pour la Cx31. Elles sont responsables de la formation de ponts disulfures qui stabilisent les boucles et favorisent la juxtaposition des connexons de cellules adjacentes **(White et al., 1995)**. L'extrémité amine est de longueur similaire pour toutes les connexines, mais la différence majeure entre toutes les connexines réside principalement dans la longueur de la terminaison carboxyle et de la séquence en acides aminés qu'elle contient **(Evans and Martin, 2002)**.

La plupart des cellules et des tissus expriment plus d'un type de connexine. Les connexons peuvent donc être composés de six connexines identiques (homomériques) ou de connexines différentes (hétéromériques). Et en conséquence, la juxtaposition de deux connexons identiques forme un canal homotypique alors qu'il est hétérotypique si les connexons sont composés différemment (Figure 36) **(Laird, 2006)**.

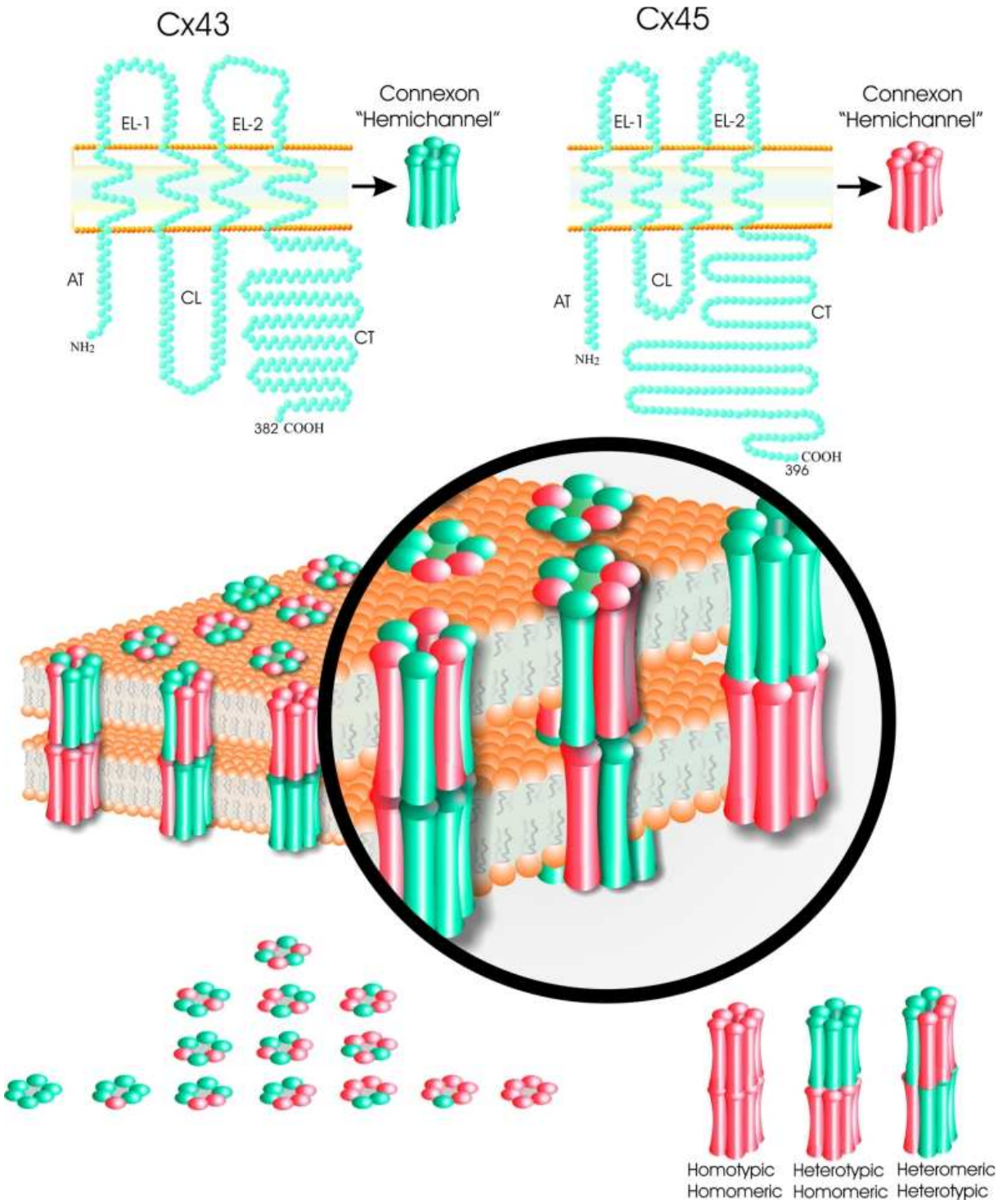


Figure 36: Structure et assemblage des connexines en jonctions gap. *La topologie des Cx43 et Cx45 permet de distinguer 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires (EL-1 et EL-2) et 3 domaines intracellulaires comportant une boucle (CL) et les deux terminaisons amine (AT) et carboxyle (CT). Six connexines s'oligomérisent en un connexon (hémicanal) qui est soit homomérique ou hétéromérique selon qu'il est composé de connexines identiques ou différentes. Les canaux intercellulaires qui en résultent sont soit homotypiques ou hétérotypiques par la juxtaposition de connexons identiques ou différents. Au total, ce sont ainsi 14 arrangements différents de connexons qui peuvent être formés par la seule présence de deux connexines différentes* ***(Laird, 2006)****.*

4.4 Biosynthèse et dégradation de jonction gap

La biosynthèse, l'assemblage et la dégradation des jonctions gap sont strictement contrôlés **(Musil et al., 2000)**.

Au cours de leur synthèse, les connexines sont intégrées dans le réticulum endoplasmique (RE). Puis l'oligomérisation de six connexines formant le connexon se produit progressivement dans le RE au cours de leur transfert jusqu'à l'appareil de Golgi **(Laird, 2006; Musil and Goodenough, 1993)**.

A la sortie de l'appareil de Golgi, les connexons sont portés à la surface cellulaire par des vésicules, guidées par des microtubules, qui fusionnent avec la membrane plasmique. Ces connexons peuvent ensuite soit former des canaux non jonctionnels (hémicanaux) soit diffuser librement vers les régions de contact intercellulaire et se juxtaposer à un connexon d'une cellule adjacente pour former un canal intercellulaire. Les canaux intercellulaires se regroupent ensuite en une plaque jonctionnelle. Progressivement, les canaux intercellulaires situés au centre de la plaque sont intériorisés en structures vésiculaires appelées « jonctions annulaires » qui sont dégradées par la voie lysosomale ou protéosomale.

La synthèse et la dégradation continues des connexines dont la demi-vie n'excède pas quelques heures (1,5 - 5 heures) permettent une modification rapide de la capacité de communication intercellulaire des tissus selon les conditions environnementales (Figure 37) **(Meşe et al., 2007)**.

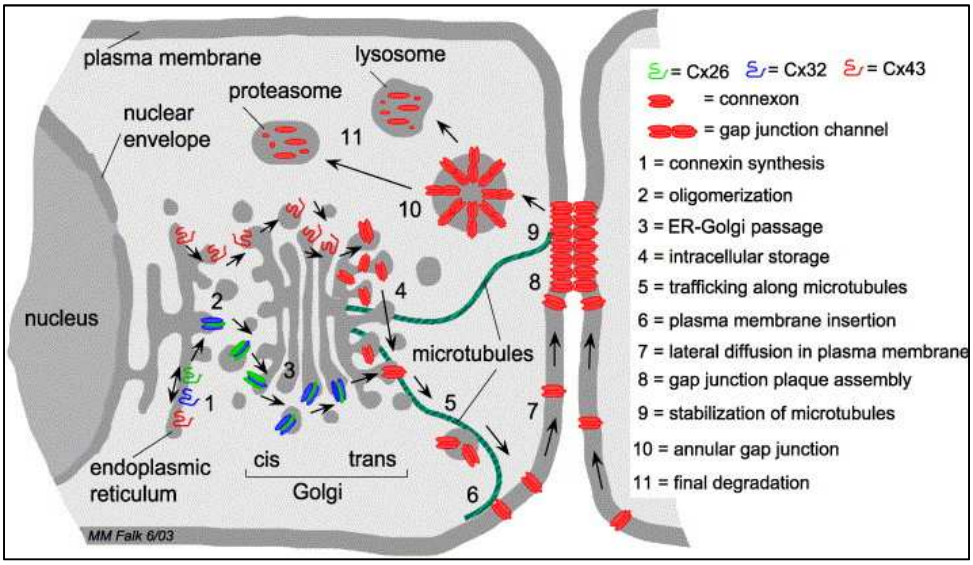


Figure 37: Représentation schématique des différentes voies de biosynthèse et de dégradation des jonctions gap *(Segretain and Falk, 2004)*.

4.5 Régulation fonctionnelle des jonctions communicantes

Le couplage électrique et métabolique qui résulte de la présence des jonctions gap permet de générer une réponse cellulaire synchrone (contractions synchrones des cardiomyocytes ou des cellules musculaires lisses). Cette perméabilité du canal jonctionnel peut être contrôlée par plusieurs facteurs tels que la concentration de calcium, le pH, le potentiel transmembranaire et la phosphorylation des connexines **(Pour revue Wei et al., 2004)**.

4.5.1 Sensibilité fonctionnelle

Le fait que la fermeture des canaux jonctionnels soit observée en présence de concentrations élevées de calcium suggère que cette communication peut être modulée par une variété de mécanismes cellulaires dépendants du calcium. En effet, il a été proposé que la calmoduline serve de médiateur pour le calcium en se liant à la Cx32 **(Hertzberg and Van Eldik, 1987)**. Ainsi, dans les ovocytes de Xénope, la diminution de calmoduline provoque une réduction de la sensibilité des jonctions gap à des taux élevés de calcium **(Peracchia et al., 1996)**.

Le pH intracellulaire est un autre facteur capable de moduler la perméabilité des jonctions gap. Il semble que la sensibilité au pH soit localisée au niveau des régions présentant peu

d'homologie entre les connexines telles que la boucle intracellulaire et les domaines CT. Cela explique en partie pourquoi les canaux homotypiques et hétérotypiques présentent un degré de sensibilité variable à l'acidification intracellulaire **(Ek-Vitorín et al., 1996)**. Dans le cas de la Cx43, l'acidification intracellulaire entraîne la fermeture du canal par une région impliquant l'histidine 95 **(Morley et al., 1996)**.

La conductance des jonctions gap peut également être modulée par le potentiel transjonctionnel ou transmembranaire qui peut provoquer la fermeture des canaux constitués par la plupart des connexines (Par exemple : Cx26, Cx43, Cx47). La sensibilité des canaux diffère également selon leur composition en connexines ; les canaux hétérotypiques étant les plus sensibles **(Pour revue Wei et al., 2004)**.

4.5.2 Perméabilité sélective des jonctions gap

Initialement, les canaux intercellulaires formant les jonctions gap étaient décrits comme des canaux ayant des pores passifs non spécifiques, qui permettent librement le passage d'ions et de métabolites (<1,2 kDa). Plus tard, des études ont montré que les canaux formés par différentes connexines sont uniques en termes de conductance, d'ouverture du canal et de perméabilité à certaines molécules. De plus, l'association de pathologies à des mutations de gènes de connexines spécifiques souligne l'unicité des capacités fonctionnelles des connexines **(Meşe et al., 2007)**.

Certaines approches ont ainsi permis de démontrer que la perméabilité des connexons varie selon leur composition en connexines. Par exemple, l'utilisation de liposomes chargés d'AMPc et de GMPc, et dont la membrane contenait soit des connexons homomériques (Cx32) soit hétéromériques (Cx32/Cx26), a démontré que les connexons homomériques (Cx32) sont également perméables à l'AMPc et au GMPc. En revanche, les connexons hétéromériques (Cx32/Cx26) se sont avérés plus perméables au GMPc qu'à l'AMPc (Figure 38 a) **(Bevans et al., 1998)**.

Dans une autre étude, il a été montré que la perméabilité à l'adénosine des connexons de Cx32 était environ 12 fois supérieure à celle des connexons de Cx43. Mais cette perméabilité

est inversée lorsque l'adénosine est phosphorylée. Les connexons constitués de Cx43 sont alors plus perméables que les connexons de Cx32 d'un facteur 8 pour le transfert d'AMP et d'ADP, voire d'un facteur 300 pour celui de l'ATP (Figure 38 b). Cela suggère que le niveau de phosphorylation de l'adénosine déplace sa perméabilité sélective des canaux de Cx32 vers ceux de Cx43. Cela suggère également que le statut énergétique d'une cellule pourrait être contrôlé via l'expression des connexines et la formation de jonctions gap **(Goldberg et al., 2002)**.

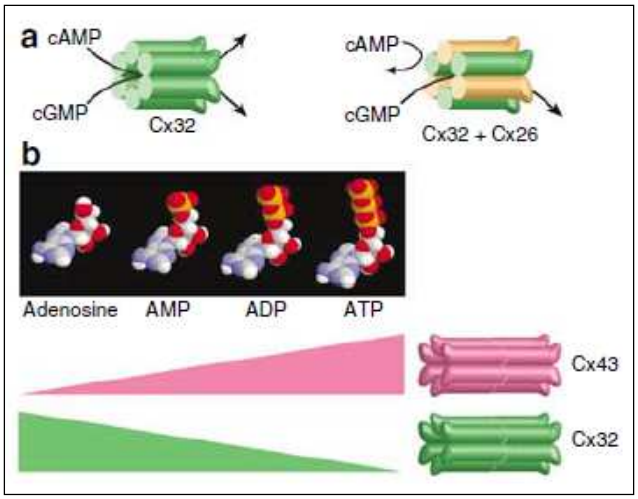


Figure 38: Perméabilité sélective des jonctions gap aux seconds messagers. *a) Les connexons homomériques constitués de Cx32 sont perméables de façon équivalente à l'AMPc et au GMPc alors que les connexons hétéromériques (Cx32/Cx26) sont davantage perméables au GMPc qu'ils ne le sont à l'AMPc. b) L'ajout de groupes phosphates supplémentaires à l'adénosine modifie son transfert par les canaux jonctionnels. Ainsi, si les canaux formés par la Cx32 sont plus perméables à l'adénosine que les canaux formés par la Cx43, ils le sont moins pour l'AMP, l'ADP et l'ATP* ***(Meşe et al., 2007).***

4.5.3 Partenaires protéiques et phosphorylation des connexines

Au cours des dernières décennies, il est apparu que les connexines interagissent avec un large éventail de protéines intracellulaires et membranaires et qu'elles sont capables de former des complexes multiprotéiques. Ces interactions ont des répercussions sur la régulation fonctionnelle des connexines aussi bien aux niveaux physiologique que pathologique **(Kar et al., 2012)**.

- **Interactions avec les protéines de jonctions serrées :**

La première protéine qui s'est avérée interagir avec une connexine est la protéine ZO-1 (Zonula Occludens 1). Initialement, cette interaction fut décrite avec la Cx43 **(Giepmans and Moolenaar, 1998)** puis a été ensuite étendue, par l'analyse de leur domaine C-ter, à toutes les connexines humaines, exceptées les Cx30, Cx30.3, Cx31.1, Cx32, Cx62 **(Giepmans, 2004)**. ZO-2, similaire à ZO-1, est aussi capable d'interagir avec la Cx43. Il semblerait que ces protéines se lient à la Cx43 durant la phase G0 du cycle cellulaire et stabilisent les jonctions gap. Ces interactions s'établissent entre l'extrémité du domaine C-ter de la connexine et le second domaine PDZ de ZO-1/2 (Singh et al., 2005). De plus, il est possible que ZO-1 ait un rôle de protéine d'échafaudage **(Pour revue Wei et al., 2004)**.

- **Interactions avec les protéines des jonctions adhérentes :**

Certaines connexines interagissent également avec les protéines impliquées dans la reconnaissance intercellulaire et associées au cytosquelette telles que les cadhérines et les caténines. Une conséquence de cette interaction est que l'inhibition fonctionnelle des cadhérines peut perturber la formation des jonctions gap. Et inversement, l'inhibition de l'expression de la Cx43 bloque la formation des jonctions adhérentes **(Meyer et al., 1992)**. La β-caténine interagit aussi avec la Cx43 dans les myocytes cardiaques de rat et favorise son adressage membranaire par la formation d'un complexe Cx43/ ZO-1/ β-caténine/ α-caténine **(Wu et al., 2003)**.

- **Interactions avec les protéines du cytosquelette :**

La Cx43 interagit avec l'α-spectrine (protéine de liaison à l'actine) via ZO-1 générant ainsi des jonctions gap fonctionnelles dans les myocytes cardiaques **(Toyofuku et al., 1998)**. Elle interagit également avec les microtubules afin de permettre un point d'ancrage entre les jonctions gap et les jonctions adhérentes ou pour réguler l'expression et la distribution de la Cx43 via la voie de signalisation des intégrines **(Giepmans et al., 2001)**.

- **Interaction avec les protéines kinases et phosphorylation**

Les connexines interagissent avec plusieurs kinases telles que la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la kinase P34cdc2/ cycline B, la caséine kinase 1, la kinase Src et la kinase activée par le mitogène (MAPK). Toutes ces kinases sont capables de phosphoryler les connexines et d'entraîner, par changement conformationnel, une altération de la

communication jonctionnelle, parfois en provoquant la translocation de la connexine dans le cytoplasme. Au moins 9 connexines (Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 et Cx56) se sont révélées être des phosphoprotéines dont les sites de phosphorylation peuvent être multiples **(Ahir and Pratten, 2015)**. Ainsi, la Cx43 est phosphorylable au niveau de 12 sérines et de 2 tyrosines localisées dans la portion cytosolique de son domaine C-ter (Figure 39) **(Lampe and Lau, 2004)**.

Ces phosphorylations modulent la perméabilité des canaux intercellulaires des jonctions gap et donc le couplage électrique et métabolique. Mais il apparaît qu'elles interviennent aussi dans la régulation de toutes les étapes du cycle de vie des connexines telles que leur adressage membranaire, leur assemblage en plaques jonctionnelles, leur désassemblage et leur dégradation.

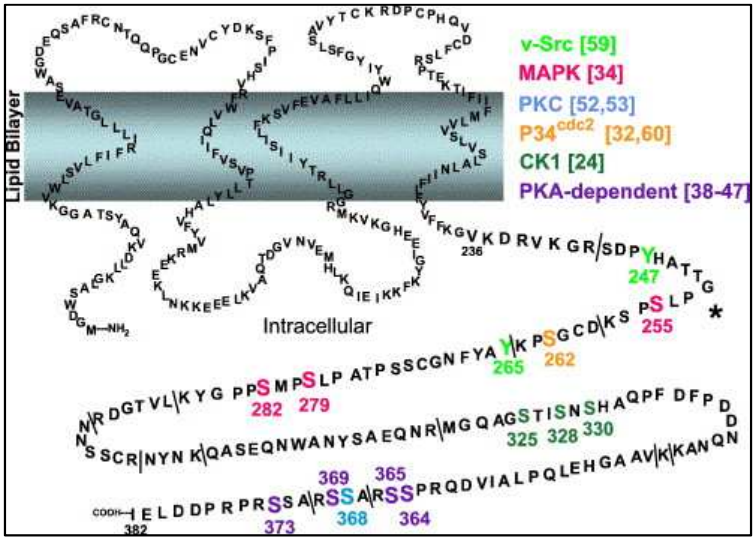


Figure 39: Les différents sites de phosphorylation présents dans le domaine C-terminal de la Cx43. *Les sites de phosphorylation ciblés par des kinases connues sont indiqués par différentes couleurs (Src : vert, MAPK : rouge, PKC : bleu, P34cdc2 : orange, CK1 : vert foncé, PKA : violet)* ***(Lampe and Lau, 2004)***.

4.6 La fonction hémicanal

Historiquement, les études fonctionnelles des connexines ont porté sur leur rôle dans l'établissement du couplage intercellulaire par la formation de jonctions gap. Mais depuis les années 1990, des études ont révélé que les connexines peuvent former des hémicanaux (connexons) fonctionnels sans être juxtaposés aux connexons d'une cellule adjacente et donc

sans former de jonctions gap **(Sinyuk et al., 2018a)**. Bien que ces hémicanaux soient normalement fermés pour éviter le passage direct de molécules entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire, des conditions spécifiques (par exemple, la concentration calcique, l'état de phosphorylation, la composition ionique du milieu extracellulaire, le potentiel membranaire, le pH intracellulaire, une stimulation mécanique) permettent leur ouverture. L'existence et l'ouverture d'hémicanaux constitués de Cx43 ont été démontrées par l'absorption cellulaire de carboxyfluorescéine suite à la diminution de la concentration calcique extracellulaire **(Li et al., 1996)**. Même si les stimuli d'ouverture et de fermeture des canaux diffèrent selon qu'il s'agisse d'hémicanaux ou de canaux intercellulaires, il est intéressant de noter que les caractéristiques de conductance et de perméabilité des hémicanaux sont très similaires à celles des canaux des jonctions gap (Figure 40).

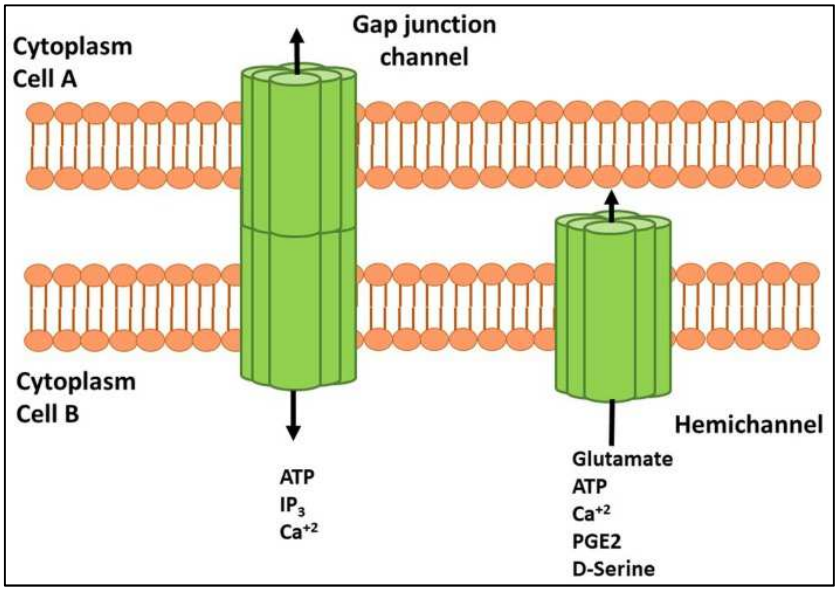


Figure 40: Représentation schématique et perméabilité des canaux intercellulaires et des hémicanaux formés de connexines (Mayorquin et al., 2018).

L'ouverture d'hémicanaux de différentes connexines (Cx46, Cx44, Cx56, Cx30, Cx32, Cx35, Cx52.6) a été décrite, après injection de leur ARNm, dans des oocytes de Xénope. De telles approches ont montré, particulièrement pour la Cx46 que les oocytes se détériorent rapidement dans ces conditions à moins qu'une concentration élevée du calcium

extracellulaire ne maintienne l'hémicanal fermé **(Pour revue Sinyuk et al., 2018a)**. Depuis ces observations, il apparaît que l'ouverture des hémicanaux pendant de courtes périodes et permettant l'échange de molécules entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire peut jouer un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.

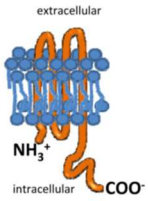
Les hémicanaux sont fermés par les mêmes composés capables d'inhiber la communication jonctionnelle comme l'heptanol, l'octanol, l'halothane, le carbénoxolone, l'acide 18-glycyrrhétinique, divers acides gras et l'acide filfénamique (FFA). Tous ces composés présentent cependant une faible spécificité puisqu'ils peuvent fermer d'autres canaux ioniques. En revanche, les peptides mimétiques de connexines conçus pour imiter des parties de la boucle extracellulaire de connexines étaient initialement considérés comme étant des inhibiteurs plus spécifiques des hémicanaux. Mais des études ont montré qu'ils pouvaient agir également sur d'autres canaux tels que ceux constitués, par exemple, de pannexines **(Nielsen et al., 2012)**.

4.7 Fonctions physiologique et physiopathologique des connexines

Les connexines semblent cumuler plusieurs types de fonctions soit en permettant une communication intercellulaire (jonction gap), une communication entre les domaines extracellulaire et intracellulaire (fonction hémicanal) ou un contrôle de voies de signalisation par interaction directe avec des partenaires cytoplasmiques ou membranaires (Figure 41) **(Sinyuk et al., 2018a)**.

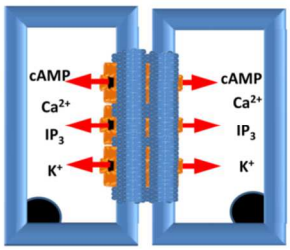
Ainsi, en tant que médiateurs de la communication jonctionnelle, les connexines sont impliquées, par exemple, dans le couplage électrique permettant des activités coordonnées et rapides telles que la contraction des muscles lisse et cardiaque, et la transmission des signaux neuronaux par des synapses électriques. De plus, les jonctions gap jouent un rôle dans le développement embryonnaire, le maintien de l'homéostasie, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire **(White and Paul, 1999)**.

Connexin



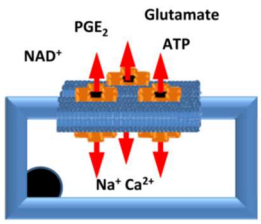
Role	Organ
Cell death	Brain, Inner ear, Kidney, Liver
Differentiation	Bone, Brain, Inner ear, Heart, Ovary, Lung, Liver
Proliferation/ survival	Brain, Bone, Heart, Lens, Ovary, Testis, Liver

Gap junction Channels



Role	Organ
Ionic conduction	Brain, Inner ear, Heart, Kidney, Lens, Lung, Liver
Metabolic coupling	Brain, Lens, Liver
2nd Messenger diffusion	Inner ear, Ovary, Lung, Liver

Hemichannels



Role	Organ
Injury protection	Heart
preconditioning	Brain, Heart
Extracellular cell signaling	Bone, Brain, Kidney, Ovary, Lung, Liver
Mechanical stimulation response	Bone, Ovary

Figure 41: Les différents rôles physiologiques des connexines en tant que médiateurs de la communication jonctionnelle ou en tant qu'hémicanaux dans divers organes *(Kar et al., 2012)*.

Ces différents rôles physiologiques peuvent être appréhendés par des stratégies expérimentales visant à supprimer l'expression de connexines particulières dans des souris transgéniques. Ainsi, par exemple, la suppression du gène codant pour la Cx43 entraîne chez la souris une obturation du tronc pulmonaire due à un retard de migration des cellules de la crête neurale provoquant une mortalité périnatale par cyanose **(Ahir and Pratten, 2015)**.

L'identification des gènes de connexines a permis de dévoiler leur implication dans différentes pathologies humaines héréditaires. C'est ainsi que des mutations affectant les gènes de connexines se sont révélées avoir des conséquences sur la capacité de formation d'hémicanaux ou de jonctions gap. Ces mutations peuvent avoir des effets divers sur les connexines en agissant sur leur dégradation, leur demi-vie, leurs interactions avec des partenaires protéiques ou sur la perméabilité des pores des canaux ou hémicanaux, etc.

(Sinyuk et al., 2018b). De telles mutations de connexines et leurs effets ont été ainsi identifiées dans des pathologies humaines variées, telles que le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (Cx32), des surdités héréditaires liées ou non à des hyperkératinisations cutanées (Cx26 ; Cx30), des cataractes héréditaires (Cx46 ; Cx50) ou la dysplasie occulodentodigitale (Cx43) **(Kar et al., 2012)**. L'accumulation des données aussi bien expérimentales que médicales a montré que les connexines ont des fonctions physiologiques et des effets physiopathologiques très divers (Tableau 4).

Tableau 4: Fonctions physiologiques et physiopathologiques des connexines *(d'après (Kar et al., 2012))*. Les connexines notées en rouge sont la cause d'effets physiopathologiques suite à leur dysfonctionnement.

Organes	Connexines	Fonctions physiologiques	Effets Physiopathologiques
Cœur	Cx40, **Cx43**, Cx45	Morphogenèse cardiaque	Malformation cardiaque Hétérotaxie vicéroatriale Syndrome hypoplasique
Oreille interne	Cx26, Cx30, Cx31, Cx32, Cx43	Recirculation de K+, passage d'IP3	Surdité
Rein	Cx26, Cx30, Cx30.1, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46	Conduction vasculaire	Augmentation de pression
Cristallin	Cx43, **Cx46**, **Cx50**	Maintien de la transparence	Cataracte congénitale du cristallin
Foie	**Cx32**, **Cx26**, Cx37, Cx40, Cx43	Régulation de l'homéostasie des hépatocytes	Hépatotoxicité
Poumon	Cx26, Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx46	Régulation du signal calcique Améliore la barrière pulmonaire	Fibrose pulmonaire
Sein	Cx26, Cx43 + Cx30 et Cx32 chez les souris	Différenciation et maintien d'homéostasie des glandes mammaires Production, sécrétion du lait	Défaut d'éjection du lait Inhibition de sécrétion de la protéine du lait
Système nerveux	Cx26, Cx30, **Cx32**, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45	Neurogenèse, migration cellulaire, développement neuronal différenciation et morphogenèse	Syndrome de Charcot-Marie-Tooth
Os	**Cx43**, Cx45, Cx46	Développement, différenciation et remodelage de l'os	Anomalie craniofaciale, syndactylie des mains et pieds et hypoplasie
Testicule	Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx32, Cx33, Cx37, Cx40, **Cx43**, Cx46, Cx50	Spermatogenèse	Arrêt de la spermatogenèse, syndrome de cellule de Sertoli
Ovaire	Cx32, **Cx37**, **Cx43**, Cx45	Folliculogenèse, arrêt de la mitose et l'apoptose de gonade	Infertilité

En plus des différentes pathologies héréditaires associées à des mutations affectant les gènes de connexines, les connexines ont longtemps été associées par leur dysfonctionnement au développement de cancers.

4.8 Connexine, cancer et Bisphénol A

4.8.1 Connexine et cancer

Les jonctions gap et les connexines par leur fonction de communication intercellulaire ont été très vite associées à la problématique du cancer dont le développement semble être la conséquence d'une altération de l'homéostasie **(Kotini and Mayor, 2015)**. Les premières études ayant révélé que les cellules de cancer du foie sont dépourvues de communication jontionnelle suggérait que celles-ci pouvaient avoir une action anti-tumorigènique **(Loewenstein and Kanno, 1966)**. Par la suite, cette hypothèse a été confirmée par la transfection de gènes de connexine dans des cellules tumorales qui induisait dans la plupart des cas une diminution de la prolifération *in vitro* et *in vivo*. Cet effet a été observé dans différents types de cellules provenant d'hépatome humain transfectées avec la Cx32 **(Eghbali et al., 1991)**, de gliome de rat ou de fibroblastes de souris transformés chimiquement transfectées avec la Cx43 **(Naus et al., 1992; Rose et al., 1993)**. Par ces approches, il semblait que les connexines ont une action anti-proliférative en régulant le cycle cellulaire **(Zhang et al., 2001)**. Mais cette action semble dépendre à la fois du type de connexine et du type cellulaire. En effet, lorsque des cellules HeLa n'exprimant pas de connexines ont été transfectées avec un ADNc de Cx26, Cx32, Cx40 ou Cx43, seule l'expression de la Cx26 était capable d'inhiber la tumorigénicité de ces cellules. Ce résultat suggère que la diminution de la prolifération cellulaire n'est pas la conséquence d'un simple rétablissement de la communication jonctionnelle mais dépend plutôt du type de connexine exprimé **(Mesnil et al., 1995)**. Plus précisément, il semblerait que l'action suppresseur de tumeur ne peut être induite par un type de connexine que s'il s'agit de la connexine normalement exprimée dans le tissu d'origine de la tumeur.

En relation avec ces données expérimentales, les études réalisées *in situ* démontrent que la progression tumorale coïncide avec une altération de localisation ou d'expression des connexines entrainant une altération de la communication jonctionnelle. Par exemple, une

étude réalisée sur les carcinomes hépatocellulaires humains montre que les connexines Cx32 et Cx26, présentes dans les hépatocytes, sont localisées dans le cytoplasme des cellules cancéreuses avec la Cx43 qui est normalement absente **(Yamasaki, 1991)**. Une autre étude réalisée sur le carcinome de la peau de souris montre une colocalisation des Cx26 et Cx43 alors que celles-ci sont normalement exprimées dans des couches épidermiques différentes **(Kamibayashi et al., 1995)**.

L'implication concrète des connexines reste cependant difficile à mettre en évidence lors de la progression tumorale car elles semblent jouer un rôle contradictoire soit comme suppresseur de tumeur au stade précoce de la progression soit comme promoteur de tumeur aux stades plus tardifs, lors de l'invasion tumorale (Figure 42).

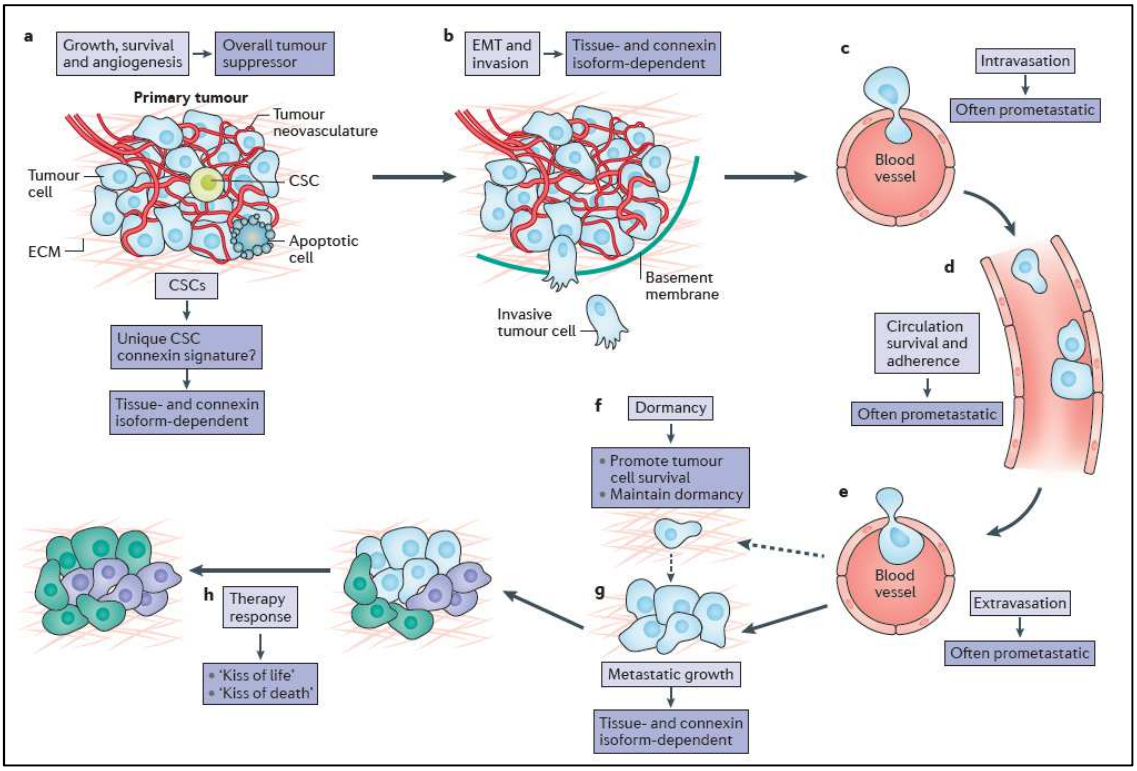


Figure 42 : Rôle des connexines dans la progression tumorale. *a) Au stade précoce du cancer, les connexines jouent un rôle de suppresseurs de tumeurs en inhibant la prolifération cellulaire. b) La transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion sont favorisées par la perte des connexines. c) Lors des métastases, l'expression de la connexine facilite l'intravasation. d et e) La surexpression de la connexine favorise l'extravasation des cellules tumorales. f) Les connexines favorisent la dormance et la survie des cellules tumorales dans le site métastatique. g) Dans les métastases, si les connexines réduisent la croissance, elles stimulent l'invasion locale. h) La chimiorésistance peut se réaliser via les connexines exprimées par les cellules tumorales interagissant avec leur microenvironnement en permettant la diffusion intercellulaire de la toxicité du traitement* ***(Aasen et al., 2016)****.*

En effet, des données plus récentes suggèrent que la réexpression des connexines à des stades tardifs de la progression tumorale peut favoriser la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Cela a été particulièrement étudié dans les cellules de gliome où la surexpression de la Cx43 augmente la mobilité cellulaire et la capacité d'invasion de ces cellules **(Bates et al., 2007)**. Il est à noter que cet effet de la Cx43 ne serait pas seulement pathologique puisqu'il a été observé que celle-ci favorise la migration des cellules de la crête neurale pendant l'embryogenèse **(Huang et al., 1998)**. D'autres indices suggèrent que la Cx43 est associée au processus d'invasion. Ainsi, il semblerait que son expression est corrélée à celle de Snail-1, un facteur de transcription qui réprime la E-cadhérine et favorise les transitions épithélio-mésenchymateuses, prémices du caractère invasif de ces cellules **(Ryszawy et al., 2014)**. De plus, la surexpression de la Cx43 améliore l'adhérence des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales du poumon nécessaire au processus d'intravasation menant au développement de métastases **(Elzarrad et al., 2008)**.

Par leur extrémité C-ter ou par leur fonction de communication, les connexines ont des effets suppresseurs de tumeurs en diminuant la croissance tumorale. Et inversement, elles peuvent être promotrices de tumeurs, à des stades plus tardifs en favorisant l'adhérence et l'invasion des cellules cancéreuses (Figure 43) **(Wu and Wang, 2019)**.

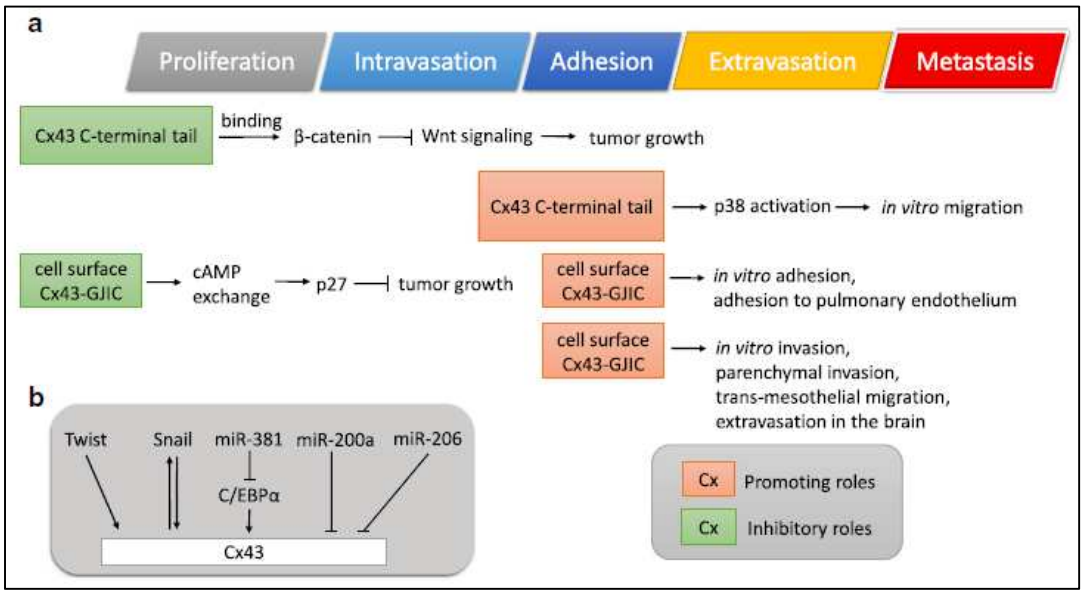


Figure 43 : Rôle fonctionnels et circuits régulateurs de la Cx43 dans la progression tumorale. *a) Le rôle des effets de la terminaison carboxyle de la Cx43 ou de sa fonction de jonctions gap (GJIC) dans la formation des métastases. b) Les facteurs de transcription et microARNs impliqués dans la régulation de l'expression de la Cx43* ***(Wu and Wang, 2019)***.

4.8.2 Connexines et système nerveux central

4.8.2.1 Les connexines dans le cerveau

Dans le cerveau des mammifères, au moins dix types de connexines sont exprimés. Les neurones expriment sept connexines différentes (Cx30.2, Cx31.1, Cx32, Cx36, Cx40, Cx45, Cx50), les astrocytes trois (Cx43 la plus abondante, Cx30, Cx26) tout comme les oligodendrocytes (Cx32, Cx29, Cx47), la microglie (Cx43, Cx32, Cx36) et les cellules endothéliales (Cx37, Cx40, Cx43). Toutes ces connexines jouent un rôle différent au sein de chaque type cellulaire et leur expression varie au cours du neurodéveloppement et lors des lésions cérébrales **(Belousov et al., 2017)**.

Dans le système nerveux central (SNC), les jonctions gap permettent le contrôle de l'activité glutamatergique indirectement par la génération de courants potassiques, la propagation lente de courant calcique et régulent la transmission synaptique à travers l'activité des astrocytes. Quant aux hémicanaux, ils permettent la plasticité synaptique, contrôlent la libération de manière paracrine et autocrine des gliotransmetteurs synaptiques tels que le glutamate et aussi l'ATP (Figure 44) **(Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018)**.

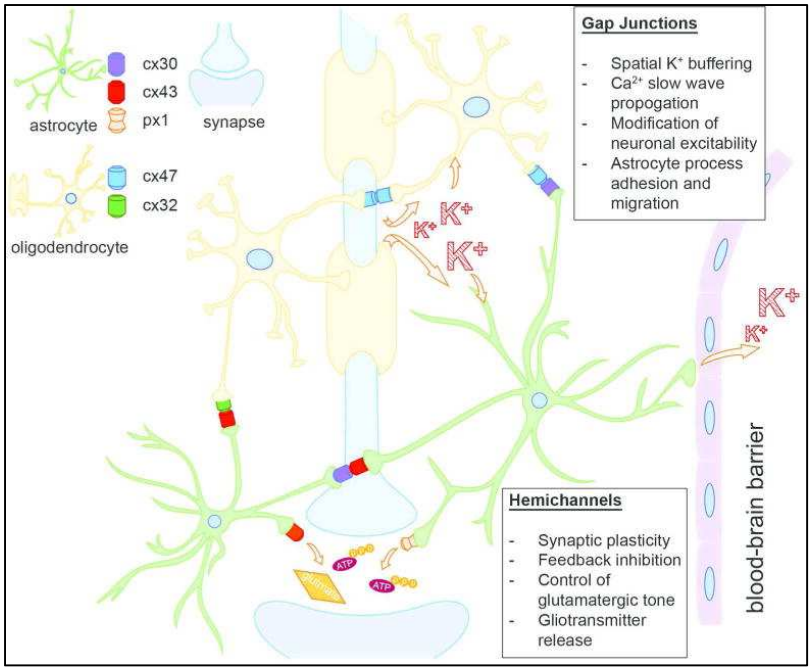


Figure 44 : L'expression des différentes connexines dans le réseau glial *(Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018)*.

4.8.2.2 Connexines et gliome

Plusieurs études ont montré une corrélation inverse entre l'expression de la Cx43 et le grade des tumeurs cérébrales que sont les gliomes **(Huang et al., 1999; Soroceanu et al., 2001)**. En effet, de nombreuses lignées cellulaires dérivées de gliome, y compris la lignée C6 de rat, présentent une expression réduite de la Cx43 par rapport aux astrocytes normaux (Naus et al., 1991). Mais plusieurs études ont impliqué le rôle de la Cx43 dans la motilité cellulaire **(Lin et al., 2002; Shao et al., 2005)**. Et de fait, dans le contexte de gliomes, les études sur la Cx43 ont montré une corrélation positive entre l'expression de la Cx43 et la capacité de migration ou d'invasion **(Lin et al., 2002; Oliveira et al., 2005)**. De même, une étude réalisée sur les cellules U251 de glioblastome humain a montré que la Cx43 diminue la croissance tumorale alors qu'elle favorise la migration et inhibe l'apoptose via une voie associée aux mitochondries (Lu et al., 2017).

Ce double effet de la Cx43, suppresseur de tumeur et promoteur de la migration cellulaire semble confirmer la théorie « go or grow » selon laquelle les cellules exprimant la Cx43 migrent sans proliférer. L'expression de la Cx43 est hétérogène dans les glioblastome et reflète l'hétérogénéité cellulaire qui caractérise effectivement ces tumeurs dont certaines cellules exprimant la Cx43 migrent et d'autres n'exprimant pas la Cx43 prolifèrent (Sin et al., 2012). En plus d'une hétérogénéité d'expression, on assiste aussi à une hétérogénéité de localisation de la Cx43 parfois aberrante (cytoplasmique et/ou nucléaire) et associée à l'activité de kinases telles que Scr ou la PKC **(Kirichenko et al., 2017)**.

En injectant des cellules de gliome (C6-Cx43) dans des cerveaux de souris, il a été montré que la Cx43 permettait aux cellules de gliome de former des jonctions gap avec les astrocytes de l'hôte. Il s'est avéré par cette étude que les cellules de gliome exprimant la Cx43 se disséminaient librement dans le parenchyme cérébral, probablement par l'établissement d'une communication jonctionnelle avec les astrocytes, alors que les cellules de gliome déficientes en Cx43 migraient principalement le long des capillaires et des vaisseaux sanguins **(Lin et al., 2002)**. Quoiqu'il en soit, les cellules de gliome ne parviennent pas à franchir la barrière hématoencéphalique contrairement aux cellules de carcinomes dont la présence de

métastases dans le cerveau semble être la conséquence de l'établissement de jonctions gap entre elles et les cellules endothéliales **(Uzu et al., 2018)**.

Vue l'implication de la Cx43 dans l'expansion des gliomes, il a été suggéré que l'utilisation de peptides mimétiques de Cx43 seraient prometteurs sur le plan thérapeutique et permettrait de contourner la chimiorésistance caractéristique des glioblastomes aux traitements chimiothéapeutiques classiques **(Grek et al., 2018)**.

4.8.3 Connexine et Bisphénol A

Comme cela a été démontré expérimentalement, le BPA, perturbateur endocrinien potentiellement cancérigène, a la capacité d'altérer la communication jonctionnelle. Une étude a montré que le BPA augmente la prolifération de cellules cutanées tout en inhibant la communication jonctionnelle due à la présence de Cx26 **(Zhang et al., 2019)**.

Le fait que le BPA pourrait favoriser la prolifération cellulaire en inhibant la communication jonctionnelle sans altérer l'expression des connexines est en partie confirmé par une autre étude réalisée sur des follicules ovariens de souris. En effet, cette étude a montré que le BPA accélère la progression de la méïose, conduisant à une transition altérée de la prophase I à la métaphase II, et que cet effet est corrélé à une communication bidirectionnelle réduite dans le complexe cellule-ovocyte de cumulus sans modification de l'expression des Cx43, et Cx37 (Acuña-Hernández et al., 2018).

PARTIE 2 : CONTEXTE ET OBJECTIFS

Contexte

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé un modèle de cellules de glioblastome humain, les cellules U251, qui présentent des capacités migratoires et invasives importantes tout en exprimant la Cx43.

Dans un premier temps, des études précédentes réalisées dans le laboratoire avaient permis de mettre en place des clones de cellules U251 dont l'expression de la Cx43 était diminuée à l'aide de shRNA dirigés soit contre la boucle intracellulaire (clone shRNA 1) soit contre l'extrémité carboxyle de la Cx43 (clone shRNA 2). Ces clones, shRNA 1 et shRNA 2, présentaient effectivement des taux réduits d'expression de la Cx43 aussi bien au niveau de l'ARNm (34,6 ± 4,8% ; 57,2 ± 4,5% de réduction d'expression, respectivement) qu'au niveau protéique (39,1 ± 3,0% ; 24,7 ± 1,9% respectivement) sans pour cela modifier la localisation membranaire et cytoplasmique de la connexine qui restait similaire à celle des cellules témoins (mock). Cependant, associée à la réduction d'expression de la Cx43, la communication intercellulaire par jonction gap (CIJG) était diminuée significativement dans les clones shRNA (environ 66% de diminution) **(Strale et al., 2012)**. Dans cette étude visant à caractériser le phénotype des clones shRNA par rapport aux cellules témoins (mock), il s'est avéré que la diminution d'expression de la Cx43 était corrélée à une augmentation de la capacité de migration 2D (wound healing), à une diminution de celle de l'invasion des cellules U251, et ceci, à la fois, *in vitro* (chambres de Boyden en présence de Matrigel) et *ex vivo* (estimation de la capacité d'invasion des cellules U251 sur coupes de cerveaux de souris).

Dans un second temps, sachant que les invadopodes sont des protrusions cellulaires facilitant l'invasion des cellules cancéreuses au sein du tissu sain environnant, nous avons étudié l'implication de la Cx43 dans la formation, la maturation et la fonction de ces structures en utilisant les cellules U251 (mock et shRNA) comme modèle. A l'aide d'approches variées permettant d'évaluer l'implication des différentes fonctions assurées par la Cx43 (CIJG, hémicanal, protéine d'échafaudage ou de liaison au sein des radeaux lipidiques), nous avons pu montrer que celle-ci favorise la formation, la maturation et la fonction des invadopodes **(Chépied et al., soumis)**.

L'exposition à des polluants environnementaux est un véritable problème de santé publique. L'un de ces polluants, le Bisphénol A (BPA) est retrouvé dans de nombreux produits manufacturés (hygiéniques, alimentaires, automobile, etc.), et son exposition peut être effectuée par voies cutanée, orale et /ou respiratoire **(Kamrin, 2004)**. De plus, cette molécule est à l'origine de dérivés chlorés retrouvés dans l'eau de boisson (eau du robinet) suite au traitement de l'eau par chloration au niveau des stations d'épuration. Ces différents dérivés chlorés du BPA ont été retrouvés non seulement dans l'environnement mais également en quantité importante dans des fluides (urines, colostrum) et tissus humains. Ces sous-produits de chloration du BPA (mono- ; 2,2'di- ; 2,6 di- ; tri- et tétra-chlorés) auraient des activités œstrogéniques 100 fois supérieures à celles du BPA lui-même **(Bacle et al., 2016; Rouillon et al., 2015)** dont l'impact sanitaire reste méconnu.

Le BPA, connu pour affecter la CIJG (Zhang et al., 2019), et ses dérivés chlorés sont des perturbateurs endocriniens. Au laboratoire, nous avons donc choisi d'exposer des femelles gravides (WT, fécondées par des mâles $Cx43^{+/-}$) au BPA et à ses dérivés chlorés afin d'en tester les conséquences, durant la gestation, sur la progression tumorale et plus spécifiquement sur la capacité d'invasion des cellules de glioblastome. A cette fin, différents traitements ont été testés telles que 5 conditions d'exposition au BPA ou à ses dérivés chlorés, de façon séparée, et 4 conditions permettant l'exposition à différents cocktails (C+D, C+E, D+E ou C+D+E). Les molécules utilisées seront notées BPA, molécule B (2-chloro-4-[1-(4-hydroxy-phényl)-1-méthyléthyl]-phénol), molécule C (2,6-dichloro-4-[1-(4-hydroxy-phényl)-1-méthyl-éthyl]-phénol), molécule D (2-chloro-4-[1- (3-chloro-4-hydroxy-phényl)-1-méthyl-éthyl]-phénol) ou molécule E (2,6-dichloro-4-[1-(3-chloro-4 hydroxyphényl)-1-méthyl-éthyl]-phénol).

Des études de survie de la génération F1 exposée aux perturbateurs endocriniens ont mis en évidence un pourcentage de survie beaucoup plus faible pour les animaux exposés aux molécules C, D et E, par rapport aux souris non traitées (Figure 48). Nous avons donc fait le choix dans cette étude de nous concentrer, en premier lieu, sur les effets des molécules di-chlorés du BPA (C et D) ainsi que sur ceux de leur mélange (C+D).

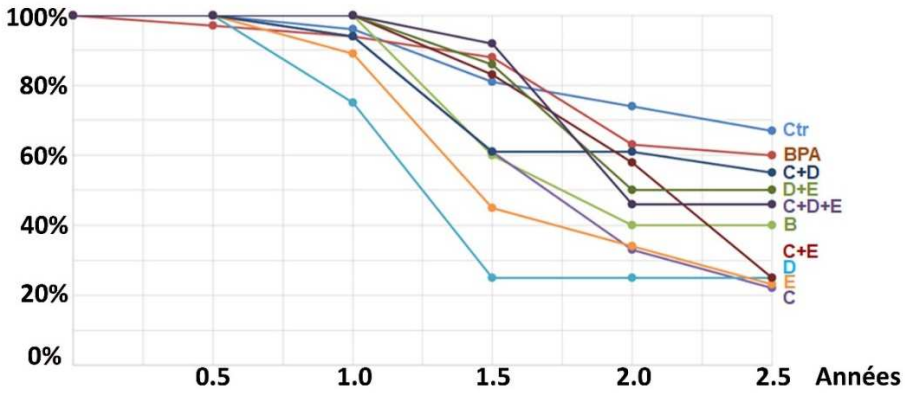


Figure 45 : Pourcentage de survie des souris F1 après exposition au BPA et ses dérivés chlorés durant la gestation et la lactation.

Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'implication de la Cx43 dans le dialogue pouvant s'établir entre les cellules de glioblastome et les astrocytes du microenvironnement et ses conséquences sur les capacités d'invasion tumorale.

L'ensemble des expériences réalisées au cours de ce projet a porté sur l'estimation des capacités migratoires et invasives des cellules U251 lorsque celles-ci sont cultivées en présence du milieu de culture d'astrocytes à J8, milieu utilisé comme modèle de microenvironnement tumoral. Les modulations du microenvironnement ont été réalisées par (**1**) l'exposition *in-utero* à faible dose au BPA et à ses dérivés chlorés durant la gestation et la lactation des souriceaux d'où proviennent les astrocytes utilisés ensuite en culture primaire et (**2**) par la différence d'expression de la Cx43, dans ces mêmes astrocytes, en utilisant des souris hétérozygotes $Cx43^{+/-}$ ou sauvages (les souriceaux homozygotes $Cx43^{+/-}$ ne sont pas viables après la naissance). Etant donné que les interactions entre le microenvironnement et les cellules cancéreuses influent fortement sur la progression tumorale, il est donc important d'étudier l'impact et l'apport du microenvironnement dans le processus invasif qui caractérise tant les cellules de glioblastome (cellules U251 exprimant différents niveaux d'expression de Cx43) en évaluant l'implication de la Cx43 par son niveau d'expression et sa fonction dans les astrocytes (cultures primaires) qui sont les cellules majoritaires du microenvironnement de ce type de tumeur.

PARTIE 3 : MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques

***In vitro* :** Les cellules U251 (commercialisées par ATCC) proviennent d'un glioblastome humain (gliome de grade IV selon la classification de l'OMS). Des clones exprimant des niveaux diminués de Cx43 ont été générés au laboratoire par sh-RNA à l'aide d'un vecteur lentiviral (Strale et al., 2012). Le clone obtenu par transfection d'un lentivirus ciblant la partie carboxy-terminale de la Cx43 (cellules U251 shRNA) a été pendant toute l'étude comparée à un clone « contrôle » (cellules U251 Mock) transfecté avec un lentivirus sans ciblage (vecteur vide). Ces clones, sélectionnés en présence de puromycine (1µg/mL, Sigma Aldrich), montrait clairement une différence d'expression de la Cx43 aussi bien au niveau de l'ARNm qu'à celui de la protéine.

***In vivo* :** Les souriceaux utilisés pour les cultures primaires d'astrocytes sont issus de croisements entre femelles sauvages pour la Cx43 ($Cx43^{+/+}$) de souche Swiss, âgées de 6 semaines (Janvier labs), et des mâles de même souche, hétérozygotes pour la Cx43 ($Cx43^{+/-}$; Jackson Lab) (Figure 45).
Toutes les procédures expérimentales sur les animaux ont été réalisées conformément aux recommandations de l'Union Européenne (2010/63/UE) en matière de soins et d'utilisation des animaux de laboratoire et conformes aux directives ethiques du ministère français de l'Agriculture et des forêts (Service vétérinaire pour la santé et la protection des animaux). Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique « COMETHEA n°84 » (n° 02.160).

2. Exposition des souris au BPA et à ses dérivés chlorés

Une semaine après fécondation des femelles $Cx43^{+/+}$ avec des mâles $Cx43^{+/-}$, les femelles sont exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés isolés (composés C ou D) ou mélangés (cocktail C+D). Ces traitements, à partir de solutions mères (200 mg/L) sont préalablement préparés dans l'huile, avec la condition contrôle (Ctr) composée d'un mélange d'huile et de méthanol (Tableau 5).

Tableau 5: Composition des différents traitements d'exposition des souris.

Ctr	2mL de méthanol	100mL d'huile
BPA	2mL de BPA	
C	2mL de C	
D	2mL de D	
C+D	1mL de C + 1mL de D	

Les femelles gravides sont injectées par voie intrapéritonéale tous les jours durant la gestation et pendant la lactation (J6) avec une dose journalière de 20 µg/kg/jour pour chaque traitement témoin (Ctr) (n=3), BPA (n=3), 3,3'-Dichlorobisphénol A (3,3'-DCBPA) (n=3) (composé C), 3,5-Dichlorobisphénol A (3,5-DCBPA) (n=3) (composé D) ou un mélange contenant 10µg/kg/jour de chaque composé (méalnge-DCBPA) (n=3) (composé C + D) (Figure 46). La salle de garde des animaux a été maintenue pendant 12 heures avec un cycle lumière/obscurité à 24,5 ± 0,5 °C.

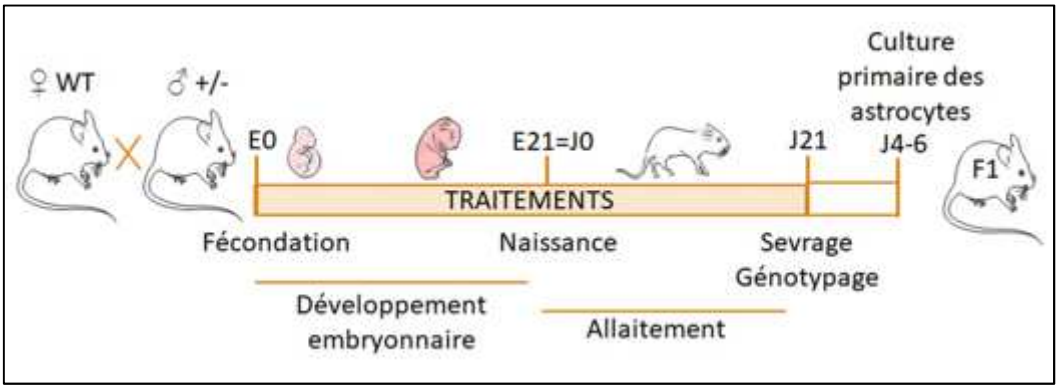


Figure 46: Représentation schématique des expositions des souris au BPA et à ses dérivés chlorés.

3. Culture primaire d'astrocytes

Récupération du cerveau

Les souriceaux âgés de 4 à 6 jours (J4-6) issus d'un croisement entre une femelle $Cx43^{+/+}$ et un mâle $Cx43^{+/-}$ sont sacrifiés pour la préparation des cultures primaires d'astrocytes. Afin de limiter les risques de contamination, la tête de chaque nouveau-né est plongée dans de l'éthanol iodé avant d'être coupée à l'aide d'un ciseau. Ensuite, la membrane protégeant le cerveau (boîte crânienne) ainsi que la peau sont sectionnées le long d'une ligne médiane depuis l'arrière de la tête en remontant vers le museau sans abîmer les tissus cérébraux. Le

cerveau récupéré est placé dans un tube contenant 3mL de milieu de culture et gardé à 4°C toute la nuit, le temps de réaliser le génotypage des souriceaux ($Cx43^{+/+}$ ou $Cx43^{+/-}$).

Génotypage

Le génotypage est réalisé pour déterminer le génotype de la génération F1 issue du croisement entre une femelle $Cx43^{+/+}$ (traitée ou non au BPA ou à ses dérivés chlorés) et un mâle $Cx43^{+/-}$.

Récupération des tissus des souriceaux à génotyper :

Les queues sont sectionnées et récupérées après la mise à mort de chaque souriceau puis placées dans un tube de 1,5mL afin de réaliser le génotypage.

Pour cela, les tissus sont lysés après ajout de 75µL d'une solution de lyse (NaOH 25Mm + EDTA dissodique 0,2mM ; pH=12) puis chauffés pendant 1h à 94°C afin d'en extraire l'ADN. Après lyse des tissus, les tubes sont placés au réfrigérateur (+4°C) pendant 15min pour refroidir les échantillons avant d'y ajouter une solution de neutralisation (TrisHCl 16mM ; pH=5) pour arrêter la lyse tissulaire.

RT- PCR :

Le mix (Access Quick™ RT-PCR system, Promega), préparé pour chaque échantillon, comporte 5µL de tampon (5X Green Go Taq® Flexi Buffer), 0,5µL de dNTP dilué au 1/10 (100mM dNTP set, Invitrogene), 1µL de chaque amorce [Cx43 sens (5'-CCCCACTCTCACCTATGTCTCC-3') et anti-sens (5'-ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC-3'), Neo sens (5'-GGCCACAGTCGATGAATCCAG-3') et anti-sens(5'-TATCCATCATGGCTGATGCAA-3')], 0,125µL GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (enzyme), 1µL de MgCl2 (25mM) et 9,375µL d'eau milli-Q.

Dans des tubes de 0,2mL sont ajoutés 20µL du mix et 5µL d'ADN d'échantillon à génotyper puis les tubes sont placés dans l'appareil de PCR (Applied Biosystem). L'appareil est programmé pour 1 cycle (1min à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1min à 72°C) et est lancé pour une durée de 1h33min (30 cycles).

Électrophorèse sur gel d'agarose :

Le gel est préparé à l'aide de 1,5% d'agarose dilué dans une solution de TBE 0,5X (Tris-borate-EDTA) et dans laquelle sont ajoutés 10µL (pour 200mL de gel) de DNA Stain (Eurodemex) permettant un marquage fluorescent de l'ADN.
La migration est réalisée en déposant 12µL d'échantillon par puits et en appliquant une tension de 100V pendant 20min. L'ADN fluorescent est révélé, sous forme de bandes, par exposition à une lampe de lumière ultra-violette (UV).

Mise en culture des astrocytes

Le cerveau des souriceaux accompagné des 3mL du milieu de culture sont transférés dans une boîte de pétri. Le cerveau est ensuite sectionné en faisant en sorte de ne garder que les 2 hémisphères cérébraux et éliminer les autres parties telles que le tronc cérébral, le cervelet et les bulbes olfactifs. Les deux hémisphères cérébraux récupérés sont alors rincés avec le milieu de culture puis mis dans un tube contenant 10mL de milieu (1 tube pour les souriceaux $Cx43^{+/+}$ et un autre pour les souriceaux $Cx43^{+/-}$). Une digestion mécanique est réalisée par des séries d'aspiration et de refoulement à l'aide d'une pipette dont l'extrémité est de plus en plus fine jusqu'à obtenir une suspension homogène. Les suspensions cellulaires sont ensemencées dans des flasques de $75cm^2$ et incubées dans un incubateur saturé en eau (37°C, 5% CO_2) jusqu'à l'obtention de cultures d'astrocytes suffisamment confluentes, en changeant le milieu 2 jours après pour éliminer les débris cellulaires et les cellules mortes.

4. Culture cellulaire

Les cellules **U251** et les **astrocytes** sont cultivés dans du milieu DMEM (1X) glutaMAX™-1 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO® Life Technologies) riche en glucose (4,5g/L) et contenant du pyruvate (1mM). Le milieu est supplémenté avec 10% (U251) et 20% (astrocytes) de SVF (Sérum de Veau Fœtal, PAN™ Biotech) et 1% de pénicilline/streptomycine (100µg/mL, GIBCO® Life Technologies). Les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur (37°C ; 5% CO_2) en atmosphère humide.

Afin de maintenir les cultures cellulaires en routine, celles-ci sont rincées avec 5mL de milieu DMEM sans sérum. Puis, 2mL de trypsine (0,25% trypsin-EDTA (1X), GIBCO® by Life Technologies) par boîte sont ajoutés et placés 5min à 37°C pour décoller les cellules par l'action de la trypsine. Les cellules décollées sont récupérées dans un tube contenant 10mL de milieu de culture DMEM complet pour arrêter l'action de la trypsine. Ensuite, la suspension cellulaire est centrifugée 10min à 1 000 rpm. Le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans le milieu de culture. Les boîtes nouvellement préparées sont incubées (37°C ; 5% CO_2) jusqu'à confluence.

La pression de sélection sur les clones de cellules U251 est maintenue par l'ajout de puromycine (1µg/mL, Sigma-Aldrich) dans le milieu de culture.

Congélation et décongélation des cellules

La conservation des cellules se fait dans un cryotube avec le milieu de culture supplémenté de 10% de SVF et 10% de DMSO (DiMéthylSulfOxyde) ayant un rôle de cryoprotéction. Le cryotube est placé à -80°C dans une boîte de congélation contenant de l'éthanol afin de permettre une baisse progressive de la température. Ensuite, pour une longue durée de conservation, le cryotube est placé dans l'azote liquide à -180°C.

La décongélation des cellules se fait rapidement à 37°C, au bain-marie. Une fois décongelées, les cellules sont transférées dans une boîte de pétri (100 mm) contenant 9mL de milieu de culture complet et placées dans l'incubateur jusqu'à confluence.

5. Test XTT

Le test XTT consiste à mesurer la prolifération des cellules en estimant leur viabilité. L'effet toxique du Bisphénol A (Sigma Aldrich) et de ses dérivés chlorés (composés C, D et le cocktail C+D) sur les cellules U251 a été estimé par ce test pour déterminer la concentration la moins toxique.

Sur une plaque de 96 puits, sont ensemencées pour 24h et 72h, 100µL de suspension cellulaire (6 000 cellules/puits) auxquels sont ajoutés 100µL des traitements à tester (CTR, BPA, C, D et

C+D) à différentes concentrations (2.10^{-4}, 2.10^{-5},2.10^{-6}, 2.10^{-7}M) préparées dans le milieu de culture. Le blanc consiste à l'ajout de 200µL de milieu de culture sans traitements ni cellules.

Après 24h et 72h d'incubation (37°C ; 5% CO_2), les réactifs du test XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche) sont préparés pour en déposer 50µL/puits (49µL de réactif 1 et 1µL de réactif 2). La plaque de 96 puits est ensuite incubée pendant 4h (37°C ; 5% CO_2). Par la suite, la densité optique (DO) est mesurée avec un spectrophotomètre (Mithras LB910, Berthold Technologies) calibré à 490nm.

Par les résultats obtenus à l'aide de ce test, il s'est avéré que la concentration de 10^{-6}M sera utilisée pour tous les traitements *in vitro*.

6. Traitements des cellules

Les solutions des traitements sont préparées dans le milieu de culture. La concentration utilisée pour ces différentes solutions est déterminée par le test XTT (à une concentration de 10^{-6}M pour le BPA et ses dérivés chlorés).

Pour toutes les techniques réalisées, les cellules sont traitées pendant 24h au BPA et à ses dérivés chlorés (C, D et C+D) à la concentration de 10^{-6}M, en utilisant comme condition contrôle du milieu contenant le solvant (méthanol).

7. Western Blot

Extraction protéique

L'extraction protéique consiste à lyser les cellules puis à purifier le lysat cellulaire afin d'isoler les protéines. Les différentes étapes de cette technique sont réalisées sur glace (à 4°C) afin d'empêcher une éventuelle dégradation des protéines.

Les cellules sont rincées avec 5mL de PBS 1X, puis 400µL de tampon de lyse sont ajoutés sur le tapis cellulaire. Ce tampon de lyse (pH 7,4) est composé de 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 5% NaF et 0,5% Na_3VO_4 qui sont des anti-phosphatases, ainsi qu'une tablette de cocktail d'inhibiteurs de protéases (complete mini, free EGTA ; Roche) permettant de

solubiliser les membranes et d'extraire les protéines tout en conservant leur intégrité. Les boîtes de pétri sont ensuite grattées avec un râteau, et les lysats cellulaires sont récupérés dans des tubes de 1,5mL.

Les cellules subissent une sonication à 70hz (2 fois 10s) afin de casser l'ADN ainsi que les membranes cellulaires, puis 5µL de phénylméthanesulfonylfluoride (PMSF inhibiteur de sérine-protéase, Sigma Aldrich) sont ajoutés dans chaque tube entre 2 sonications. Les tubes sont centrifugés (14 000rpm ; 4°C) pendant 15 minutes afin de récupérer le lysat clarifié contenant les protéines solubilisées dans le surnageant et d'éliminer les débris membranaires et l'ADN localisés dans le culot. Les lysats sont ensuite stockés à -20°C.

Dosage protéique

Les échantillons protéiques sont dosés par méthode colorimétrique à l'aide d'un kit DC© Protein Assay (BioRad, CA, USA) et l'absorbance des échantillons est lue avec un spectrophotomètre calibré à 750nm (Biomate 3, ThermoScientific). À partir d'une droite d'étalonnage [absorbance (DO) en fonction de la quantité de protéine (gamme de BSA de 0-2mg/mL)], il est alors possible de déterminer les quantités de protéines contenues dans les échantillons et ainsi de déterminer le volume à prélever pour déposer la même quantité de protéines dans chaque puits du gel.

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est utilisée pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire en condition dénaturante, sur gel à 10% de polyacrylamide.

L'analyse par Western blot se fait donc à partir de mêmes quantités d'échantillon pour chaque dépôt (100µg de protéines pour les cellules U251 et 60µg pour les astrocytes). Ceci évite de perturber les profils de migration lors des électrophorèses et permet une meilleure lisibilité des résultats. Une quantité équivalente de protéines pour chaque échantillon de 20µL est mélangée à un colorant bleu couplé à un agent réducteur (4µL de LDS Sample Buffer 4X et 1µL de sample Reducing Agent 10X) qui permet la dénaturation des protéines.

Les échantillons sont ensuite placés dans un bain sec (68°C ; 10 minutes) pour favoriser l'action de l'agent réducteur. Dans chaque puits du gel, sont déposés 20µL d'échantillon

préalablement préparés. Un marqueur de taille standard (SeeBlue plus Pre-Stained Standard, Invitrogen) est aussi déposé dans un puits (5µL) pour permettre l'identification des protéines des échantillons selon leur poids moléculaire. La cuve est remplie de tampon de migration (SDS Running buffer NuPAGE 20X, Invitrogen) et la migration est réalisée à 70V et 150mA pendant 3h.

Transfert sur membrane.

Les protéines sont rendues accessibles à la détection par les anticorps par transfert depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU). Dans un tampon de transfert (5% de tampon « transfert buffer 20X NuPAGE, Invitrogen », 20% de méthanol et 75% d'eau osmosée), sont imbibés et placés l'un sur l'autre respectivement éponge, papier Whatman, gel, membrane, papier Whatman et éponge, puis, le tout est placé dans une cassette. Cette dernière est placée dans une cuve remplie de tampon de migration et un courant électrique est appliqué à 50V et 400mA pendant 1h15min. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane. Au terme du transfert, les membranes sont incubées 5min dans du rouge ponceau pour vérifier que les protéines ont été transférées. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau de robinet pour les décolorer. Les membranes peuvent alors être utilisées pour l'immunodétection par des anticorps spécifiques.

Immunodétection

Les membranes sont placées pendant 3 heures à température ambiante et sous agitation dans du TBS-T (10mL TrisHCl 1M, pH8 ; 30mL NaCl 5M, 1% tween-20 pour 1L d'eau osmosée) auquel est ajouté 5% de lait écrémé (Régilait) afin de bloquer les sites protéiques non spécifiques. L'anticorps primaire est préparé dans une solution de saturation composée de TBS-T ajouté de 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Cohn Analog, Sigma Aldrich), et est mis en présence des membranes dans une pochette scellée, à 4°C pendant toute la nuit, sous agitation.

Les anticorps primaires (Ac I) utilisés sont :

- Ac I monoclonal de souris spécifiques de la Cx43 (dilué au 1/500ème, Transduction Laboratories).
- Ac I monoclonal de souris spécifique de la GAPDH (dilué au 1/40 000ème, Hy Test Ltd)

Après incubation des membranes avec l'anticorps primaire, les membranes sont rincées trois fois au TBS-T pendant 10min. L'anticorps secondaire polyclonal de chèvre (Dako Cytomation, Glostrup, Danemark) couplé au HRP (**H**orse**R**adish **P**eroxydase), anti-souris ou anti-lapin, est utilisé (selon l'anticorps primaire utilisé auparavant) en le diluant au 1/1 000ème dans le tampon de saturation. Les membranes sont alors placées en présence de l'anticorps secondaire dans une pochette, pendant 1h à température ambiante, sous agitation. Ensuite, 3 lavages successifs de 10 minutes sont réalisés avec du TBS-T.

Révélation des protéines

Les résultats de l'immunodétection sont révélés à l'aide d'un Kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, ThermoScientific) en utilisant une solution de péroxyde d'hydrogène et du luminol (4mL/membrane, pendant 5min). La péroxydase décompose le péroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. Ce dernier réagit avec le luminol, provoquant l'émission de photons et donc une luminescence.

Un film est placé au contact des membranes, le temps nécessaire à la visualisation des protéines d'intérêts, puis immergé dans une solution de révélation (Kodak®), et enfin, immergé dans une solution de fixation (Kodak®) en rinçant à l'eau de robinet après chaque immersion dans ces deux solutions.

Après 5min en présence d'ECL, les membranes sont placées dans une boîte reliée à une caméra (geneGnome XRQ-Chemiluminescence imaging, SYNGENE®) et le logiciel GeneSys est utilisé pour prendre les photos selon la durée d'exposition souhaitée.

« Stripping » des membranes

Après la révélation de la protéine d'intérêt (Cx43), les membranes sont « strippées » afin d'éliminer l'anticorps anti-Cx43 pour détecter la protéine de référence GAPDH. Pour cela, les membranes sont placées dans une solution de « stripping » (Tris-HCl, pH 6,7 ; 2% SDS, 0,7% β-mercaptoéthanol) pendant 30 min à 50°C. Le β-mercaptoéthanol ainsi que la chaleur vont permettre de casser les liaisons entre l'anticorps et la protéine d'intérêt. Les membranes sont ensuite rincées abondamment à l'eau du robinet puis au TBS-T. Les sites non spécifiques sont bloqués pendant 3h avec du TBS-T contenant 5% de lait. Puis, les membranes sont mises en

présence de l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GAPDH (dilué au 1/40 000ème), toute la nuit à 4°C, sous agitation. Après 3 rinçages de 10min au TBS-T, les membranes sont incubées dans la solution d'anticorps secondaire anti-souris couplé au HRP (dilué au 1/1 000ème) pendant 1h. Par la suite, 3 rinçages de 10min au TBS-T sont réalisés. Les membranes sont prêtes pour la révélation de la protéine d'intérêt par l'ECL de la même manière que précédemment.

8. RT-PCR quantitative

Cette technique consiste à obtenir par transcription inverse des ADNc issus d'ARNm d'une culture cellulaire pour estimer l'expression de l'ARNm de la protéine d'intérêt (Cx43) par rapport à celle d'une protéine de référence, la GAPDH, dont l'expression est considérée comme étant stable, quelles que soient les conditions.

Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide d'un kit (SV Total RNA Isolation System, Promega). Cette technique consiste à lyser les cellules puis à purifier le lysat cellulaire afin d'isoler les ARN. Comme pour l'extraction protéique, les échantillons sont placés sur glace (4°C). Les cellules sont rincées avec 5mL de PBS 1X (pour éliminer toutes traces de milieu de culture) puis lysées avec 175µL d'une solution de lyse (RNA Lysis buffer). Les boîtes sont ensuite grattées avec la pointe d'un cône de micropipette et les lysats cellulaires (acides nucléiques, débris cellulaires et protéines) sont récupérés dans un tube de 1,5mL. Ensuite, 350µL de RNA Dilution Buffer sont ajoutés dans chaque tube (pour faciliter le pipetage lorsque le lysat est très épais) et le contenu des tubes est mélangé par inversion, 2 à 3 fois.

Les échantillons sont ensuite chauffés, pendant 3min à 70°C, dans un bain sec puis centrifugés à 12 000 rpm et à 20°C pendant 10min. Les surnageants sont alors récupérés dans un tube eppendorf de 1,5 mL contenant 200µL d'éthanol pur afin de précipiter les ADN contenus dans les surnageants. Le contenu du tube eppendorf est mélangé puis transféré dans un panier placé au-dessus d'un tube « déchet », et centrifugé 1min à 12 000rpm. Ensuite, 600µL de RNA Wash Solution sont ajoutés, puis le tube est centrifugé à nouveau 1min à 12 000rpm. Le mix DNase permettant d'hydrolyser l'ADN est préparé pour 1 échantillon avec 40µL de Yellow Core

Buffer, 5µL de MgCl2 (0,09M) et 5µL de DNase I en déposant bien sur le filtre et la préparation est incubée, 15min à température ambiante. L'action de la DNase I est inhibée en ajoutant 200 µL de DNase Stop Solution et en centrifugeant le tube 1min. Ensuite, deux lavages sont réalisés, d'abord avec 600µL de RNA Wash Solution puis centrifugé 1min et enfin, avec 250µL de RNA Wash Solution et centrifugé 2min. Le panier est placé dans un tube d'élution de 1,5mL puis les ARN sont élués dans 50µL d'eau « Nuclease-Free », après 1min de centrifugation, et peuvent alors être stockés à -80°C. Les ARN extraits sont par la suite quantifiés au NanoDrop avec un dépôt de 1µL.

RT-PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel)

À partir de la quantité d'acides nucléiques, en ng/µL, estimé par le Nanodrop, le volume à prélever pour obtenir 2µg d'ARN est déterminé sachant que le volume maximum à prélever est de 15µL. Pour synthétiser l'ADNc, un kit cDNA synthesis (Quanta Biosciences Inc™) est utilisé en ajoutant dans des tubes (0,2mL) 4µL de reaction mix (5X) et 1µL de qScript RT reverse transcriptase, mais aussi 15µL d'échantillon. Ensuite, les tubes sont placés dans un thermocycleur RTVP (Applied Biosciences) programmé (5min à 22°C ; 30min à 45°C ; 5min à 85°C). Les ADNc obtenus peuvent être stockés à -20°C.

qPCR (PCR quantitative)

Le principe de cette technique consiste à utiliser deux amorces spécifiques d'un gène cible afin d'amplifier spécifiquement l'ADNc d'intérêt dans lequel s'intercale un agent fluorescent (SybrGreen). L'intensité de la fluorescence est donc directement corrélée à la quantité d'ADNc présent. Pour ce faire, l'ADNc est dilué au 1/10ème afin d'obtenir une concentration finale de 25µM. Puis, le mix PCR est préparé avec 4,8µL d'eau miliQ, 10µL de power Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystem®, Life Technology), 0,1µL de Primer Forward (25µM) et 0,1µL Primer Reverse (25µM ; InVitrogen™). De ce fait, deux solutions de mix sont préparées en utilisant d'une part, les primers sens (5'-GGGCGTTAAGGATCGGGTTAAGG-3') et anti-sens (5'-GTTGGTGAGGAGCAGCCATTGAA-3') de la Cx43, et d'autre part, les primers sens (5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3') et anti-sens (5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3') de la GAPDH (gène de référence) pour la condition contrôle.

Chaque puits d'une plaque de 96 puits reçoit 15µL de mix et 5µL d'ADNc dilué au 1/10ème ou d'eau miliQ pour le blanc. Chaque dépôt est réalisé en triplicats afin d'évaluer les variations liées au manipulateur. La plaque est finalement placée dans l'appareil à PCR (GeneAmp7500 Fast, programme SyBR Green + melt Curve/Quantitative Standard Curve/Standard) pendant 2h. L'analyse des résultats est réalisée en normalisant le taux d'expression du gène d'intérêt (Cx43) par rapport au taux d'expression du gène de référence (GAPDH) selon la formule suivante $\mathbf{2^{(-CtCx43\ -CtGAPDH)}}$.

9. Immunofluorescence

Les cellules (U251 ou astrocytes, selon l'expérience réalisée) sont ensemencées sur des lamelles de verre (14mm de diamètre) qui sont placées dans les puits d'une plaque (24 puits) incubée (37°C, 5% CO_2) en atmosphère humide. Une fois les cellules U251 devenues confluentes, elles sont traitées pendant 24h au BPA et à ses dérivés chlorés comme précédemment décrit (*cf.* « Traitement des cellules »). Les cellules confluentes (U251 ou astrocytes) sont ensuite rincées 3 fois au PBS 1X puis fixées pendant 20min avec une solution de paraformaldéhyde (PFA ; 4%). Une série de trois lavages est réalisée à nouveau avec du PBS 1X (10min) puis les lamelles sont recouvertes avec 500µL de tampon de saturation (PBS, 1% Triton, 2% BSA) pendant 3h afin de bloquer des sites protéiques non spécifiques.

Cette technique permet de localiser la Cx43 dans les différents types cellulaires étudiés. Les différentes protéines visualisées par l'immunomarquage sont la Cx43, la cortactine, la GFAP (pour les astrocytes) et l'actine. La solution d'anticorps primaire est préparée dans un tampon de saturation contenant l'anticorps anti-Cx43 (souris, 1/250ème) et l'anticorps anti-cortactine (lapin, 1/250ème) ou l'anticorps anti-GFAP (lapin, 1/250ème). Les lamelles sont placées dans une chambre humide (afin d'éviter le séchage de la préparation) en les retournant sur 50µL de la solution d'anticorps primaire déposée sur un parafilm et incubées, à 4°C, toute la nuit.

Les lamelles sont replacées ensuite dans du tampon de saturation, puis deux lavages de 10min (PBS, 1% Triton) et un rinçage dans le tampon de saturation sont réalisés. La solution d'anticorps secondaires est préparée dans le tampon de saturation en utilisant les anticorps Alexa 488 de chèvre anti-souris (1/250ème) dirigé contre l'anticorps anti-Cx43 et Alexa 635 anti-

lapin (1/250ème) dirigé contre les anticorps primaires anti-cortactine ou anti-GFAP. Lorsque nécessaire, la phalloïdine couplée au TRITC (1/50ème) est ajoutée dans le tampon de saturation pour le marquage de l'actine. Les lamelles sont placées dans une chambre humide, en les retournant sur 50µL de la solution d'anticorps secondaires, pendant 1h, à l'obscurité et à température ambiante. Les lamelles sont rincées, par la suite, deux fois 10min (PBS, 1% Triton), puis, à l'eau distillée, et finalement montées sur lame en les retournant sur 10µL de mowiol (Tris 0,2M ; glycérol 4M ; 12% Mowiol® 4-88 Calbiochem ; pH8,5).
Les lames sont observées au microscope confocal et les photos sont prises à l'objectif 60X sous huile à immersion.

10. Test d'observation et de quantification des invadopodes

Pour ce test, des inserts comportant des pores de 1µm de diamètre sont utilisés et adaptés à une plaque de 24 puits (chambres de Boyden).

Préparation des inserts :

Après avoir déposé les inserts dans une plaque de 24 puits, 30µL de gélatine fluorescente (1mg/mL ; Oregon Green 488 conjugated®, Molecular Probes) sont étalés dessus et la plaque est placée à 4°C pendant 1h.
Ensuite, 20µL de gélatine est retirée et la plaque est incubée 30 min à 37°C. Une fois que la gélatine est polymérisée, 1mL de milieu de culture DMEM est placé au fond du puits (compartiment inférieur) et 500µL de milieu dans l'insert (compartiment supérieur). La plaque est alors laissée incuber toute la nuit à 37°C.

Préparation des cellules :

Les cellules traitées 24h ou non, au BPA et à ses dérivés chlorés, sont trypsinées et comptées afin d'en déposer 10 000/500µL dans chaque insert.
Ensuite, deux cas de figures sont envisagés. Le premier consiste à déposer les cellules U251 Mock ou les cellules U251 shRNA dans les inserts tout en continuant ou non les traitements

dans les compartiments inférieur et supérieur (Figure 47.a). Le second consiste à déposer les cellules U251 Mock ou les cellules U251 shRNA dans les inserts contenus dans des puits préalablement ensemmencés d'astrocytes (issus de souriceaux $Cx43^{+/+}$ ou $Cx43^{+/-}$dont les mères avaient été exposées ou non au BPA et ses dérivés chlorées) devenus confluents (*Cf*. Figure 47.b).

Après le dépôt des cellules dans les inserts, la plaque est placée dans un incubateur pendant 5-6h, afin de permettre la formation des invadopodes.

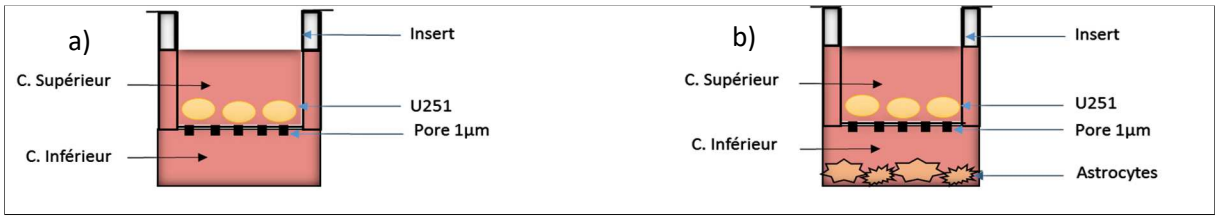


Figure 47: Cultures sur inserts (pores 1µm) pour l'observation et le comptage des invadopodes formés par les cellules U251. a) Les cellules U251 sont ensemmencées dans le compartiment supérieur (insert) et traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. b) Les cellules U251 sont ensemmencées dans le compartiment supérieur (insert) en présence d'astrocytes préalablement ensemencés dans le compartiment inférieur (fond du puits).

Montage sur lame des membranes de 1µm :

Pour toutes les solutions et rinçages réalisés, 1mL de solution est déposé dans le compartiment inférieur (sous les inserts) et 500µL dans le compartiment supérieur (dans les inserts).

De cette façon, les cellules sont rincées deux fois au PBS, puis fixées pendant 20 min au PFA (4%). Deux rinçages sont réalisés à nouveau avec du PBS avant de traiter les cultures au tampon de saturation (PBS, 1% Triton, 2% BSA) pendant 3h.

La solution d'anticorps primaire est préparée dans un tampon de saturation avec l'anticorps primaire de cortactine (1/250ème). Comme pour la technique d'immunofluorescence, les membranes des inserts (préalablement coupés avec une lame de scalpel) sont déposées, en les retournant sur 30µL de solution d'anticorps primaire, dans une chambre humide pendant toute une nuit, à 4°C.

Les membranes sont rincées deux fois 10min (PBS, 1% Triton), puis incubées dans la solution d'anticorps secondaire contenant l'anticorps Alexa 635 anti-lapin (1/250ème) dirigé contre l'anticorps primaire anti-cortactine et la phalloïdine couplée au TRITC (1/50ème) marquant

l'actine. Les membranes sont placées, en les retournant sur 30µL de la solution d'anticorps secondaires, dans une chambre humide pendant 1h, à l'obscurité, et à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées deux fois 10min (PBS, +1% Triton), puis à l'eau distillée, et finalement montées entre lame et lamelle, dans 10µL de mowiol prédéposés.
Les lames sont observées au microscope confocal et les photos sont prises à l'objectif 60X sous huile à immersion.

11. Test de migration 2D

Les cellules sont ensemencées dans une plaque de 24 puits (200 000 cellules/puits).

Une fois les cellules confluentes, de la mitomycine (Mitomycine C de Streptomyces caespitosus, 5 mg/mL) est ajoutée dans chaque puits (10µL/500µL) pendant 1h afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Ensuite, le tapis cellulaire est rayé (blessure) à l'aide d'un cône de micropipette puis deux rinçages sont effectués pour éliminer les débris cellulaires.

Les traitements (CTR, BPA, C, D et C+D) sont effectués dans les puits ainsi préparés et la plaque est placée dans un incubateur relié à une caméra permettant une analyse par le logiciel Juli-Stage.

Avant l'initialisation de l'analyse, la plaque utilisée doit être déterminée en cliquant sur « vessel » (24 wells) puis calibrée en positionnant de A01 à B01. Ensuite l'analyse « wound healing » est sélectionnée et finalement le focus est réglé manuellement pour chaque puits et chaque position (4 positions/puits).

L'analyse est réalisée pour 144 cycles avec un intervalle de temps de 30min pour chaque cycle.

À partir des valeurs directement obtenues sur Juli-Stage, les graphes permettant d'estimer la progression des migrations 2D sont tracés à l'aide du logiciel Graph-Prism.

12. Test d'invasion et de migration 3D

L'estimation des capacités de migration et d'invasion 3D est réalisée avec un appareil double analyseur de cellules en temps réel, xCELLigence (RTCA DP ; ACEA, Biosciences). L'appareil

contient 3 berceaux à plaques pouvant être utilisés simultanément, indépendamment les uns des autres. Il est placé dans un incubateur de culture cellulaire standard et contrôlé via un câble connecté à un ordinateur. Par cette connexion, en temps réel avec les trois berceaux, le logiciel RTCA permet l'analyse et l'affichage des données correspondant aux capacités de migration et d'invasion des cellules.

La plaque électronique, utlisée pour la mesure d'invasion et de migration 3D des cellules, est une plaque à 16 puits (CIM-plate 16 ; ACEA, Biosciences). Chaque puits est une chambre de Boyden composée de chambres supérieures et inférieures qui s'emboitent facilement (Figure 48). Une membrane microporeuse sert de base à la chambre supérieure permettant aux cellules de se translocaliser, par migration ou invasion, dans la chambre inférieure. La face inférieure de cette membrane est recouverte de capteurs de microélectrodes détectant la présence des cellules adhérentes. Lorsque des cellules adhérent à leur surface, ces microélectrodes conduisent un courant électrique qui permet une mesure cinétique quantitative d'invasion et/ou de migration cellulaire de la chambre supérieure (où sont initialement ensemmencées les cellules) à la chambre inférieure.

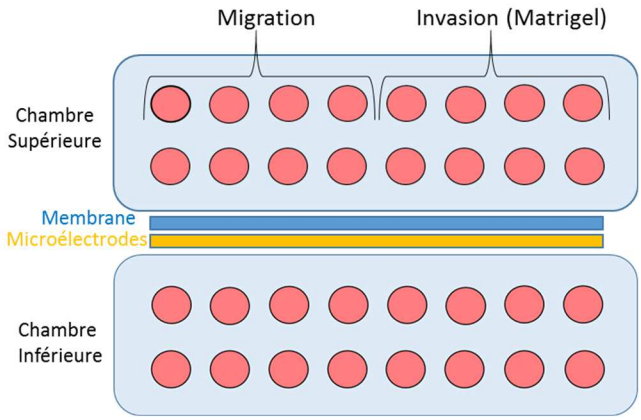


Figure 48 : Représentation schématique de CIM-plate 16 permettant d'analyser les capacités de migration et d'invasion 3D des cellules testées.

Préparation de la plaque :

La plaque est divisée en deux parties comportant 8 puits pour la mesure de la capacité de migration et 8 puits restants pour la mesure de la capacité d'invasion.

Pour l'étude de la capacité d'invasion, les chambres supérieures sont recouvertes de matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix).

A partir d'une solution mère (1mg/mL), le matrigel est dilué au 1/20ème, avec du milieu de culture DMEM froid, sur de la glace dans des tubes eppendorf pré-refroidis pour éviter la polymérisation du matrigel. Ensuite, 50µL de la solution de Matrigel sont ajoutés dans chaque puits de la chambre supérieure en la répartissant sur toute la surface. Finalement, 30µL de la solution de Matrigel sont retirés pour n'en laisser que 20µL recouvrir la membrane microporeuse. Les plaques sont placées dans un incubateur de culture cellulaire standard, pendant 3h, pour que le matrigel polymérise.

Après polymérisation, pour toute la plaque (migration/invasion), 160µL de milieu de culture sont ajoutés dans les puits de la chambre inférieure. Ce milieu provient soit directement des cellules U251 Mock ou U251 shRNA (traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés) soit de cultures (J8) primaires d'astrocytes de souriceaux Cx43$^{+/+}$ ou Cx43$^{+/-}$ dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. Ensuite, la chambre supérieure est emboitée sur la chambre inférieure. Puis, 50µL de milieu de culture (des cellules U251 ou des astrocytes), comme dans les chambres inférieures, sont ajoutés dans les chambres supérieures.

Equilibration de la plaque :

La plaque est placée dans l'appareil xCELLigence RTCA DP, lui-même déposé dans un incubateur, pendant 1h, pour permettre à la membrane de s'équilibrer avec le milieu.

Démarrage du logiciel RTCA :

Après 1h d'équilibration avec le milieu, en lançant l'étape 1 du logiciel RTCA, les valeurs d'impédance de fond sont déterminées.

Préparation, ajout et équilibration des cellules dans la plaque :

Après récupération du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS puis traitées avec 2mL/boîte de pétri de Versen (GIBCO®, Life Technologies) pendant 10 min à 37°C. Les cellules décollées sont ensuite récupérées dans du milieu DMEM complet, comptées puis centrifugées (1 000rpm, 10min). Le culot de cellules est resuspendu est dilué afin d'obtenir une concentration de 2,5.10^{6} cellules/mL. Cette resuspension est effectuée avec du milieu provenant soit directement des cellules U251 Mock ou U251 shRNA (traitées ou non au BPA

et à ses dérivés chlorés) soit de cultures (J8) primaires d'astrocytes de souriceaux $Cx43^{+/+}$ ou $Cx43^{+/-}$ dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés.

100µL de cette suspension cellulaire sont déposés dans chaque puits de la chambre supérieure correspondant ainsi à un nombre final de 250 000 cellules/puits. Après ajout des cellules, 2h d'incubation sont nécessaires pour qu'elles se déposent au fond des puits.

Début de la mesure :

La plaque chargée est placée dans l'appareil xCELLigence RTCA DP à l'intérieur de l'incubateur et la mesure est programmée pour une durée de 24h avec des lectures toutes les 15 min.

13. Dye uptake "test des hémicanaux"

Les cellules (U251 ou astrocytes) sont ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits dans une plaque de 6 puits. Après 24h, dans le cas de cellules U251 (U251 Mock et U251 shRNA), celles-ci sont traitées pendant 24h au BPA ou à ses dérivés chlorés.
Pour confirmer l'observation de la fonction des hémicanaux, un inhibiteur de ces hémicanaux, l'acide fulfénamique (FFA) (Sigma Aldrich), est utilisé. Le FFA est dissout dans le DMSO à 50µM (4µL de FFA pour 2mL de milieu).

Une solution extracellulaire (140mM NaCl ; 5,5mM KCl ; 10mM D-Glucose ; 10mM HEPES ; 10mM EGTA ; 1,8mM $CaCl_2$; 1mM $MgCl_2$; pH 7,35) contenant ou non un inhibiteur des hémicanaux de Cx43, le FFA, dissout dans du DMSO (50µM), est ajoutée sur les cellules non confluentes (10 min à 37°C). Ensuite, après aspiration de la solution extracellulaire, le Lucifer Yellow (Sigma Aldrich) à 1mg/mL est ajouté (100µL/puits) pour une durée de 5min à 37°C. Les cellules sont alors rincées quatre fois avec la solution extracellulaire pour éliminer l'excès de Lucifer Yellow.

L'observation au macroscope (Olympus) est réalisée par la suite au grossissement X4.

Les images obtenues sont quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ.

14. Test de communication (Technique de Parachute)

Cette méthode consiste à précharger des cellules avec un colorant capable de traverser la membrane plasmique des cellules, tel que la calcéine-AM. Pour déterminer si une cellule communique avec les cellules adjacentes, les cellules chargées sont mises en suspension sur une couche de cellules non chargées afin d'estimer leur capacité de communication intercellulaire par jonctions gap.

Des cultures confluentes d'une boîte de pétri (10 cm de diamètre) sont rincées avec une solution de tyrode (39 mM NaCl ; 3 mM KCl ; 17 mM $NaHCO_3$; 2 mM glucose ; 3 mM $CaCl_2$; 1mM $MgCl_2$; 0,2 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,4). La solution de charge préparée dans la tyrode est composée :

- de Dil à 1 µM (Dil-cell labelling solution, Molecular Probes^{TM}, Invitrogen) : un lipide membranaire qui fluoresce dans le rouge et permet d'identifier les cellules chargées des autres cellules non chargées
- de calcéine-AM (AcetoMethoxy) à 4 µM (Calcéine AM préparé dans 24 mM de DMSO, Sigma-Aldrich) : de fluorescence verte, cette molécule est capable de traverser la membrane cellulaire et de diffuser à travers les jonctions gap.

Les cellules U251 sont chargées pendant 45min et incubées en atmosphère humide (37°C, 5% CO_2).

Après le processus de chargement en présence de calcéine-AM, les cellules sont rincées trois fois avec la tyrode pour éliminer le fluorochrome non incorporé dans les cellules. Ensuite, les cellules chargées sont trypsinées pendant 5min à 37°C. Puis, les cellules sont centrifugées à 1000 rpm, pendant 10min, et le culot est resuspendu dans 4mL de milieu de culture. Ensuite, 10µL de la suspension cellulaire sont déposés sur une cellule de Mallassez pour le comptage afin de déposer 5 000 cellules chargées/puits. Les cellules non chargées sont préalablement ensemencées sur une lamelle de verre (30mm) placée dans une plaque de 6 puits puis elles sont traitées ou non avec le BPA ou ses dérivés chlorés pendant 24h. Les cellules chargées sont ensuite déposées sur les cellules non chargées et la plaque est incubée en atmosphère

humide (37°C, 5%CO_2) pendant 3h ; le temps nécessaire pour que les cellules chargées forment des jonctions gap avec les cellules non chargées.

Après 3h d'incubation, les lamelles sont placées dans une cellule de montage avec 1mL de milieu de culture pour procéder à l'observation microscopique (Microscope Olympus FV1000). Les photos sont prises avec l'objectif X60 sous huile à immersion.

15. Scrape Loading

Des cultures confluentes, ensemencées dans une boîte de pétri (30mm de diamètre), puis ayant été traitées ou pas pendant 24h au BPA et à ses dérivés chlorés, sont incubées dans une solution HEPES Buffered-Saline (NaCl 140 mM ; KCl 5,5 mM ; CaCl 1,8 mM ; MgCl 1 mM ; d-glucose 10 mM, HEPES 10 mM ; pH 7,35) pendant 10min à température ambiante.

Les cellules sont ensuite rincées 1 min avec une solution HBS sans calcium (Ca^{2+}-free HEPES Buffered Saline). Le tapis cellulaire est rayé à l'aide d'une lame de scalpel (scrape), puis les cellules sont exposées (loading) pendant 1 min au Lucifer Yellow (1mg/mL). Pour éliminer l'excès de Lucifer Yellow et les débris cellulaires, les cellules sont rincées avec la solution HBS sans calcium. Après 8min, le temps que le Lucifer Yellow diffuse par les jonctions gap, les cellules sont rincées à nouveau une fois au HBS sans calcium avant de photographier les zones de diffusion du Lucifer Yellow au microscope photonique inversé (LEICA) avec l'objectif X10. La surface de fluorescence correspondant à la diffusion du Lucifer Yellow est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

16. Analyses statistiques

Pour tous les graphiques obtenus à l'aide du logiciel Graph-Prisme 5 (GrapPad Sooftware Inc., SanDiego, CA), les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student (t-test). Les données sont significativement différentes pour des valeurs de probabilité * $P<0,1$; ** $P<0,05$ et *** $P<0,01$.

PARTIE 4 : RESULTATS

1. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur l'expression et les fonctions de la Cx43 des cellules U251 de glioblastome humain:

1.1. Caractérisation des cellules U251 de glioblastome humain présentant différents niveaux d'expression de la Cx43

Au cours de ce projet, nous avons utilisé les cellules U251, douées d'une capacité invasive importante, comme modèle de glioblastome humain. Ce modèle nous semblait particulièrement intéressant car dans le passé nous avons pu établir différents clones de cellules U251 dont l'expression de la Cx43 était réduite par shRNA. Parmi ces clones, nous avons utilisé celui obtenu par shRNA dirigé contre l'extrémité carboxyle de la Cx43 (clone U251 shRNA) qui présente une expression diminuée de la Cx43 aussi bien au niveau de l'ARNm (57,2 ± 4,5%) qu'au niveau protéique (24,7 ± 1,9%) par rapport aux cellules parentales (U251 Mock).

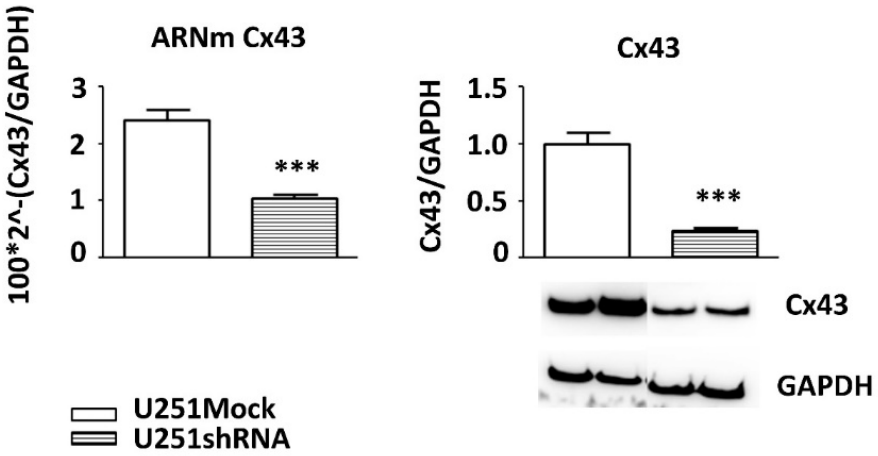


Figure 49 : Niveau d'expression de la Cx43 dans les cellules U251 Mock et shRNA. *Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine Cx43 sont comparés entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA par les techniques de RT-PCR quantitative (à gauche) et du Western blot (à droite), respectivement. Les histogrammes ±SEM (n=3) montrent une expression diminuée de la Cx43 aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique dans les cellules U251 shRNA par rapport aux cellules U251 Mock. L'expression de la Cx43 est quantifiée par comparaison à celle de la GAPDH.*

Ce modèle est d'autant plus intéressant que la réduction d'expression de la Cx43 n'affecte pas sa localisation membranaire et cytoplasmique alors que sa fonction, déterminée par

l'estimation de la CIJG, est fortement diminuée (environ 66% d'inhibition de CIJG par rapport aux cellules U251 Mock) (Strale et al., 2012).

Pour ce travail de thèse, la diminution de l'expression de la Cx43 au niveau transcriptionnel et protéique de ce clone a été régulièrement vérifiée permettant de confirmer que l'expression de la Cx43 est diminuée, d'environ 42% au niveau de l'ARNm et de 75% au niveau protéique, dans le clone U251 shRNA par rapport aux cellules U251 Mock (Figure 49).

1.2. Détermination de la concentration de BPA et de ses dérivés chlorés à utiliser sur les cellules U251

Une fois le modèle cellulaire de glioblastome bien établi et caractérisé par une différence d'expression de la Cx43 entre les cellules U251 mock et shRNA, nous avons évalué la toxicité du BPA et de ses dérivés chlorés sur ces cellules par la technique du XTT.

Après 24h et 72h de traitement, à différentes concentrations (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}M), nous observons une mort cellulaire à partir de la concentration de 10^{-4}M pour tous les traitements aussi bien pour les cellules U251 Mock que pour les cellules U251 shRNA (Figure 50). Compte tenu de ces résultats, les conditions de traitements des cellules U251 ont été fixées, pour les expérimentations à suivre, à une concentration de 10^{-6}M pendant 24h.

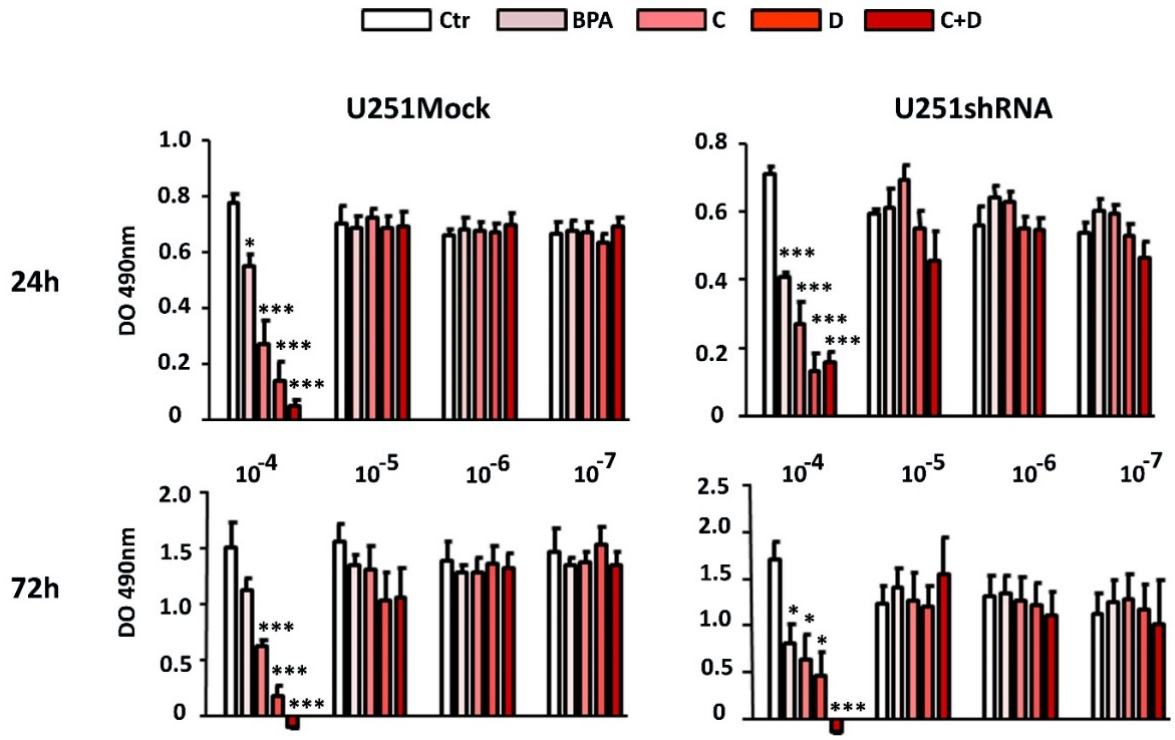


Figure 50 : Estimation de la toxicité *in vitro* du BPA et de ses dérivés chlorés sur les cellules U251 Mock et U251 shRNA. *L'estimation de la toxicité a été réalisée en utilisant la technique du XTT. Pour cela, des mesures colorimétriques (DO 490nm) ont été prises 24h et 72h après l'ensemencement de 6.000 cellules/puits pour les différents traitements Ctr (solvant), BPA, C, D et C+D, à différentes concentrations (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} et 10^{-7}M). Les résultats montrent que les cellules U251 Mock et U251 shRNA ne présentent pas une toxicité particulière associée à leur niveau d'expression de la Cx43. Pour les deux types cellulaires, aucun traitement n'est toxique pour des doses inférieures ou égales à 10^{-5}M. La toxicité apparaît significativement à partir de 10^{-4}M pour tous les traitements. Les données sont des moyennes ±SEM (n=3) provenant de tests effectués en double.*

1.3. Effet du BPA et de ses dérivés chlorés sur le niveau d'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules U251

Les effets du BPA et de ses dérivés chlorés sur l'expression de la Cx43 dans les cellules U251 Mock et U251 shRNA ont été estimés par les techniques de RT-PCR quantitative et du Western blot aux conditions déterminées précédemment (10^{-6} M, pendant 24h) (Figure 51).

Après traitement des cellules U251 Mock avec le BPA, une augmentation de l'expression de la Cx43 a été observée à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine. Concernant les traitements aux molécules C, D ou au mélange C+D, une augmentation de l'expression de l'ARNm de la Cx43 est retrouvée, comme pour le traitement au BPA. En revanche, les molécules C et D n'ont

aucun effet sur l'expression protéique de la Cx43 alors que le mélange C+D entrainerait une diminution de l'expression de la Cx43.

Ces différents traitements sur la lignée U251 shRNA, ont pour conséquence une augmentation de l'expression des ARNm de la Cx43 après 24h. Au niveau protéique, une augmentation de l'expression de la Cx43 est retrouvée après les traitements au BPA et à la molécule C. Alors que les traitements à la molécule D ou au mélange C+D n'entrainent aucun changement.

Globalement, les résultats montrent une augmentation significative d'expression des ARNm de la Cx43 pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA après les différents traitements. Cependant, quels que soient les traitements, les niveaux d'expression des ARNm de la Cx43 restent constamment inférieurs pour les cellules U251 shRNA par rapport aux cellules U251 Mock.

Cependant, cette augmentation globale d'expression n'est pas retrouvée au niveau protéique pour lequel les effets des traitements sont plus hétérogènes. En effet, nous observons ainsi une augmentation de l'expression de la Cx43 après le traitement au BPA pour les cellules U251 Mock ou après les traitements au BPA ou à la molécule C pour les cellules U251 shRNA. Mais nous observons également une diminution significative de l'expression de la Cx43, après traitement au cocktail C+D, pour les cellules U251 Mock (Figure 51). Pour finir, il faut noter que le taux protéique de la Cx43 reste inférieur dans les cellules U251 shRNA par rapport aux cellules contrôle U251 Mock, quel que soit le traitement.

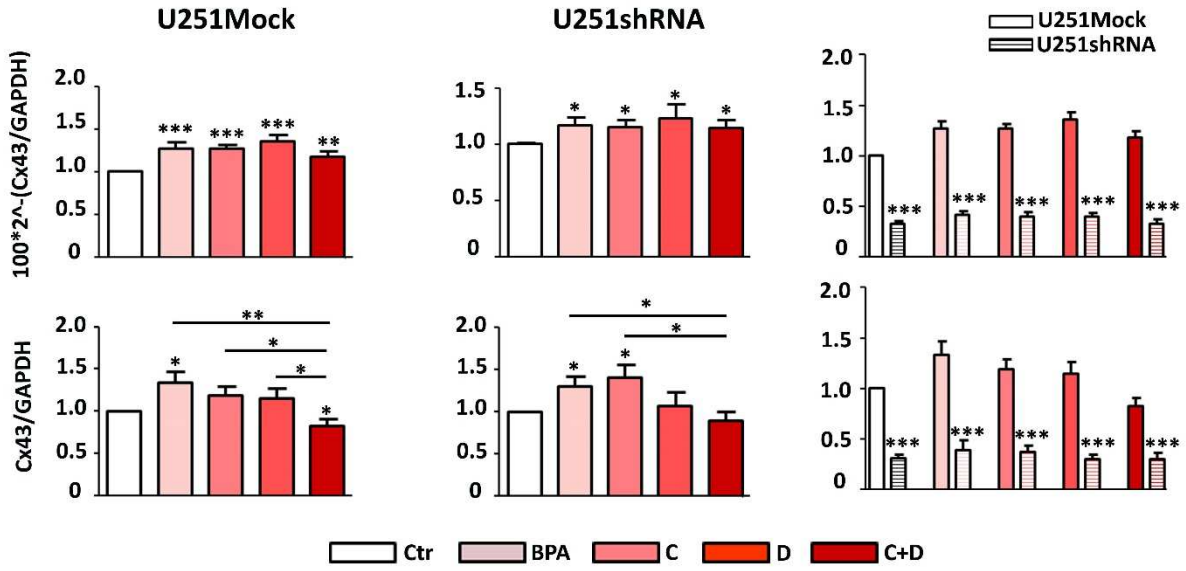


Figure 51 : Estimation de l'effet du BPA et de ses dérivés chlorés sur l'expression de la Cx43 (ARNm et protéine) dans les cellules U251 Mock et U251 shRNA. *Les cellules ont été traitées ou non au BPA ou à ses dérivés chlorés (Ctr, BPA, C, D, C+D) à la concentration de 10^{-6}M, pendant 24h. Le niveau d'expression d'ARNm de la Cx43 a été analysé par RT-PCR quantitative en normalisant l'ARNm de la Cx43 par rapport à l'ARNm de référence de la GAPDH. Pour chaque condition, les données sont présentées par rapport à la condition contrôle sous forme d'histogrammes réalisés à l'aide du logiciel Graph Prism ± SEM (n=3 ; Partie supérieure de la figure). Le niveau de l'expression protéique de la Cx43 a été analysé par Western blot. Les bandes détectées correspondant à la Cx43 ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J. Les données sont présentées sous la forme d'un rapport normalisé par rapport à la condition contrôle sous forme d'histogramme sur Graph Prism ± SEM (n=3 ; Partie inférieure de la figure). Globalement, si la quantité d'ARNm de Cx43 est augmentée significativement après traitement quel que soit le type cellulaire, l'effet est plus hétérogène au niveau protéique.*

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Protéines		↗	≈	≈	↘	↘	↗	↗	≈	≈

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

Afin de voir si l'effet des différents traitements pouvait être associé à des variations de localisation de la Cx43, celle-ci a été estimée par immunofluorescence indirecte. En premier lieu, cette approche a confirmé, qu'en l'absence de traitement, la Cx43 est bien détectée au niveau de la membrane plasmique, particulièrement aux points de contacts intercellulaires, mais aussi dans le cytoplasme des cellules U251 Mock et shRNA (Figures 52 et 53). Pour les

cellules U251 Mock, après traitement quel qu'il soit (BPA, C, D et C+D), nous observons une délocalisation de la Cx43 depuis la membrane plasmique vers le cytoplasme (Figure 52) tout en notant, toutefois, le maintien d'une faible localisation membranaire pour certains traitements (D, C+D).

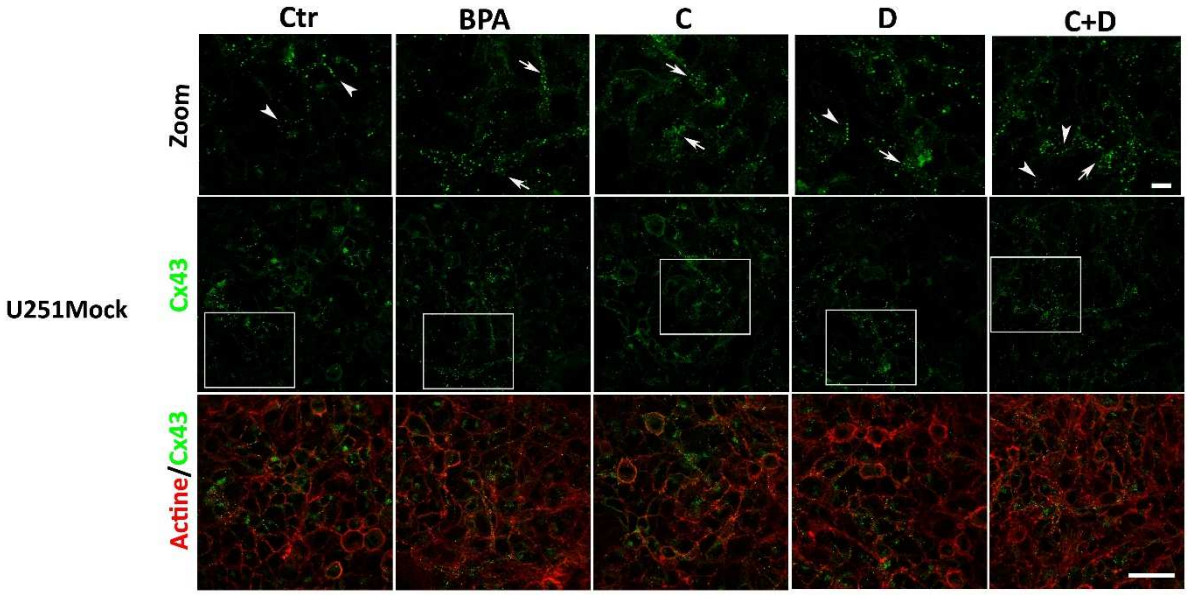


Figure 52 : Localisation de la Cx43 dans les cellules U251 Mock traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *En l'absence de traitement, la Cx43 (vert) est localisée dans la membrane plasmique (têtes de flèche) mais également au niveau du cytoplasme (flèches) des cellules. En présence de traitement quel qu'il soit (BPA, C, D et C+D), la Cx43 est délocalisée depuis la membrane plasmique vers le cytoplasme avec le maintien d'une faible localisation membranaire pour certains traitements (D, C+D). La localisation de la Cx43 (vert) est comparée à celle de l'actine (rouge). Les rectangles blancs représentent les zones agrandies (zoom). Barre d'échelle : 50 µm ; zoom : 10 µm.*

En revanche, la réaction aux traitements semble différente pour les cellules U251 shRNA (Figure 53). Si comme attendu, les cellules U251 shRNA présentent une expression de la Cx43 diminuée par rapport aux cellules U251 Mock, celle-ci reste principalement membranaire après les différents traitements.

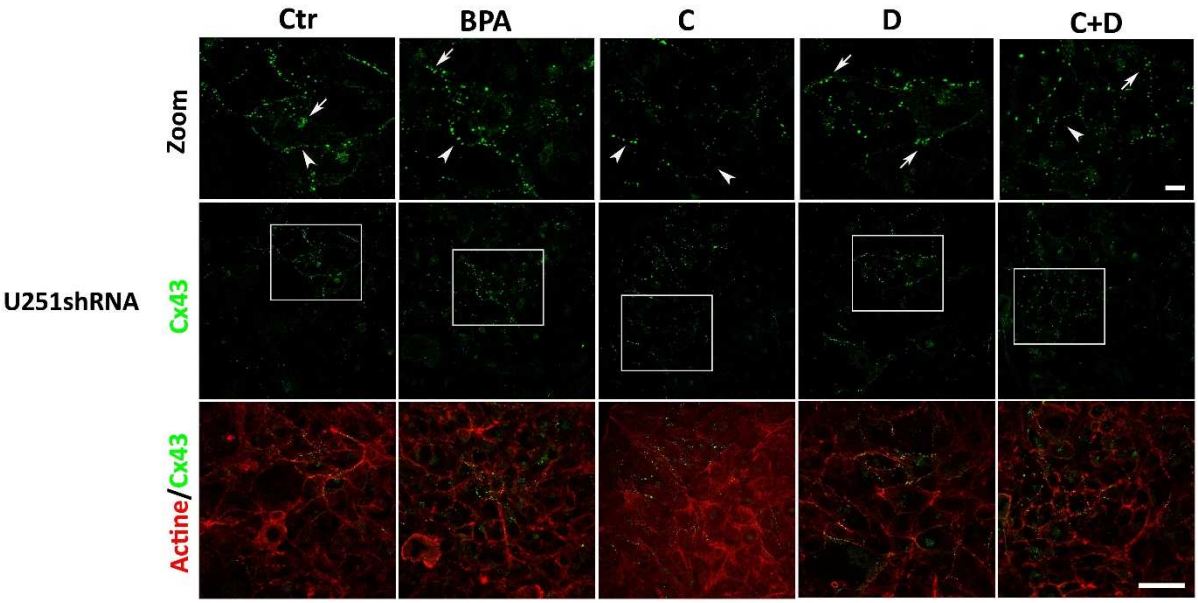


Figure 53 : Localisation de la Cx43 dans les cellules U251 shRNA traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *En l'absence de traitement, la Cx43 (vert) est localisée dans la membrane plasmique (têtes de flèche) mais également au niveau du cytoplasme (flèches) des cellules. Suite aux traitements (BPA, C, D et C+D), la Cx43 demeure localisée au niveau de la membrane plasmique. La localisation de la Cx43 (vert) est comparée à celle de l'actine (rouge). Les rectangles blancs représentent les zones agrandies (zoom). Barre d'échelle : 50 µm ; zoom : 10 µm.*

En conclusion, lorsque les cellules de glioblastomes présentent une expression diminuée de la Cx43 (U251 shRNA), les traitements au BPA ou à ses dérivés chlorés ne semblent pas avoir d'effet sur sa localisation membranaire contrairement aux cellules U251 Mock où celle-ci devient globalement plus cytoplasmique.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Protéines		↗	≈	≈	↘	↘	↗	↗	≈	≈
Localisation	Membrane	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme (Mb+)	Cytoplasme (Mb++)	Membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

1.4. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les fonctions de la Cx43 dans les cellules U251

Les fonctions « canal » de la Cx43 telles que la communication jonctionnelle (CIJG) et l'activité hémicanal ont été étudiées sur les cellules U251 par les techniques du « parachute », du « scrape loading » et du « dye-uptake ».

Le test du parachute consiste à observer la diffusion jonctionnelle d'un marqueur fluorescent, la Calcéine-AM, depuis des cellules donneuses vers des cellules receveuses. Cette approche confirme que la CIJG des cellules U251 Mock et shRNA est toujours présente quel que soit le traitement (Figure 54).

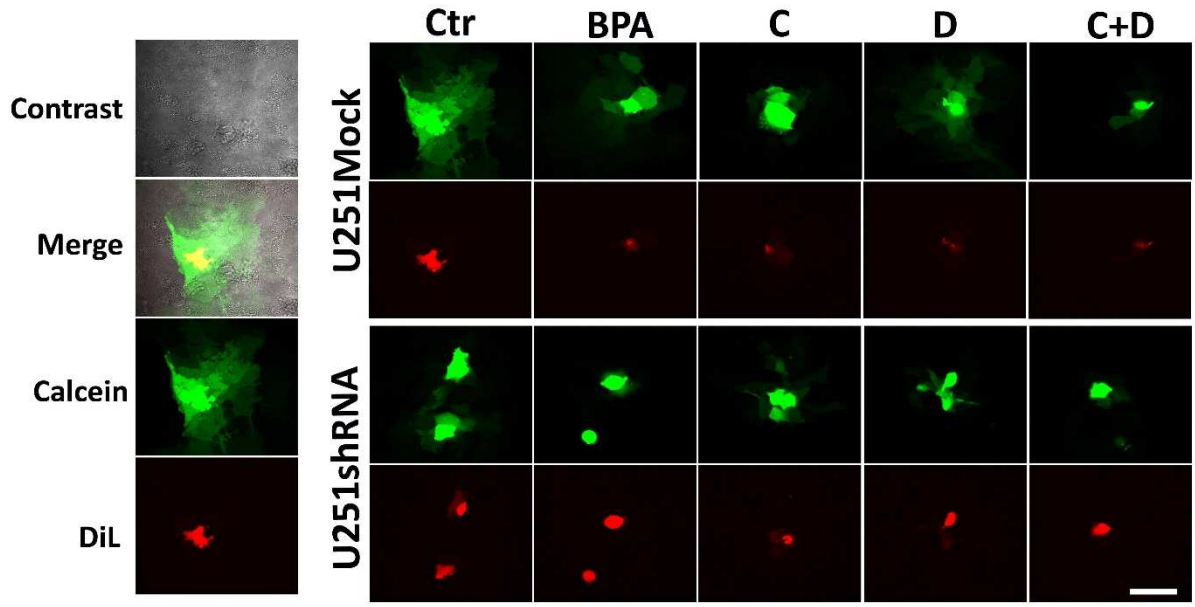


Figure 54 : Estimation de la capacité de communication jonctionnelle des cellules U251 Mock et U251 shRNA traitées au BPA et à ses dérivés chlorés par la technique du parachute. *Cette approche montre par diffusion de calcéine (vert) depuis la cellule donneuse colorée par un colorant lipophile membranaire, DiI (rouge), que la communication jonctionnelle des cellules U251 Mock et shRNA est fonctionnelle quel que soit le traitement. Barre d'échelle : 50 µm.*

Dans le but de quantifier cette CIJG des cellules U251, nous avons utilisé la technique du scrape loading pour laquelle un autre traceur fluorescent, le Lucifer Yellow, est usité. Cette molécule hydrophile (457 Da) est capable de diffuser à travers les jonctions communicantes après avoir été introduite à l'intérieur de la cellule par microinjection ou par endommagement

(scraping) de la membrane plasmique. Une fois incorporée à l'intérieur des cellules endommagées, le traceur peut ensuite diffuser librement depuis les cellules endommagées vers les cellules adjacentes non endommagées par les jonctions communicantes (Figure 55).

Par cette approche, le traitement au BPA et ses dérivés chlorés diminuent de manière significative la CIJG des cellules U251 Mock (Figure 55). En revanche, pour les cellules U251 shRNA, la situation est plus hétérogène et indique soit une absence d'effet après traitement au BPA ou au cocktail (C+D) soit une augmentation significative de la CIJG après traitement aux dérivés chlorés séparés (C, D) (Figure 55).

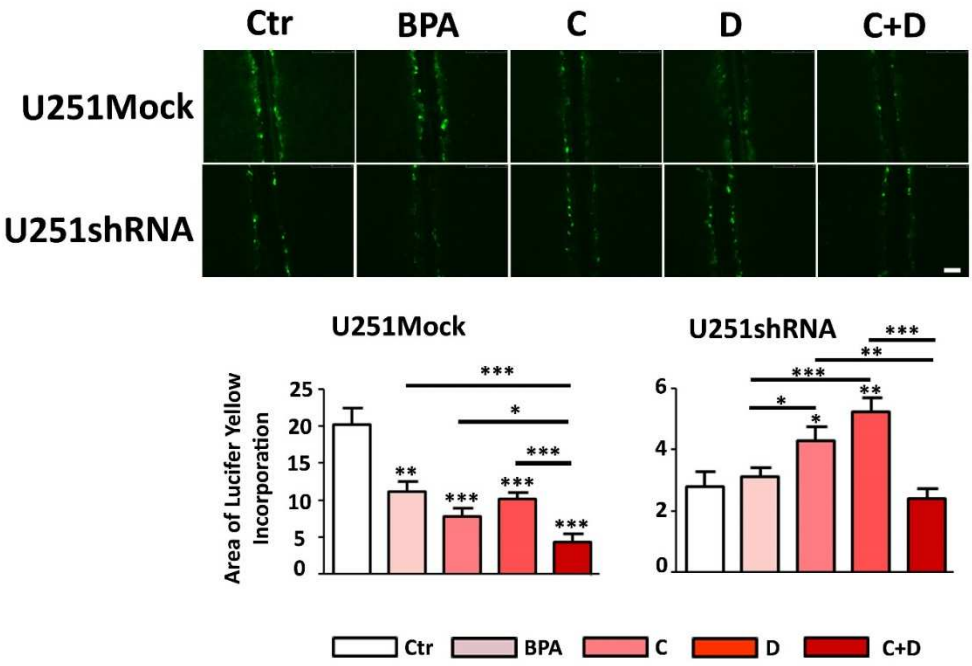


Figure 55 : Estimation de la capacité de communication jonctionnelle des cellules U251 Mock et U251 shRNA traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés par la technique du scrape loading. *Les images correspondant à la diffusion du Lucifer Yellow sont montrées pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA dans les différentes conditions testées (Ctr, BPA, C, D, C+D). La diffusion du Lucifer Yellow à partir des cellules endommagées (scrape), et correspondant à la capacité de communication jonctionnelle, a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Cette quantification, indiquée sous la forme d'une surface de diffusion (area of Lucifer Yellow incorporation) est représentée sous la forme d'histogrammes pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA, respectivement. Cette approche confirme que les traitements quels qu'ils soient diminuent de manière significative la communication jonctionnelle des cellules U251 Mock. L'effet est plus hétérogène pour les cellules U251 shRNA pour lesquelles la communication jonctionnelle est soit inchangée (BPA, C+D) soit augmentée (C, D). Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM (n=3). Barre d'échelle : 100 µm.*

Pour résumer, les traitements, quels qu'ils soient, diminuent donc la CIJG des cellules U251 Mock alors que cette communication semble être identique ou légèrement augmentée dans les cellules U251 shRNA, où la Cx43 est réprimée.

Enfin, pour compléter l'étude des fonctions « canal » de la Cx43, son activité hémicanal a été estimée par la technique du dye uptake. Cette technique consiste à visualiser l'incorporation intracellulaire de Lucifer Yellow par incubation des cultures cellulaires dans un milieu sans calcium entraînant l'ouverture des hémicanaux constitués de connexines. A cette fin, et pour être certain que l'activité hémicanal observée est spécifique de la Cx43, nous avons utilisé l'acide fulfénamique (FFA) qui est un inhibiteur d'hémicanaux constitués de Cx43 (Figure 56).

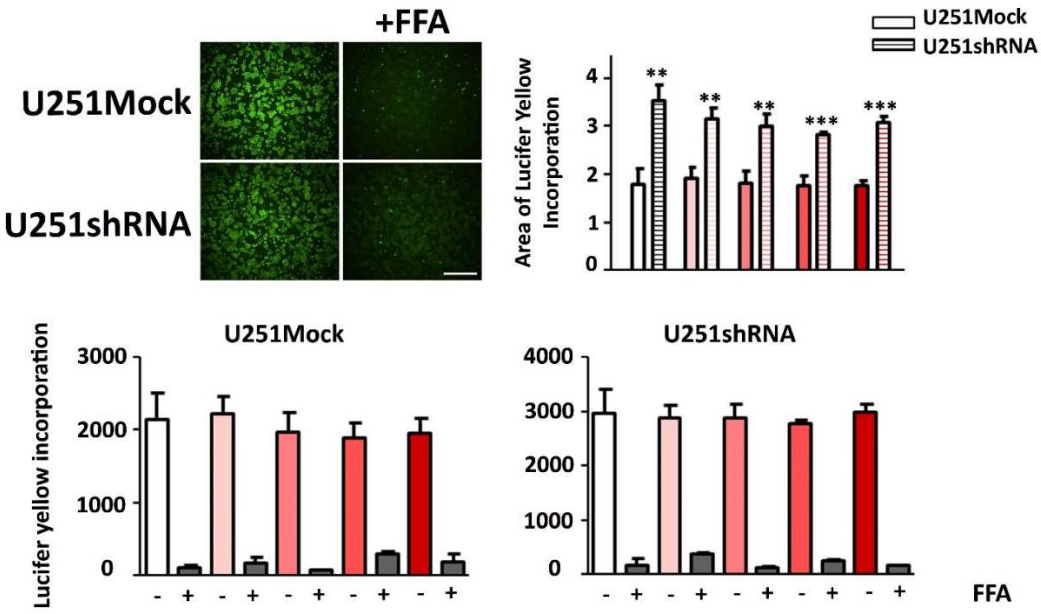


Figure 56 : Étude de l'activité hémicanal dans les cellules U251Mock et U251shRNA traitées ou non par le BPA et ses dérivés chlorés. *Les photos réalisées au macroscope à fluorescence permettent de visualiser l'incorporation de Lucifer Yellow (vert) dans les cellules U251 Mock et U251 shRNA en présence ou non de FFA, inhibiteur spécifique de l'activation d'hémicanaux constitués de Cx43 (Barre d'échelle : 2 mm). La quantification des points d'incorporation du Lucifer Yellow a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ et est représentée sous forme d'histogrammes ± SEM (n=3).*

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative d'activité hémicanal quelle que soient les conditions de traitement utilisées ni par rapport à l'absence de traitement aussi bien pour les cellules U251 Mock que pour les cellules U251 shRNA (Figure 56).

On peut en conclure d'une manière générale que les traitements n'agissent pas sur la fonction hémicanal de la Cx43. En revanche, ils agissent sur la fonction communicante de la Cx43 en diminuant ou en augmentant la communication jonctionnelle selon le niveau d'expression de la Cx43 exprimée par les cellules.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Protéines		↗	≈	≈	↘	↘	↗	↗	≈	≈
Localisation	Membrane	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme (Mb+)	Cytoplasme (Mb++)	Membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane
CIJG		↘	↘	↘	↘	↘	≈	↗	↗	≈
Hémicanal		≈	≈	≈	≈	↗	≈	≈	≈	≈

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

2. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur l'expression et les fonctions de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes:

2.1. Niveau d'expression et localisation de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes de souriceaux exposés au BPA et à ses dérivés chlorés

Les astrocytes constituent une part importante de l'environnement tumoral immédiat des cellules de glioblastome. En lien avec notre projet, nous avons caractérisé des cultures primaires d'astrocytes exprimant différents niveaux de Cx43 du fait de leur provenance de souriceaux $Cx43^{+/+}$ ou $Cx43^{+/-}$. Et afin d'établir un parallèle avec les données obtenues à partir des cellules U251 de glioblastome, nous avons étudié les effets du BPA et de ses dérivés

chlorés sur les niveaux d'expression et la localisation de la Cx43 dans ces cultures primaires d'astrocytes. A la différence des cellules U251 de glioblastome, les traitements au BPA et à ses dérivés chlorés ont été réalisés quotidiennement *in vivo* sur des souris mères $Cx43^{+/+}$ fécondées par des souris mâles $Cx43^{+/-}$ depuis le jour E0 jusqu'à la naissance (J0) et durant l'allaitement (J0-J4) des souriceaux (Figure 57A). Les effets du BPA et de ses dérivés chlorés étudiés au niveau des cultures primaires d'astrocytes résultent donc d'une exposition réalisée au cours de la gestation et de l'allaitement des souriceaux sauvages ($Cx43^{+/+}$) ou hétérozygotes ($Cx43^{+/-}$) d'où elles proviennent.

Dans un premier temps, l'effet de ces traitements réalisés *in vivo* a été estimé sur l'expression de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes issus de souriceaux $Cx43^{+/+}$ (Astrocytes WT) et $Cx43^{+/-}$ (Astrocytes +/-). Cette étude a été réalisée aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, par RT-PCR quantitative ou Western blot, respectivement.

Les résultats obtenus montrent que le niveau d'expression des ARNm de la Cx43 est augmenté dans les astrocytes WT issus de souriceaux dont les mères ont été traitées au BPA. Concernant l'exposition aux molécules chlorés, le taux d'ARNm reste inchangé par rapport aux conditions contrôles après traitement à la molécule C et au mélange C+D. En revanche, une augmentation du niveau des ARNm de la Cx43 est observée après traitement au dérivé chloré D (Figure 57B). Cet effet a également été observé dans les astrocytes +/- mais uniquement par traitement au BPA. De plus, comme attendu, l'expression transcriptionnelle de la Cx43 des astrocytes +/- est inférieure à celle des astrocytes WT.
Au niveau protéique, l'expression de la Cx43 est augmentée significativement dans les astrocytes issus de souriceaux dont les mères ont été traitées au BPA ou à ses dérivés chlorés quel que soit leur génotype (Figure 57B).

En conclusion, malgré des taux d'ARNm majoritairement inchangés après traitement, les astrocytes WT et +/- présentent une augmentation de l'expression de la Cx43 après l'exposition au BPA et à ses dérivés chlorés.

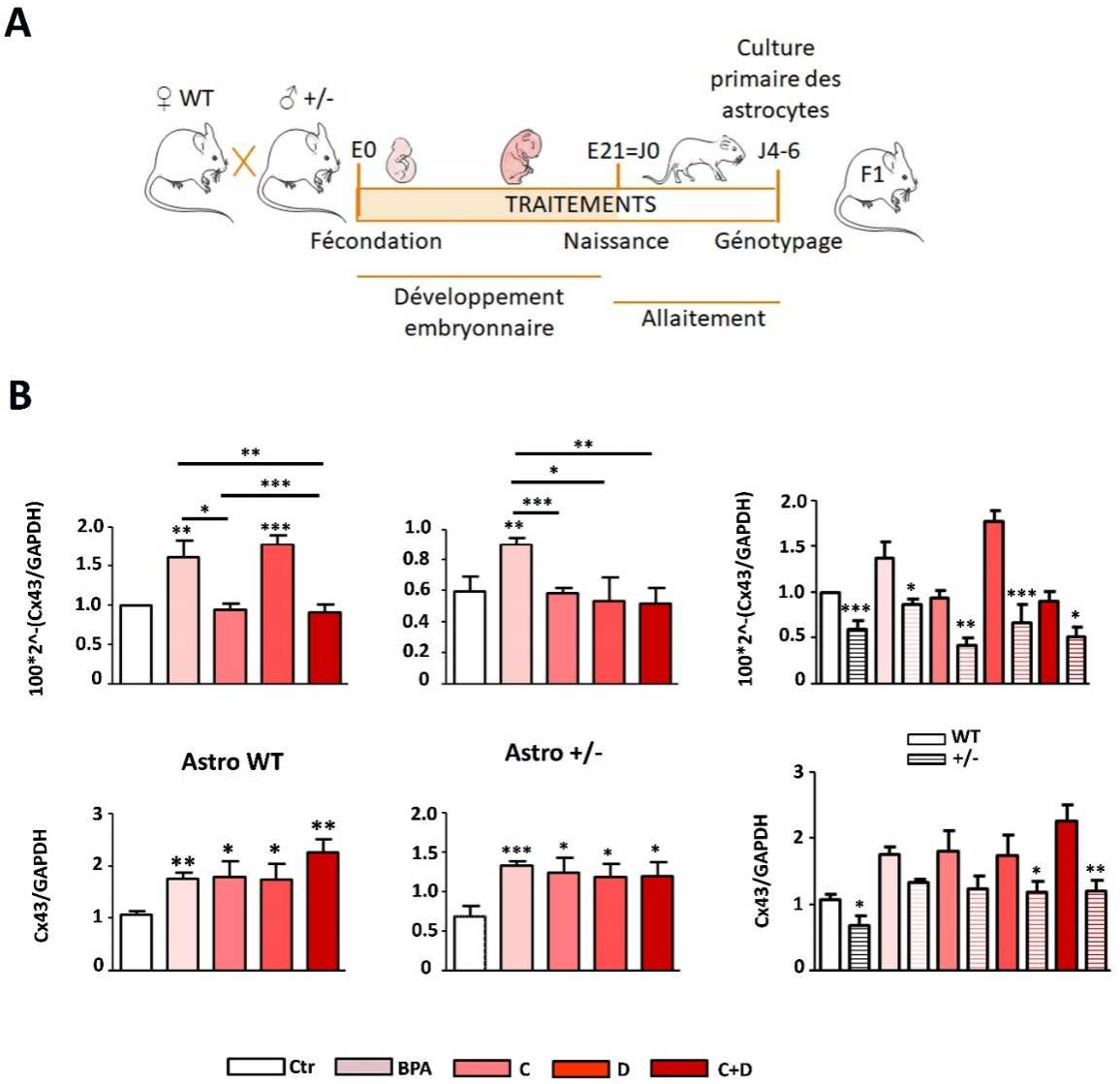


Figure 57 : Expression de la Cx43 (ARNm et protéine) dans les astrocytes primaires issus de souriceaux (Cx43$^{+/-}$ et Cx43$^{+/+}$) traités ou non durant leur gestation et l'allaitement au BPA et à ses dérivés chlorés (C, D, C+D). A) *Protocole d'exposition au BPA ou à ses dérivés chlorés durant toute la gestation et l'allaitement des souriceaux.* ***B)*** *Le niveau d'expression d'ARNm de la Cx43 a été analysé par RT-PCR quantitative en normalisant l'ARNm de la Cx43 par rapport à l'ARNm de la GAPDH pris comme référence. Pour chaque condition, les données sont présentées par rapport à la condition contrôle sous forme d'histogrammes réalisés à l'aide du logiciel Graph Prism ± SEM (n=3 ; Partie supérieure de la figure). Le niveau de l'expression protéique de la Cx43 a été analysé par Western blot. Les bandes détectées correspondant à la Cx43 ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Les données sont présentées par rapport à la condition contrôle sous forme d'histogrammes réalisés à l'aide du logiciel Graph Prism ± SEM (n=3 ; Partie inférieure de la figure). Les résultats obtenus à partir des astrocytes issus de souriceaux Cx43$^{+/-}$ et Cx43$^{+/+}$ sont indiqués par Astro +/- et Astro WT, respectivement. Ces résultats confirment que les astrocytes issus de souriceaux Cx43$^{+/+}$ expriment davantage la Cx43 que ceux issus de souriceaux Cx43$^{+/-}$. Ces résultats montrent également que si la quantité de protéine Cx43 est augmentée significativement après traitement (BPA, C, D, C+D) quel que soit le génotype des cellules, l'effet est plus hétérogène au niveau de l'ARNm.*

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	≈	↗	≈	↘	↗	≈	≈	≈
Protéines		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour astrocytes WT.*
***Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et astrocytes +/-.*
***Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/-.*

Afin de voir si l'effet des différents traitements réalisés *in vivo* est associé à des variations de localisation de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes, celle-ci a été estimée par immunofluorescence indirecte. Par cette approche, nous avons constaté que la Cx43 est localisée au niveau de la membrane plasmique mais aussi dans le cytoplasme des astrocytes en culture quels que soient les traitements réalisés (Figures 58 et 59).

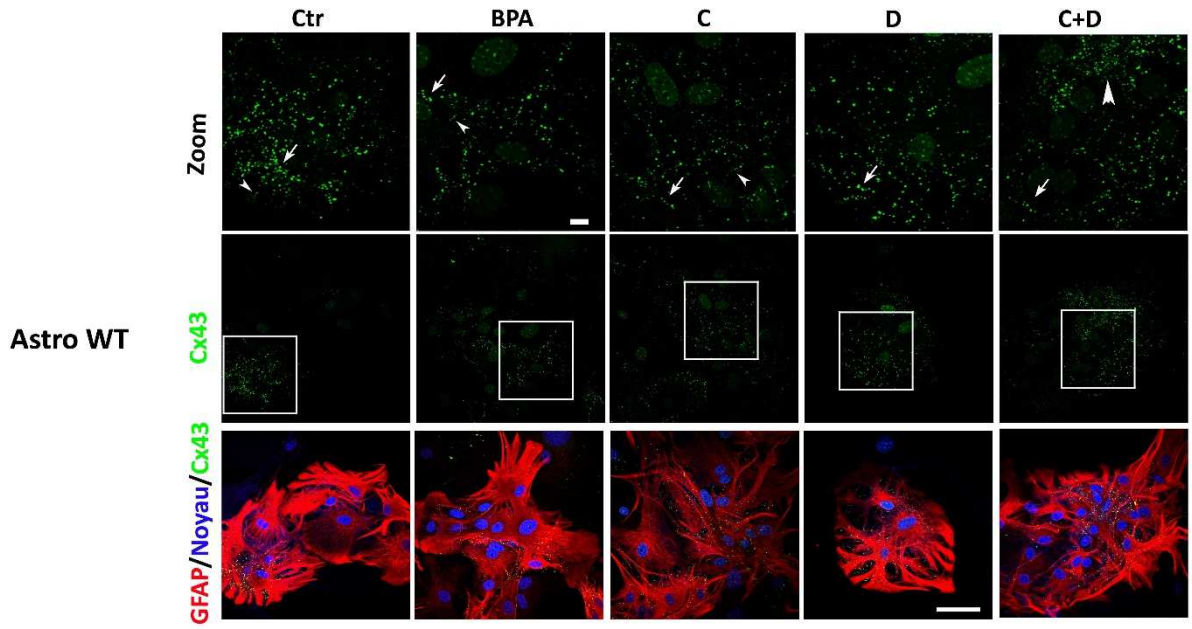


Figure 58 : Localisation de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes WT (Astro WT) issues de souriceaux dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *Quels que soient les traitements (Ctr, BPA, C, D, C+D), la Cx43 (vert) est détectée aussi bien au niveau des membranes plasmiques (têtes de flèche) que dans le cytoplasme (flèches) des astrocytes caractérisés par une forte expression de GFAP (rouge). Il semble toutefois que le marquage cytoplasmique de la Cx43 soit plus important dans le cytoplasme pour les astrocytes issus de certaines conditions (Ctr, C+D). Les rectangles blancs représentent les zones agrandies (zoom). Les noyaux des astrocytes sont colorés en bleu. Barre d'échelle : 50 µm ; zoom : 10 µm.*

En particulier, dans le cas des astrocytes WT, l'immunofluorescence révèle une forte présence de la Cx43 au niveau membranaire, caractéristique de plaques jonctionnelles, quels que soient les traitements, avec, cependant, une localisation cytoplasmique plus marquée pour les cultures issues des conditions non traitées (Ctr) ou traitées par le cocktail (C+D) (Figures 58).

En revanche, pour les astrocytes +/-, la localisation membranaire de la Cx43 apparaît pour chaque condition, accompagnée d'une délocalisation cytoplasmique plus importante pour les conditions BPA, C et D (Figure 59).

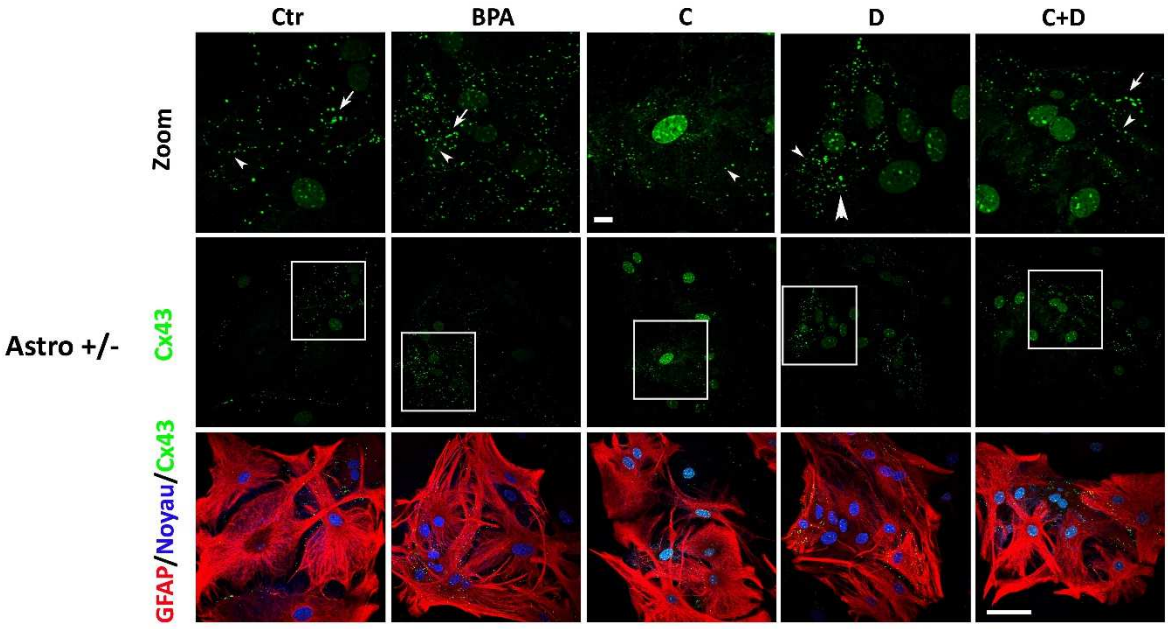


Figure 59 : Localisation de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes +/- (Astro +/-) issues de souriceaux dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *Quels que soient les traitements (Ctr, BPA, C, D, C+D), la Cx43 (vert) est détectée aussi bien au niveau des membranes plasmiques (têtes de flèche) que dans le cytoplasme (flèches) des astrocytes caractérisés par une forte expression de GFAP (rouge). En revanche, une délocalisation cytoplasmique plus importante est visible pour certaines conditions (BPA, C, D). Les rectangles blancs représentent les zones agrandies (zoom). Les noyaux des astrocytes sont colorés en bleu. Barre d'échelle : 50 µm ; zoom : 10 µm.*

En conclusion, l'augmentation de l'expression de la Cx43, observée au sein des cultures primaires d'astrocytes WT et +/-, après les expositions au BPA et ses dérivés chlorés, est accompagnée d'une localisation majoritairement membranaire de cette protéine.

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	≈	↗	≈	↘	↗	≈	≈	≈
Protéines		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Localisation	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb
	Cyto+	cyto	cyto	cyto	Cyto+	Cyto	Cyto+	Cyto+	Cyto+	cyto

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour astrocytes WT.*
***Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et astrocytes +/-.*
***Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/-.*

2.2. Etude fonctionnelle de la Cx43 d'astrocytes issus de souriceaux dont les mères ont été traitées au BPA et ses dérivés chlorés

Après avoir observé ses niveaux d'expression ainsi que sa localisation dans les cultures primaires d'astrocytes WT ou +/-, les différentes fonctions, hémicanal et de communication jonctionnelle, de la Cx43 ont été étudiées par les techniques du dye uptake et du scrape loading, respectivement.

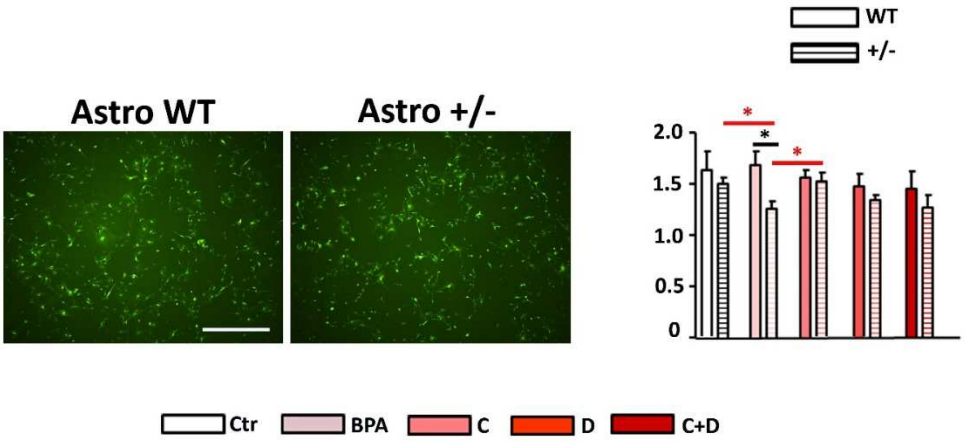


Figure 60 : Etude de l'activité hémicanal de la Cx43 dans les cultures primaires d'astrocytes (WT et +/-) issues de souriceaux dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *Les photos réalisées au macroscope à fluorescence permettent de visualiser l'incorporation de Lucifer Yellow (vert) dans les astrocytes $Cx43^{+/+}$ (Astro WT) et $Cx43^{+/-}$ (Astro +/-) issus de souriceaux dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés (Ctr, BPA, C, D, C+D). La quantification des points d'incorporation du Lucifer Yellow a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ et est présentée sous forme d'histogrammes ± SEM (n=3). *, Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et +/-. *****, Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/-. Barre d'échelle : 2 mm.*

D'après nos résultats, l'activité hémicanal n'est pas modifiée quelles que soient les conditions pour les astrocytes WT (Figure 60). En revanche pour les astrocytes +/-, on note une diminution significative de cette activité après le traitement au BPA. Et contrairement à ce que nous avions observé dans le cas des cellules U251, les astrocytes +/- possèdent une activité hémicanal similaire, voire diminuée (traitement BPA), à celle des astrocytes WT. En conclusion, les traitements ne semblent avoir globalement que très peu d'effet sur la fonction hémicanal de la Cx43.

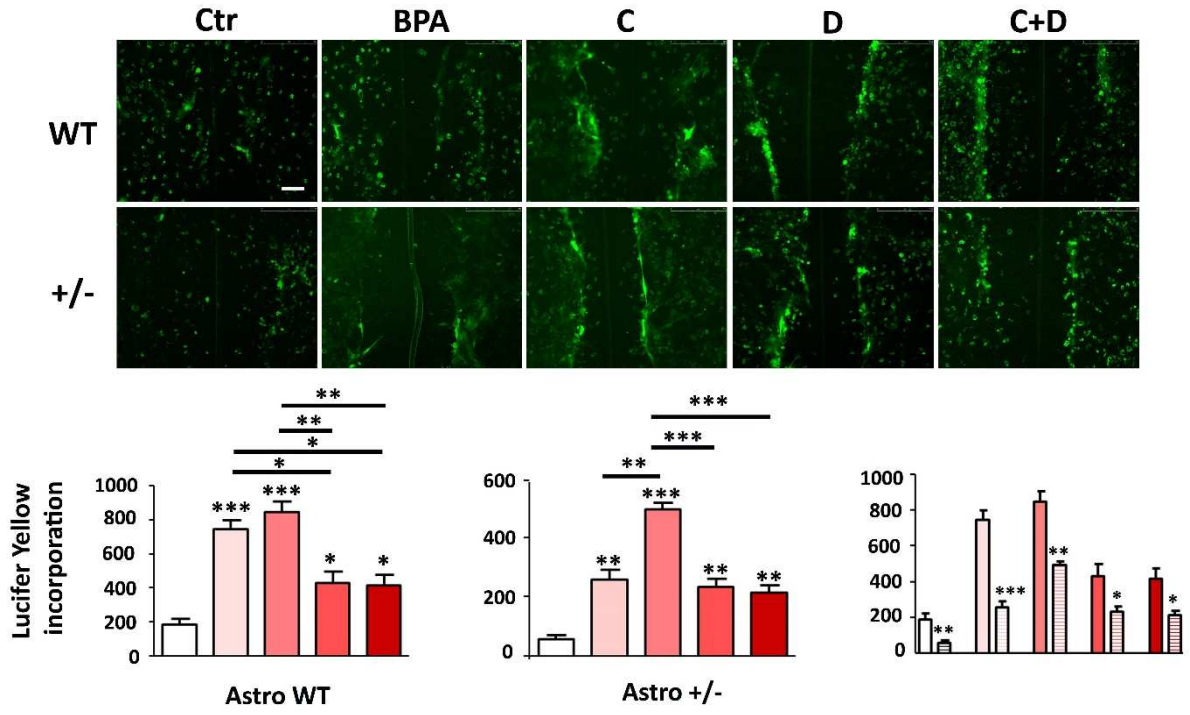


Figure 61 : Estimation de la capacité de communication jonctionnelle d'astrocytes (WT et +/-) issus de souriceaux dont les mères ont été traitées ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *La capacité de communication jonctionnelle des astrocytes a été estimée par la technique du scrape loading en utilisant le Lucifer Yellow. Les images correspondant à la diffusion du Lucifer Yellow sont montrées pour les astrocytes WT et +/- issus de souriceaux dont les mères ont été traitées au BPA et ses dérivés chlorés (BPA, C, D, C+D) ou non (Ctr). La diffusion du Lucifer Yellow à partir des astrocytes endommagés (scrape), et correspondant à la capacité de communication jonctionnelle, a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Cette quantification, indiquée sous la forme d'une surface de diffusion (Lucifer Yellow incorporation) est représentée sous la forme d'histogrammes pour les astrocytes WT et +/-, respectivement. Cette approche indique que les traitements quels qu'ils soient augmentent de manière significative la communication jonctionnelle des astrocytes indépendamment de leur génotype. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM (n=2). Barre d'échelle : 100 µm*

L'activité hémicanal de la Cx43 n'étant pas modifiée par les conditions testées, nous avons évalué si celles-ci agissaient sur la capacité de CIJG des astrocytes.

Pour cela, nous avons utilisé la technique du scrape loading dont les résultats montrent que les traitements au BPA et à ses dérivés chlorés augmentent de manière significative la CIJG des astrocytes WT et +/- (Figure 61). Cette augmentation de la CIJG semble être associée à une forte présence membranaire de la Cx43 indépendamment des conditions de traitement. A noter tout de même une différence significative de cette fonction de communication entre les astrocytes WT et +/-, et ceci quels que soient les traitements.

En conclusion, les expositions *in vivo* au BPA et à ses dérivés chlorés augmentent la CIJG des astrocytes WT et +/-.

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	≈	↗	≈	↘	↗	≈	≈	≈
Protéines		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Localisation	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb
	Cyto+	cyto	cyto	cyto	Cyto+	Cyto	Cyto+	Cyto+	Cyto+	cyto
CIJG		↗+	↗+	↗	↗	↘	↗	↗+	↗	↗
Hémicanal		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈	≈	≈

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour astrocytes WT.*
***Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et astrocytes +/-.*
***Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/-.*

3. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les capacités de migration et d'invasion des cellules U251 de glioblastome humain

3.1. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur la capacité de migration 2D des cellules U251

Dans le but d'estimer l'effet du BPA et de ses dérivés chlorés sur la capacité de migration en 2D des cellules U251 de glioblastome humain, nous avons utilisé la technique du « wound healing ». Afin que cette estimation soit suffisamment précise, cette technique a été réalisée

avec l'outil « julistage » qui permet de suivre en temps réel la migration des cellules depuis la périphérie de la blessure vers son centre.

Dans un premier temps, nous avons effectué ce test de migration 2D sur des astrocytes (WT et +/-) provenant de cultures primaires (Figure 62A). Et comme attendu, les astrocytes se sont révélés être doués d'une très faible capacité de migration et ce, quel que soit leur génotype. Cependant, cette capacité de migration bien que faible l'est davantage parmi les astrocytes issus de souriceaux dont les mères étaient exposées au BPA (astrocytes WT), à la molécule D ou au cocktail C+D (astrocytes WT et +/-).

En ce qui concerne les cellules U251 de glioblastome humain, la capacité de migration 2D reste identique après les traitements au BPA, quelles que soient les cellules. Cependant, les traitements aux dérivés chlorés du BPA (C, D et C+D) diminuent la capacité de migration 2D des cellules U251 Mock, alors qu'ils l'augmentent pour les cellules U251 shRNA (Figure 65B). De plus, il est à noter que cette capacité migratoire des cellules U251 shRNA est plus importante que celle des cellules U251 Mock après traitement à la molécule D ou au cocktail C+D (Figure 62B). Mais en condition contrôle et après exposition au BPA, la capacité de migration 2D des cellules U251 shRNA est soit diminuée soit identique à celle des cellules U251 Mock, respectivement (Figure 62B).

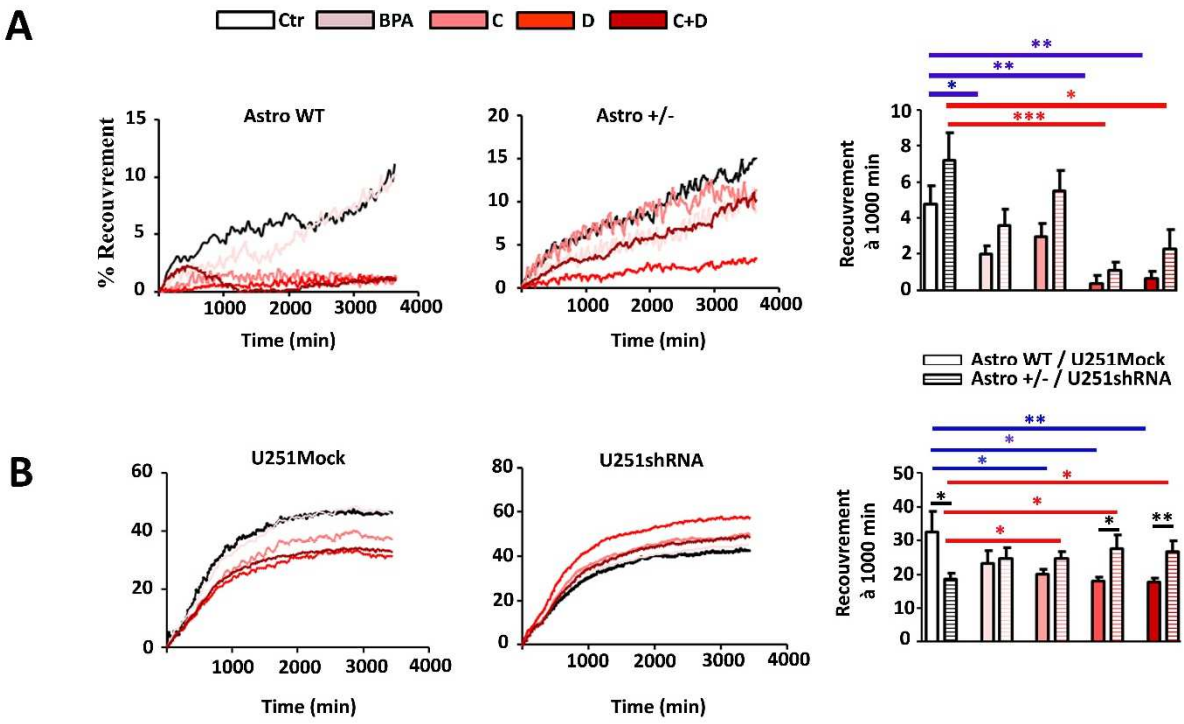


Figure 62 : Estimation de la capacité de migration 2D des astrocytes (WT, +/-) et des cellules U251 de glioblastome humain (U251 Mock, U251 shRNA) par la technique du wound healing après traitement ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *Les données obtenues à l'aide du JuLI Stage sont représentées sous forme de courbes montrant l'évolution du pourcentage de recouvrement de la blessure en fonction du temps (minutes) pendant une période de 3 jours (n=3) pour les astrocytes WT (Astro WT) et +/- (Astro +/-) ainsi que pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA traités ou non au BPA et à ses dérivés chlorés (Ctr, BPA, C, D, C+D). Les histogrammes rassemblés à droite de la figure montrent l'état du recouvrement de la blessure 10h après son initiation (± SEM ; n=3).* ***, Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et +/- ou entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA.* ***, Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/- ou les cellules U251 shRNA.* ***, Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes WT ou les cellules U251 Mock.***

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		↘	≈	↘	↘	≈	≈	≈	↘	↘
U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈ (≈)	↗ (≈)	↗ (↗)	↗ (↗)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour astrocytes WT ou cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et astrocytes +/- ou entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/- ou cellules U251 shRNA.*

3.2. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur les capacités de migration et d'invasion 3D des cellules U251

L'étude de la capacité de migration et d'invasion en trois dimensions (migration et invasion 3D) des cellules U251 a été réalisée à l'aide d'un appareil double analyseur de cellules (xCELLigence ; RTCA DP) en temps réel. Cet appareil est conçu de telle façon que les cellules capables de passer à travers un filtre poreux, recouvert de matrigel (test d'invasion) ou pas (test de migration), adhèrent ensuite à la surface de microélectrodes placées sous le filtre. Cette adhésion favorise la conduction de courants électriques permettant alors une mesure cinétique quantitative de l'invasion ou de la migration cellulaires, à travers le filtre, depuis la chambre supérieure vers la chambre inférieure.

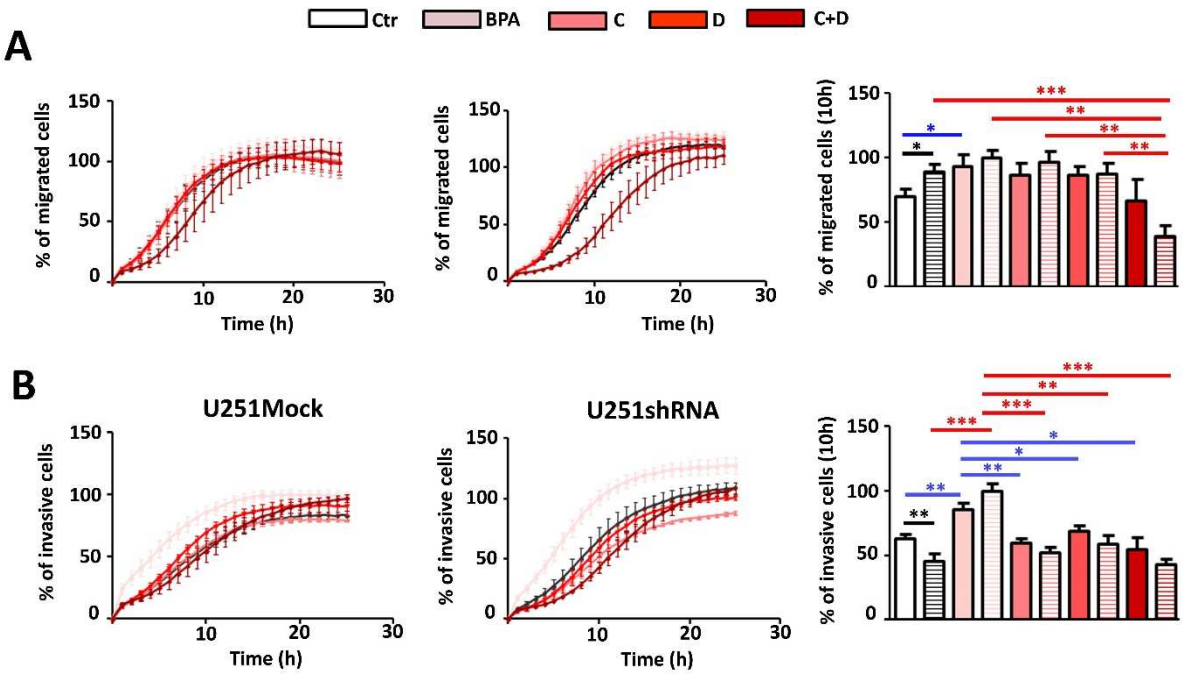


Figure 63 : Estimation de la capacité de migration et d'invasion 3D des cellules U251 Mock et U251 shRNA après traitement ou non au BPA et à ses dérivés chlorés. *Les données de migration (**A**) et d'invasion (**B**) 3D obtenues à l'aide du programme RTCA DP sont représentées sous forme de courbes en fonction du temps (heures) pendant une période de 24 heures (n=2) pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA. Les histogrammes rassemblés à droite de la figure permettent de comparer les capacités de migration (**A**) et d'invasion (**B**) 3D entre les cellules U251 Mock (colonnes non rayées) et les cellules U251 shRNA (colonnes rayées), 10 heures après le début de l'expérience (± SEM ; n=2). *****, Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock.*

Une mesure cinétique quantitative de la migration et de l'invasion cellulaire en 3D est réalisée toutes les 15 min sur une période de 24h (Figure 63 ; voir courbes). Par la suite, les histogrammes correspondants à la migration ou à l'invasion cellulaires durant la phase ascendante du processus (10h après l'initiation de l'expérimentation) ont été réalisés pour faciliter la comparaison entre nos différentes conditions de traitements et de cellules (Figure 63).

Les résultats de migration 3D montrent qu'après traitement au BPA, les cellules U251 Mock présentent une capacité migratoire plus importante par rapport aux conditions contrôle, contrairement aux autres traitements. En revanche, cette capacité de migration 3D reste inchangée après traitement au BPA pour les cellules U251 shRNA. Cependant, une diminution de la migration 3D est observée après traitement au cocktail C+D, pour les cellules U251 shRNA (Figure 63A). Enfin, les cellules U251 Mock et U251 shRNA présentent une capacité migratoire similaire, sauf en l'absence de traitement (Ctr) où les U251 shRNA migrent plus rapidement (Figure 63A), contrairement à ce que nous avons pu observer lors du test de migration 2D (Figure 62B).

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈ (≈)	↗ (≈)	↗ (↗)	↗ (↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	↘ (≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

En ce qui concerne la capacité d'invasion 3D, nos résultats montrent qu'un traitement au BPA permet d'augmenter ce processus pour les cellules U251 Mock (Figure 63B). En revanche les traitements aux dérivés chlorés ne semblent pas intervenir sur ce processus invasif. Des résultats similaires sont retrouvés pour les cellules U251 shRNA présentant une diminution d'expression de la Cx43. De plus, cette capacité est diminuée pour les cellules U251 shRNA comparé aux cellules U251 mock, et ceci seulement en condition contrôle. En d'autres termes, sans traitement, il semble que la capacité d'invasion est diminuée lorsque l'expression de la

Cx43 est réprimée par shRNA. En revanche, aucune différence de capacité d'invasion 3D n'est observée pour les autres traitements.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈(≈)	↗(≈)	↗(↗)	↗(↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈(≈)	≈(≈)	≈(≈)	↘(≈)
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗(≈)	≈(≈)	≈(≈)	≈(≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

3.3. Effet de l'exposition au BPA et ses dérivés chlorés sur la formation d'invadopodes par les cellules U251

L'acquisition de la capacité d'invasion est associée à la formation de protrusions cytoplasmiques, les invadopodes, qui sont impliqués dans la dégradation de composants de la matrice extracellulaire et qui favorisent l'invasion des tissus sains environnants par les cellules cancéreuses. C'est pourquoi après avoir estimé la capacité d'invasion des cellules U251 sous différentes conditions de traitement au BPA et à ses dérivés chlorés, nous nous sommes intéressés à quantifier l'effet de ces traitements sur la formation des invadopodes par ces cellules.

Les résultats obtenus montrent que le nombre d'invadopodes totaux formés par cellule est significativement plus élevé après traitement au BPA pour les cellules U251 Mock que pour les cellules U251 shRNA. En revanche aucune différence significative n'est retrouvée pour les autres traitements (Figure 64). Lorsque l'expression de la Cx43 est diminuée pour les cellules U251 shRNA, une augmentation du nombre total d'invadopodes est également observée après traitement au BPA, comparé aux conditions contrôles. Cet effet est également observé après traitement aux dérivés chlorés C et D (Figure 64).

De plus, en l'absence de traitement, il est intéressant de noter que le nombre d'invadopodes détecté par cellule U251 shRNA est réduit par rapport à celui des cellules U251 Mock. En

revanche, cette différence n'est plus observée après traitement au BPA ou à ses dérivés chlorés (Figure 64).

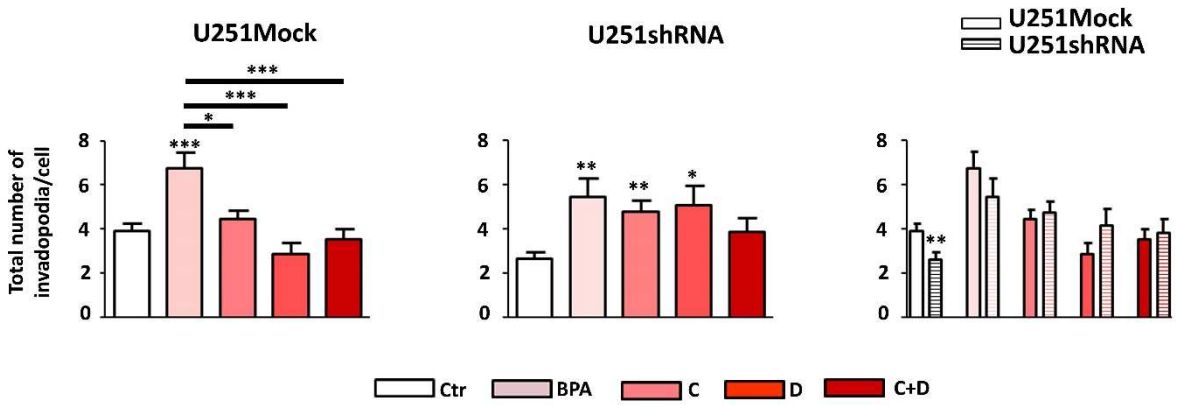


Figure 64 : Quantification des invadopodes formés par les cellules U251 Mock et U251 shRNA après traitement ou non par le BPA et ses dérivés chlorés. *Les histogrammes représentent le nombre total d'invadopodes compté par cellule U251 Mock ou U251 shRNA pour les différentes conditions de traitement testées (Ctr, BPA, C, D, C+D). L'histogramme présenté à droite de la figure permet de comparer les résultats obtenus entre les deux types cellulaires (± SEM ; n=3). En l'absence de traitement, le nombre d'invadopodes formés par cellule est plus élevé pour les U251 Mock que pour les cellules U251 shRNA. Le BPA augmente significativement le nombre de ces invadopodes dans les deux types cellulaires alors que les dérivés chlorés ne l'augmentent que pour les cellules U251 shRNA.*

L'augmentation de la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock et U251 shRNA après traitement au BPA que nous avions observée (Figure 63) peut donc être corrélée à cette augmentation du nombre d'invadopodes formés par ces cellules.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈ (≈)	↗ (≈)	↗ (↗)	↗ (↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	↘ (≈)
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	↗ (≈)	↗ (≈)	≈ (≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

3.4. Effet du milieu de culture d'astrocytes provenant de souriceaux exposés au cours de leur développement (*in utero* et allaitement) au BPA et ses dérivés chlorés sur la migration et l'invasion 3D des cellules U251

L'environnement tumoral étant capable d'influer sur le comportement des cellules cancéreuses par sécrétion de facteurs solubles, nous avons étudié les capacités de migration et d'invasion 3D des cellules U251 de glioblastome humain en présence de milieux de cultures primaires d'astrocytes WT ou +/- provenant de souriceaux préalablement exposés *in utero* et durant leur allaitement au BPA et ses dérivés chlorés.

3.4.1. Migration 3D

Reprenant l'approche expérimentale utilisée précédemment (Figure 63), nous avons procédé à la mesure cinétique quantitative des capacités de migration et d'invasion 3D des cellules U251 dans les conditions décrites, toutes les 15 min, durant une période de 24 heures (Figure 65).

En premier lieu, les résultats obtenus montrent qu'en présence du milieu d'astrocytes WT, nous n'observons plus de différence dans le processus migratoire des cellules U251 Mock, quel que soit le traitement. Une diminution de la capacité de migration 3D est tout de même trouvée, pour les cellules U251 shRNA après traitement au BPA (Figure 65A). Il faut noter que la capacité de migration des cellules U251 shRNA est moins importante que celle des cellules U251 Mock aussi bien en condition non traitée (Ctr) ou après que les astrocytes proviennent de souriceaux exposés au BPA. Cette différence de la capacité migratoire n'est pas retrouvée pour les astrocytes provenant de souriceaux exposés *in utero* aux molécules C, D ou au cocktail C+D.

Lorsque les cellules U251 Mock sont en présence du milieu provenant des cultures primaires d'astrocytes +/-, aucune différence de la capacité de migration n'est observée. En revanche, concernant les cellules U251 shRNA, cette capacité de migration augmente après traitement avec du milieu d'astrocytes +/- provenant de souriceaux exposés au cocktail C+D. La différence

de la capacité de migration entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA est plus marquée mais elle s'estompe après traitement au milieu conditionné provenant de souriceaux exposés au cocktail C+D (Figure 65B).

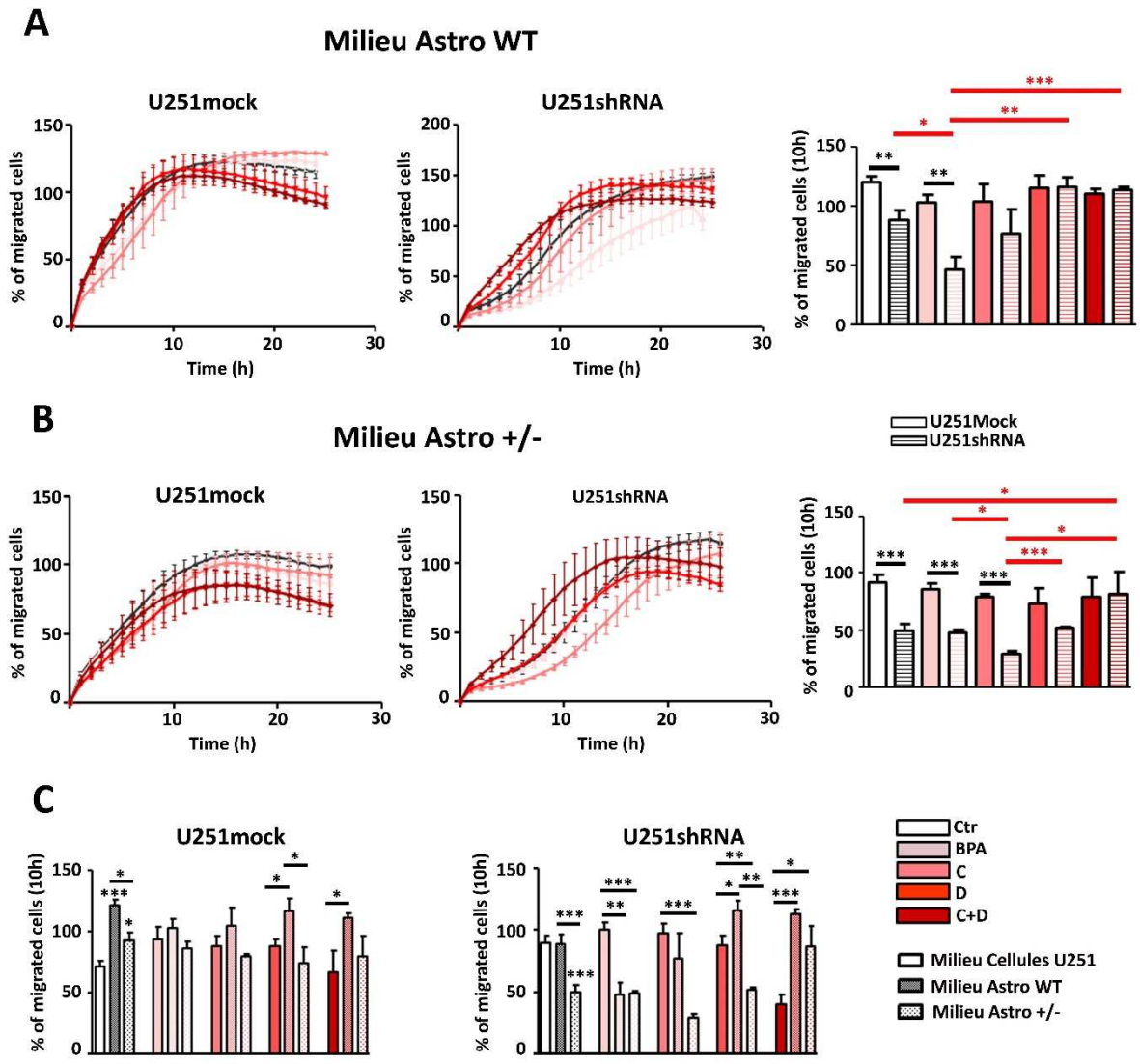


Figure 65 : Estimation de la capacité de migration 3D des cellules U251 Mock et shRNA en présence du milieu conditionné d'astrocytes WT ou +/- provenant de souriceaux traités ou non au BPA et ses dérivés chlorés. *Les données de migration 3D obtenues à l'aide du RTCA DP sont représentées sous forme de courbes en fonction du temps (heures) pendant une période de 24 heures (n=2) pour les cellules U251 Mock et shRNA en présence de milieux d'astrocytes WT (**A**) ou +/- (**B**). Les histogrammes rassemblés à droite de la figure permettent de comparer les capacités de migration 3D entre les cellules U251 Mock (colonnes non rayées) et les cellules U251 shRNA (colonnes rayées), 10 heures après le début de l'expérience (± SEM ; n=2) pour les conditions indiquées. **C)** Histogrammes permettant de comparer le pourcentage de migration 3D des cellules U251 Mock et U251 shRNA en présence des milieux conditionnés provenant des cellules U251 ou des astrocytes WT et +/-. *****, Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock.*

Pour les cellules U251 Mock, la capacité de migration augmente par l'ajout de milieu d'astrocytes WT issu de souriceaux non exposés (Ctr) ou exposés à la molécule D et au cocktail C+D. Aucune autre différence significative n'est cependant observée (Figure 65). La capacité de migration des cellules U251 Mock n'est pas affectée par les différents types de milieu, excepté le milieu d'astrocytes WT issu de souriceaux exposés à la molécule D ou au cocktail C+D (Figure 65).

En revanche, contrairement aux cellules U251 Mock, la capacité de migration des cellules U251 shRNA n'est pas augmentée après l'ajout des milieux de culture d'astrocytes sauf s'ils proviennent de souriceaux exposés à la molécule D (astrocytes WT) et au cocktail C+D (astrocytes WT et +/-). De plus, nous pouvons observer une diminution importante de la migration des cellules U251 shRNA lorsque ces cellules sont cultivées en présence du milieu des astrocytes +/-, sauf après exposition au cocktail C+D qui augmente cette migration.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	↘ (≈)
Migration 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	↘	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Migration 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (↘)	≈ (↘)	≈ (≈)	↗ (≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

3.4.2. Invasion 3D

Dans un deuxième temps, nous avons répété cette même série d'expériences afin de voir l'effet des conditions testées sur la capacité d'invasion 3D des cellules U251. Et par cette approche, des différences apparaissent selon que le milieu conditionné utilisé provienne d'astrocytes WT ou +/-. Ainsi, le milieu des astrocytes WT traité ou non n'est associé à aucune différence, par rapport au contrôle, de la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock. En revanche, la capacité invasive des U251 shRNA diminue en présence de milieu provenant d'astrocytes issu de souriceaux exposés *in utero* au BPA (Figure 66A).

Les cellules U251 Mock et shRNA présentent des capacités invasives identiques, sauf après exposition au BPA, où les cellules shRNA deviennent beaucoup moins invasives que les cellules U251 Mock.

En présence de milieu provenant d'astrocytes +/-, la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock reste inchangée quelle que soit l'exposition. En revanche, les cellules U251 shRNA présentent une diminution de leurs capacités invasives si les astrocytes sont issus de souriceaux préalablement exposés à la molécule C. De plus, ce processus invasif est moins important pour les cellules U251 shRNA par rapport aux cellules U251 Mock en présence de milieu conditionné provenant de souriceaux exposés *in utero* à la molécule C ou non exposés (Figure 66B).

La capacité d'invasion des cellules U251 Mock est plus importante avec l'ajout du milieu d'astrocytes WT issus de souriceaux exposés à la molécule D. Sinon aucune autre différence significative n'est observée pour ces cellules en présence de milieux d'autres cultures d'astrocytes WT (Figure 66B).

Finalement, les cellules U251 Mock ne présentent pas de différence de capacités invasives en présence des différents milieux astrocytaires. Seules en conditions contrôle et après exposition à la molécule D, ces capacités sont plus importantes en présence du milieu astrocytaire WT. Pour les cellules U251 shRNA, la capacité d'invasion 3D est plus importante en présence de milieu d'astrocytes WT provenant de souriceaux non traités (Ctr) ou exposés à la molécule D et au mélange C+D. Après invasion avec le milieu astrocytaire +/-, les cellules U251 shRNA ne présentent pas de différence dans leur fonction d'invasion avec les résultats d'invasion en milieu cellulaire, excepté pour les traitements au BPA, à la molécule C ou au cocktail C+D (Figure 66C).

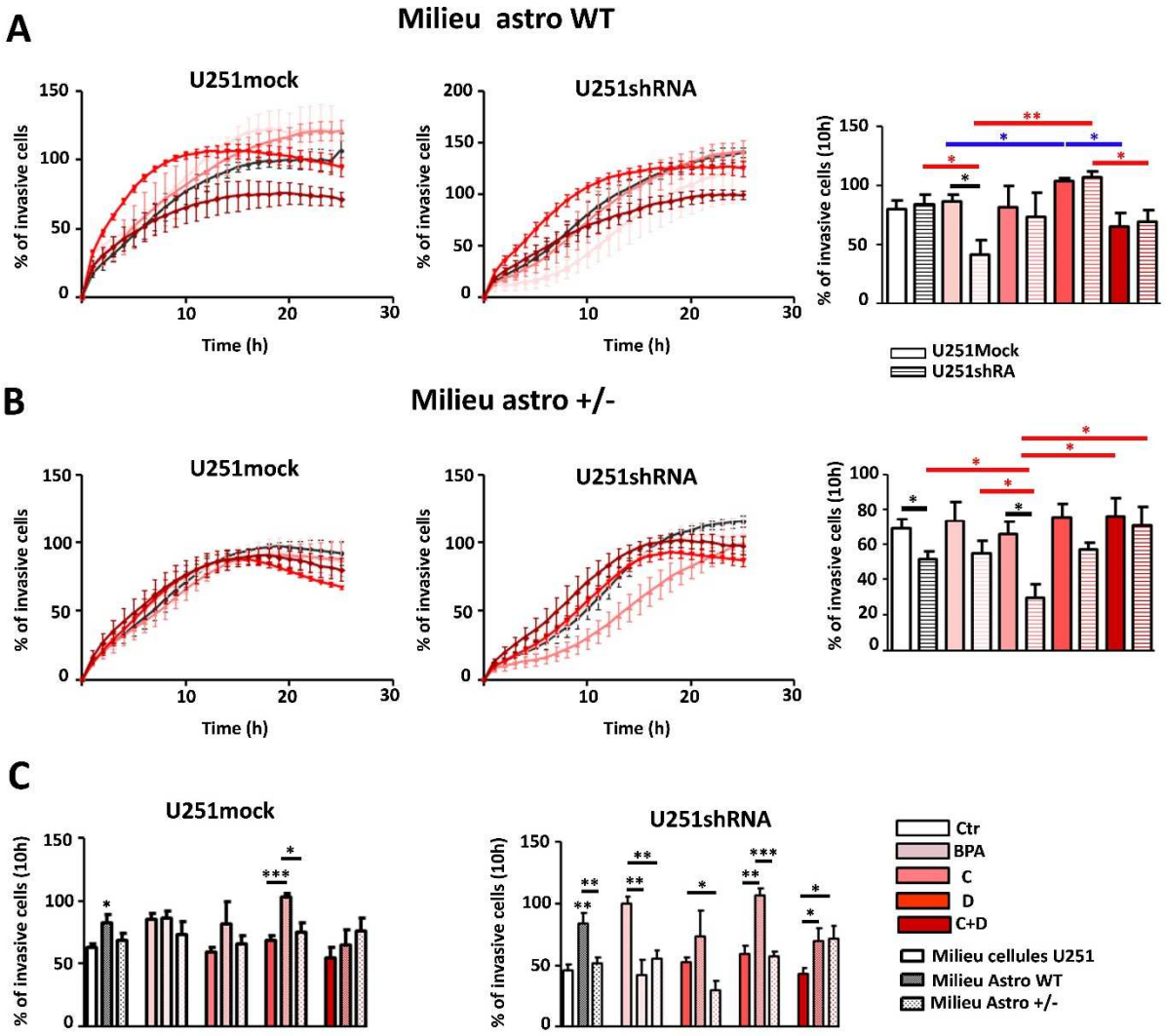


Figure 66 : Estimation de la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock et shRNA en présence du milieu conditionné d'astrocytes WT ou +/- provenant de souriceaux traités ou non au BPA et ses dérivés chlorés. *Les données de migration 3D obtenues à l'aide du programme RTCA DP sont représentées sous forme de courbes en fonction du temps (heures) pendant une période de 24 heures (n=2) pour les cellules U251 Mock et U251 shRNA en présence de milieux d'astrocytes WT (**A**) ou +/- (**B**). Les histogrammes rassemblés à droite de la figure permettent de comparer les capacités d'invasion 3D entre les cellules U251 Mock (colonnes non rayées) et les cellules U251 shRNA (colonnes rayées), 10 heures après le début de l'expérience (± SEM ; n=2) pour les conditions indiquées. **C**) Histogrammes permettant de comparer le pourcentage d'invasion 3D des cellules U251 Mock et U251 shRNA en présence des milieux conditionnés provenant des cellules U251 ou des astrocytes WT et +/-. *****, Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA. *****, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock.*

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	↗ (≈)	↗ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (≈)	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

3.5. Effet des milieux de culture d'astrocytes sur la formation d'invadopodes par les cellules U251

Après avoir estimé la capacité d'invasion 3D des cellules U251 sous l'effet de différents milieux de culture d'astrocytes WT ou +/-, nous avons quantifié le nombre d'invadopodes formés dans les différentes conditions testées.

Les résultats obtenus montrent, pour les cellules U251 Mock en présence du milieu d'astrocytes WT, que le nombre d'invadopodes totaux formés semble équivalent quelles que soient les expositions par rapport aux conditions contrôles. Cependant, il est possible d'observer des différences significatives selon les expositions réalisées. En effet, lorsque les astrocytes proviennent de souriceaux ayant été exposés à la molécule C, on assiste à une diminution du nombre d'invadopodes totaux par cellule par rapport au milieu d'astrocytes issu de souriceaux ayant été exposés au BPA. De même, le nombre d'invadopodes totaux est diminué lorsque les astrocytes proviennent de souriceaux ayant été exposés à la molécule C par rapport à ceux dont les souriceaux étaient exposés au cocktail C+D.

Pour les cellules U251 shRNA, en présence du milieu d'astrocytes WT, le nombre d'invadopodes est augmenté significativement si les astrocytes proviennent de souriceaux ayant été exposés à la molécule C et au cocktail C+D par rapport aux conditions contrôles. Une augmentation d'invadopodes entre le traitement BPA et les traitements C, D et C+D est également observée.

Après ajout des milieux astrocytaires +/-, aucune différence n'est observée pour les cellules U251 Mock. En revanche, pour les cellules U251 shRNA, une différence du nombre d'invadopodes totaux est observée entre les traitements au BPA et à la molécule C, entre les traitements C et au cocktail C+D ou entre les traitements à la molécule D et au cocktail C+D.

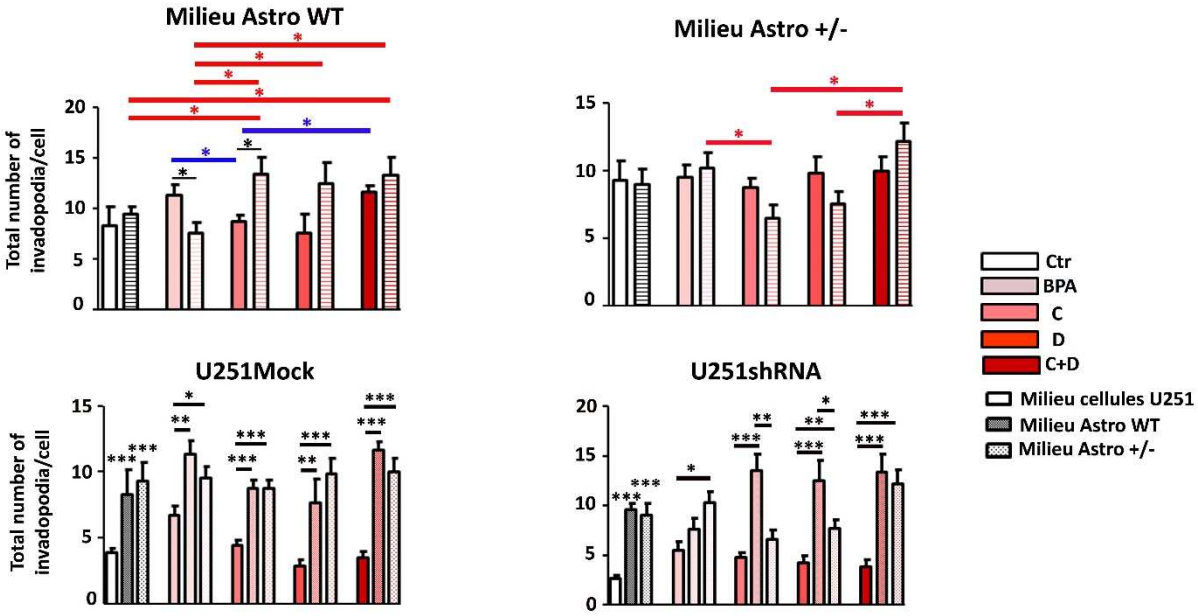


Figure 67 : Nombre d'invadopodes formés par cellule U251 mock et par cellule U251 shRNA en présence de milieux conditionnés d'astrocytes provenant de souriceaux exposés ou non au BPA et ses dérivés chlorés. *Les histogrammes ± SEM n=3 représentent le nombre d'invadopodes par cellule et leurs différents stades de formation en présence des différents milieux conditionnés. a : U251 mock/ astrocytes WT et +/- et b : U251 shRNA/ astrocytes WT et CX43$^{+/-}$.* ***, Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA.** ***, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.** ***, Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock.***

Lorsqu'une comparaison entre le nombre d'invadopodes totaux est réalisé en présence au pas des milieux astrocytaires WT ou +/-, nous pouvons noter que pour les cellules U251Mock, les milieux astrocytaire augmentent fortement la formation des invadopodes par rapport au milieu classique. En revanche, nous observons des effets plus contrastés pour les cellules U251 shRNA dont le niveau d'expression de la Cx43 est fortement diminué. En effet, après ajout du milieu provenant des astrocytes WT, le nombre d'invadopodes est augmenté en condition contrôle et pour tous les traitements par rapport au milieu classique, sauf pour le traitement au BPA. Les milieux provenant des astrocytes +/- quant à eux, augmentent le nombre

d'invadopodes quelles que soient les expositions des souriceaux sauf pour ceux exposés à la molécule C.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	↗ (≈)	↗ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	≈ (↘)	↗ (↗)	≈ (≈)	↗ (≈)
Invasion 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (≈)	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	≈	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)

***Tableau récapitulatif : Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

PARTIE 5 : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Le caractère invasif du glioblastome est responsable chez le patient de récurrences particulièrement difficiles à traiter. Comprendre les mécanismes moléculaires de cette capacité invasive représente donc un enjeu d'importance. C'est dans ce but que les précédentes études réalisées au laboratoire ont montré qu'une protéine des jonctions gap, la connexine43 (Cx43), est impliquée dans le processus d'invasion de ces cellules tumorales. Ces études établissaient, en particulier, une corrélation entre la capacité d'invasion (*in vitro, ex vivo*) et le niveau d'expression de cette protéine **(Strale et al., 2012)**.

Et plus précisément, par nos travaux plus récents, il apparaît que la Cx43 est présente au niveau des invadopodes qui sont des prolongements cellulaires nécessaires au processus invasif. Ces travaux suggèrent que la Cx43 pourrait ainsi intervenir à la fois dans la formation des invadopodes mais aussi dans leur fonction de dégradation de la matrice extracellulaire. Le rôle joué par la Cx43 dans ce processus serait celui d'une protéine de liaison favorisant, par des interactions de protéines-clés nécessaires, la polymérisation du cytosquelette d'actine et donc la formation, l'allongement et la maturation des invadopodes. Les autres fonctions possibles de la Cx43, telles que la fonction « hémicanal » ou d'établissement de la communication intercellulaire par jonctions gap (CIJG) semblaient, respectivement, soit inhibitrice de la fonction de dégradation de la matrice extracellulaire, soit incompatible avec la formation des invadopodes **(Chepied et al., soumis).**

Au-delà des cellules cancéreuses elles-mêmes, les multiples interactions qu'elles établissent au sein de leur microenvironnement sont également importantes à considérer en ce qui concerne la progression tumorale en contribuant à la prolifération, l'invasion et la résistance aux traitements **(Charles et al., 2011; Li et al., 2017)**. Le laboratoire avait d'ailleurs précédemment montré que le processus invasif des cellules de glioblastome pouvait être perturbé dans un microenvironnement présentant des cellules astrocytaires hétérozygotes pour la Cx43 **(Strale et al., 2012).** Par ailleurs, certains polluants comme le BPA et ses composés chlorés peuvent perturber des processus biologiques tels que la reproduction ou le métabolisme par leurs effets œstrogéniques, et surtout ont été décrits comme pouvant être mutagènes et cancérigènes **(Michałowicz, 2014)**.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier, dans ce travail de thèse, l'implication de la Cx43 dans le processus invasif de cellules de glioblastome (cellules U251) en lien avec un

microenvironnement (astrocytes) sain ou préalablement exposé au BPA et à ses dérivés chlorés.

La première partie du travail de cette thèse porte sur le niveau d'expression de la Cx43 au sein des cellules U251 et des astrocytes après exposition aux BPA et ses dérivés chlorés *(cf. Tableaux récapitulatifs 1 et 2)*.

Par cette étude, il apparaît que le BPA induit une augmentation de l'expression de la Cx43, quel que soit son niveau initial (clones U251 Mock et U251 shRNA). En revanche, selon le niveau d'expression de la Cx43 endogène dans les clones considérés, les traitements aux dérivés chlorés du BPA (seuls ou en cocktail) entraînent des effets différents. Par ailleurs, une diminution importante de la CIJG est observée pour les cellules U251 Mock, quel que soit le traitement, alors que celle-ci est maintenue, voire augmentée, après le traitement des cellules U251 shRNA. Ce résultat est en accord avec la localisation de la Cx43 détectée par immunofluorescence. En effet, la localisation fortement cytoplasmique de la Cx43 pour les cellules U251 Mock peut expliquer la diminution de la CJIC observée après les traitements, alors que le maintien de sa localisation membranaire permet aux cellules U251 shRNA de présenter une CIJG malgré les traitements. Il est également important de noter que la CIJG des cellules U251 shRNA demeure inférieure à celle des cellules U251 Mock quels que soient les traitements réalisés. Il semblerait donc qu'en présence d'une quantité suffisante d'expression de Cx43, les traitements agissent sur la localisation de la Cx43 et sur sa fonction de communication. A l'opposé, une faible expression de la Cx43 entrainerait une insensibilité à la diminution de la communication jonctionnelle comme s'il s'agissait de maintenir un reliquat de communication intercellulaire *(Tableau récapitulatif 1)*.

Une précédente étude a décrit que le BPA diminue la CIJG des cellules de peau HaCaT sans agir sur l'expression de la Cx43 qui est localisée dans le cytoplasme. L'effet observé provenait d'une diminution de l'expression des ARNm de la Cx26 associée à l'augmentation de prolifération des cellules de la peau, et ceci par un mécanisme impliquant les récepteurs aux œstrogènes **(Zhang et al., 2019)**. Dans notre cas, nous devons rappeler que bien que les

astrocytes, d'où sont susceptibles de dériver les glioblastomes, expriment faiblement les Cx32, Cx26 et Cx30 en plus de la Cx43, aucune de ces connexines n'a été détectée dans les cellules U251 **(Strale et al., 2012; Chépied et al., soumis)**. Donc, les effets examinés du BPA sur les U251 proviennent d'une action sur l'expression, la localisation et/ou la fonction de la Cx43. Des auteurs, en 2016, ont étudié les effets de l'œstradiol (E2) sur l'expression et la fonction de communication de la Cx43 dans des cellules de glioblastome de rat C6 (exprimant faiblement la Cx43) et F98 (exprimant fortement la Cx43). Cette étude a mis en évidence que l'E2 pouvait réduire l'expression de la Cx43 au sein des cellules C6 alors qu'elle augmentait celle des cellules F98, entraînant ainsi une CIJG réduite (cellules C6) ou augmentée (cellules F98). Pour ces auteurs, cette différence serait due aux différents niveaux d'expression des récepteurs à l'E2 (α ou β) dans les cellules C6 ou F98 **(Moinfar et al., 2016)**. Sachant que le BPA, ainsi que ses dérivés chlorés, ont des actions similaires à celles d'œstrogènes, il serait important d'étudier le profil d'expression des récepteurs aux œstrogènes dans nos lignées U251 Mock et U251 shRNA.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Protéines		↗	≈	≈	↘	↘	↗	↗	≈	≈
Localisation	Membrane	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme (Mb+)	Cytoplasme (Mb++)	Membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane	Reste membrane
CIJG		↘	↘	↘	↘	↘	≈	↗	↗	≈
Hémicanal		≈	≈	≈	≈	↗	≈	≈	≈	≈

***Tableau récapitulatif 1: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et U251. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

L'étude de l'expression, de la localisation et de la fonction de la Cx43 a également été réalisée sur les astrocytes en culture primaire, provenant de souriceaux de quelques jours, soit sauvages, soit hétérozygotes, pour la Cx43. Ces souriceaux ont été exposés au BPA ou à ses dérivés chlorés, par leurs mères traitées durant leur développement embryonnaire et durant les quelques jours de lactation.

Concernant les astrocytes provenant des souriceaux exposés aux polluants durant leur développement embryonnaire, les résultats obtenus montrent un effet important et significatif des traitements à faible concentration. En effet, les traitements *in utero* augmentent le niveau d'expression protéique de la Cx43 des astrocytes en culture primaire.

La détection par immunofluorescence de cette dernière présente une localisation membranaire toujours visible quel que soit le génotype (WT, +/-) des astrocytes et quels que soient les traitements réalisés. Enfin, nous retrouvons une augmentation de la CIJG après les traitements aux polluants pour les astrocytes en culture primaire *(Cf. Tableau récapitulatif 2)*.

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
ARNm		↗	≈	↗	≈	↘	↗	≈	≈	≈
Protéines		↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Localisation	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb	Mb
	Cyto+	cyto	cyto	cyto	Cyto+	Cyto	Cyto+	Cyto+	Cyto+	cyto
CIJG		↗+	↗+	↗	↗	↘	↗	↗+	↗	↗
Hémicanal		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈	≈	≈

***Tableau récapitulatif 2: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes WT. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et les astrocytes +/-. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/-.*

Ces résultats sont intéressants car ils montrent que le BPA et ses dérivés chlorés sont susceptibles, même à faible dose durant le développement embryonnaire et la lactation des souriceaux, d'induire un effet suffisamment durable sur l'expression et la fonction de la Cx43 pour qu'il soit détecté au sein d'astrocytes en culture primaire. De plus, on retrouve dans les astrocytes, cette tendance, observée dans les cellules U251 shRNA, d'une augmentation d'expression de la Cx43 et de sa fonction de communication.

La deuxième partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude du processus de migration et d'invasion des cellules U251 après les traitements au BPA et ses dérivés chlorés. Cette étude a été réalisée en présence ou non d'un microenvironnement astrocytaire, mimé par les milieux de culture des astrocytes WT ou +/-.

Pour commencer, nous avons étudié la migration 2D des différents types cellulaires, après traitements aux polluants. Bien que nous observions une migration très faible des astrocytes quel que soit leur génotypage ou le traitement, il s'avère que la capacité de migration 2D des cellules U251 Mock diminue après les traitements alors que celle des cellules U251 shRNA semble augmenter. De plus, les cellules U251 Mock présentent une migration 2D plus importante après 10h de migration que les cellules U251 shRNA pour la condition contrôle *(Cf. Tableau récapitulatif 3)*.

Ces différents résultats suggèrent que ce processus de migration 2D est corrélé avec la localisation membranaire de la Cx43. En effet, concernant la CIJG, nous avons montré qu'elle diminuait pour les cellules U251 Mock alors qu'elle augmentait pour les cellules U251 shRNA, tout en restant inférieure quantitativement pour les cellules U251 shRNA.

Culture Primaires	AstroWT					Astro+/-				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		↘	≈	↘	↘	≈	≈	≈	↘	↘
U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈(≈)	↗(≈)	↗(↗)	↗(↗)

***Tableau récapitulatif 3: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes WT ou cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les astrocytes WT et les astrocytes +/- ou entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les astrocytes +/- ou cellules U251 shRNA.*

La migration 2D des cellules de gliome U251 serait donc liée à la localisation membranaire de la Cx43 et non pas à sa fonction de communication. En effet, lors du processus de migration en 2D, des structures cellulaires très particulières (lamellipodes et filopodes) se mettent en place **(Spence et al., 2012)**. Au niveau de ces structures, différents types de complexes d'adhérence fonctionnent comme des plates-formes de signalisation qui contrôlent étroitement le comportement cellulaire. L'adhérence sur le bord déformé de la membrane cellulaire régule le remodelage et la polymérisation de l'actine via Arp2/3 afin de permettre la mise en place des lamellipodes et d'induire le mouvement cellulaire. De plus, la polymérisation linéaire de l'actine peut conduire également à la formation de filopodes, qui ont pour fonction d'explorer l'environnement immédiat de la cellule **(Jacquemet et al., 2015)**. Une étude a montré que la protéine ZO-1 a été détectée au niveau des lamellipodes et que cette protéine est colocalisée avec les protéines impliquées dans le remodelage de l'actine et la migration cellulaire telles que la G-actine, l'alpha-actinine, la cortactine et les intégrines **(Taliana et al., 2005).** Il a été montré également que l'expression de la Cx43 modifie l'organisation du cytosquelette d'actine en réponse à une stimulation par le sérum. L'expression de la Cx43 membranaire augmenterait ainsi la migration des cellules

indépendamment de sa fonction canal et en impliquant la MAPK p38. Cette dernière, sous forme phosphorylée permettant la polymérisation d'actine, a été retrouvée significativement davantage phosphorylée dans les cellules exprimant la Cx43 **(Kameritsch et al., 2015).** Dans notre cas, il serait intéressant de quantifier la part de Cx43 membranaire en lien avec ZO-1 par la technique du FRET afin de vérifier si la Cx43 des cellules U251 shRNA intervient de façon plus importante dans la formation des lamellipodes que dans le cas des cellules U251 Mock.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur les processus de migration et d'invasion 3D faisant intervenir les invadopodes *(Cf. Tableaux récapitulatifs 4 et 5)*. Dans le processus de migration 3D des cellules U251, la capacité migratoire semble similaire pour les deux clones, sauf pour les conditions contrôles où les cellules U251 shRNA migrent plus rapidement, contrairement à ce qui est observé dans le processus de migration 2D.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈(≈)	↗(≈)	↗(↗)	↗(↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈(≈)	≈(≈)	≈(≈)	↘(≈)

***Tableau récapitulatif 4: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

Ces résultats confirment donc la mise en place d'un processus cellulaire différent selon que les cellules migrent en 2D ou 3D. En effet, une étude a montré que les différentes interactions moléculaires et mécaniques entre les cellules et la matrice peuvent provoquer une motilité cellulaire différente des cellules de gliome cultivées *in vitro* en présence ou non d'hydrogel de collagène **(Huang et al., 2018)**. Lors de la migration 3D, la cellule subit un remodelage important pour passer du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur par des pores de 8 µm de diamètre. Une étude utilisant un modèle de migration sphéroïde 3D, mimant la condition *in vivo* des cellules tumorales, montre que la diminution de la Cx43 dans les cellules de gliome humain U118 augmenterait la migration en réduisant l'adhérence à la matrice extracellulaire, et que ces cellules migrent alors non plus de façon collective mais individuelle **(Aftab et al., 2015)**. De plus, dans cette étude, la CIJG semble jouer un rôle plus

important dans l'efficacité de la migration que les interactions cytoplasmiques réalisées par la partie C-terminale de la Cx43. Cette même étude révèle que la diminution de la Cx43 favorise la migration en augmentant la vitesse de la cellule et en influant sur le sens de la migration mais elle ne permet pas d'estimer le rôle de la CIJG facilitant la migration collective **(Aftab et al., 2015)**.

Lors du processus d'invasion 3D, en plus de la déformation cellulaire subie, la cellule doit mettre en place un processus de dégradation de la matrice extracellulaire. Nos résultats montrent que lorsque la Cx43 est réprimée dans les cellules U251 shRNA, la capacité d'invasion est également diminuée. Contrairement au processus de migration, l'invasion 3D montre un effet très marqué du traitement BPA par rapport aux autres traitements. Nous pouvons noter également, qu'après traitements, la différence de capacité d'invasion initialement observée entre les deux types cellulaires U251 (Mock et shRNA) n'est plus retrouvée.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈ (≈)	↗ (≈)	↗ (↗)	↗ (↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	↘ (≈)
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)

***Tableau récapitulatif 5: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

Par leur fonction de dégradation de la matrice extracellulaire, des prolongements cellulaires spécifiques, les invadopodes, ont un rôle important dans le processus d'invasion 3D. Nous avions précédemment montré que ces structures particulières présentent une cinétique de formation et une fonction de dégradation différentes selon le niveau d'expression de la Cx43. En effet, pour les cellules U251 Mock, en condition contrôle, la formation des invadopodes est plus rapide et la dégradation de la matrice extracellulaire plus importante que pour les cellules présentant une expression diminuée de la Cx43 (cellules U251 shRNA). Grâce à sa fonction de protéine d'échafaudage, la Cx43 pourrait intervenir dans la vitesse de formation d'invadopodes longs et matures qui sont très peu retrouvés au sein des cellules U251 shRNA

(Chépied et al., soumis). Ces caractéristiques peuvent expliquer la différence du processus d'invasion observé entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA.

Ce résultat est confirmé par la quantification du nombre total des invadopodes dans ces deux types cellulaires en conditions contrôles. En effet, les cellules U251 shRNA présentent un nombre d'invadopodes diminué par rapport à celui des cellules U251 Mock *(Cf. Tableau récapitulatif 6)*.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 2D		≈	↘	↘	↘	↘	≈(≈)	↗(≈)	↗(↗)	↗(↗)
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈(≈)	≈(≈)	≈(≈)	↘(≈)
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗(≈)	≈(≈)	≈(≈)	≈(≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗(≈)	↗(≈)	↗(≈)	≈(≈)

***Tableau récapitulatif 6: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

De plus, le nombre d'invadopodes totaux formés par les cellules U251 Mock est significativement plus important après traitement au BPA par rapport aux conditions contrôles. Alors que cette augmentation de la formation du nombre d'invadopodes est retrouvée pour les traitements au BPA, C et D pour les cellules U251 shRNA, cela pourrait expliquer une capacité d'invasion 3D identique entre les deux types cellulaires après ces traitements.

L'augmentation de la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock et U251 shRNA après traitement au BPA peut donc être corrélée à une augmentation du nombre total d'invadopodes.

Mais alors comment expliquer qu'après traitement au BPA ou à ses dérivés chlorés, le processus invasif n'est plus différent entre les cellules U251 Mock et U251 shRNA ? Nos résultats montrent que malgré l'augmentation de l'expression de la Cx43 après certains traitements, l'expression de la Cx43 des cellules U251 shRNA reste toujours inférieure à celle des cellules U251 Mock. Le même type de réflexion peut être émis concernant la CIJG. En effet, malgré son augmentation, celle-ci est toujours plus importante pour les cellules U251

Mock que pour les cellules U251 shRNA. La seule différence apparente, mais non quantifiable, concerne la localisation cellulaire de la Cx43 plus cytoplasmique, après traitement, pour les cellules U251 Mock, alors qu'elle demeure très membranaire pour les cellules U251 shRNA.
Les invadopodes sont des protrusions membranaires se formant au niveau de domaines très spécifiques de la membrane plasmique que sont les radeaux lipidiques. Nos précédentes études ont montré que la Cx43 qui prend place dans ces plateformes lipidiques joue un rôle important dans le rapprochement de protéines nécessaires à la constitution des invadopodes tels que l'actine, la cortactine, src, la cofiline, etc. Il serait donc intéressant de quantifier les liens possibles entre la Cx43 et ces protéines-clés, au sein de nos cellules après les différents traitements au BPA et à ses dérivés chlorés. Peut-être, serait-il alors possible de différencier la Cx43 membranaire impliquée dans la CIJG de celle intervenant spécifiquement en tant que protéine d'échafaudage nécessaire à la formation des invadopodes. La quantité totale des invadopodes produits en corrélation avec le processus d'invasion 3D semble être en lien avec la localisation de la Cx43 au sein des plateformes lipidiques. Cela expliquerait l'augmentation de la capacité d'invasion et du nombre d'invadopodes des cellules U251 shRNA par rapport aux cellules U251 Mock en entrainant des processus identiques après traitement contrairement à ce qui est observé en conditions contrôles.
Des auteurs ont étudié les effets du BPA sur le processus d'invasion 3D des cellules provenant d'un adénocarcinome de poumon, les cellules A549. Alors qu'une exposition au BPA (10 µM) entraîne une augmentation du processus invasif de ces cellules, on assiste également à une augmentation du processus de l'EMT (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) et de l'expression de la Cx43. Le BPA permettrait d'augmenter le lien entre la Cx43 et le récepteur à l'estrogène gamma (ERRγ) **(Ryszawy et al., 2019)**. Au vu de nos résultats, après avoir identifié l'expression des récepteurs spécifiques aux estrogènes dans les cellules U251, il serait important de rechercher s'il existe un lien entre les estrogènes et la formation des invadopodes par l'intermédiaire de la Cx43.

Dans la dernière partie de l'étude, nous nous sommes concentrés sur les effets du milieu de cultures primaires d'astrocytes WT et +/-, provenant de souris exposées ou non aux différents traitements, sur les processus de migration et d'invasion 3D des cellules U251 (*Cf. Tableaux récapitulatif 7, 8 et 9)*.

Dans de telles conditions, les cellules U251 shRNA migrent moins que les cellules U251 Mock en présence de milieu d'astrocytes de conditions contrôle et BPA contrairement aux conditions C, D et C+D. Ce résultat montre que le microenvironnement astrocytaire influence la capacité migratoire des cellules U251 de manière dépendante du niveau d'expression de la Cx43 mais sans effet apparent du traitement des souris au BPA et à ses composés chlorés pour les cellules U251 Mock. En revanche, les cellules U251 shRNA dont la Cx43 est réprimée présentent une sensibilité aux traitements des souris.

De plus, comparativement au milieu classique, la capacité de migration des cellules U251 Mock augmente après l'ajout du milieu d'astrocytes WT mais ne semble pas être affectée par les différents types de milieu, excepté le milieu d'astrocytes WT issus de souriceaux exposés à la molécule D ou au cocktail. En revanche, la capacité de migration des cellules U251 shRNA n'est pas augmentée après l'ajout des milieux de culture d'astrocytes sauf s'ils proviennent de souriceaux exposés à la molécule D (astrocytes WT) et au cocktail (astrocytes WT et +/-). Donc l'ajout du milieu de culture d'astrocytes provenant de souriceaux exposés aux traitements D et C+D semble affecter la capacité migratoire des cellules U251 mock et shRNA par rapport au milieu classique. Cela montre que la modulation apportée au microenvironnement peut affecter le comportement des cellules U251. Mais on ignore pourquoi seulement les traitements des souriceaux à la molécule D et au cocktail affectent la capacité migratoire des cellules U251.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Migration 3D		↗	≈	≈	≈	↗	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	↘ (≈)
Migration 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	↘	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Migration 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (↘)	≈ (↘)	≈ (≈)	↗ (≈)

***Tableau récapitulatif 7: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

Quant à l'invasion 3D, le résultat montre que les cellules U251 shRNA sont moins invasives que les cellules U251 Mock en présence du milieu d'astrocytes +/- provenant des souriceaux non exposés (CTR) et exposés au traitement C. En revanche, en présence du milieu d'astrocytes WT, aucune différence de capacité d'invasion n'est observée entre les cellules

U251 Mock et shRNA sauf pour le traitement au BPA. Cependant, en présence du milieu des astrocytes WT, les cellules U251 shRNA présentent une capacité invasive semblable aux cellules U251 Mock. Ce résultat suggère que la modulation du niveau d'expression de la Cx43 du microenvironnement influence la capacité invasive des cellules U251. De plus, par rapport au milieu classique, la capacité d'invasion 3D des cellules U251 Mock ne semble pas être affectée par les différents types de milieux d'astrocytes WT (sauf en présence du milieu d'astrocytes WT issus de souriceaux exposés au traitement D qui l'augmente). Pour les cellules U251 shRNA, la capacité d'invasion 3D est plus importante en présence de milieu d'astrocytes WT provenant de souriceaux non traités (Ctr) ou exposés à la molécule D et au cocktail. Après invasion, en présence du milieu astrocytaire +/-, aucune différence n'est observée pour les cellules U251 Mock. De même, les cellules U251 shRNA ne présentent pas de différence dans leur capacité d'invasion avec celle observée en présence du milieu cellulaire, excepté pour les traitements au BPA, à la molécule C ou au cocktail. Comme pour la migration 3D, les cellules U251 shRNA sont plus sensibles à la modulation du microenvironnement. En effet, les traitements des souriceaux au BPA et à ses composés chlorés affectent la capacité invasive 3D des cellules U251 shRNA de manière dépendante du niveau d'expression de la Cx43 astrocytaire.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	↗ (≈)	↗ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (≈)	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)

Tableau récapitulatif 8: ***Couleur bleue*** *: Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock.* ***Couleur noire*** *: Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA.* ***Couleur rouge*** *: Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

De plus, les cellules U251 Mock en présence de milieu d'astrocytes WT forment des invadopodes totaux équivalents après traitement par rapport aux conditions contrôles mais avec des différences significatives entre les différents traitements. Pour les cellules U251 shRNA, le nombre d'invadopodes augmente en présence du milieu d'astrocytes WT provenant

de souriceaux exposés aux traitements C et C+D par rapport à la condition contrôle CTR. De plus, une augmentation du nombre d'invadopodes est observée entre le traitement BPA et les traitements C, D et C+D. Par ailleurs, en présence de milieu d'astrocytes +/-, aucune différence du nombre d'invadopodes formés n'est observée pour les cellules U251 Mock alors que ce nombre diffère selon les différents traitements pour les cellules U251 shRNA. Ce résultat du nombre total d'invadopodes décèle une corrélation avec les résultats obtenus lors des tests d'invasion 3D. Cette corrélation permet d'affirmer que les cellules U251 shRNA dont la Cx43 est réprimée sont plus sensibles aux effets de traitements et à la modulation du niveau d'expression de la Cx43 astrocytaire (du microenvironnement).

En comparaison avec le milieu classique, en présence des milieux astrocytaires, la formation d'invadopodes des cellules U251 Mock augmente fortement alors que cette augmentation n'est pas observée dans le cas des cellules U251 shRNA pour les traitements BPA (astro WT) et C (astro +/-). Les milieux des astrocytes semblent favoriser la formation des invadopodes au sein des cellules U251.

U251	Mock					shRNA				
Conditions	Ctr	BPA	C	D	C+D	Ctr	BPA	C	D	C+D
Invasion 3D		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes		↗	≈	≈	≈	↘	↗ (≈)	↗ (≈)	↗ (≈)	≈ (≈)
Invasion 3D + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes + milieu AstroWT		≈	≈	≈	≈	≈	≈ (↘)	↗ (↗)	≈ (≈)	↗ (≈)
Invasion 3D + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	↘	≈ (≈)	↘ (↘)	≈ (≈)	≈ (≈)
Nombre d'invadopodes + milieu Astro+/-		≈	≈	≈	≈	≈	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)	≈ (≈)

***Tableau récapitulatif 9: Couleur bleue** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 Mock. **Couleur noire** : Différence significative pour un même traitement entre les cellules U251 Mock et les cellules U251 shRNA. **Couleur rouge** : Différence significative entre traitements différents pour les cellules U251 shRNA.*

L'étude de la migration et de l'invasion 3D ainsi que la formation des invadopodes des cellules U251 en présence des milieux d'astrocytes provenant de souriceaux exposés au BPA et à ses composés chlorés a permis de montrer d'un part que le niveau d'expression de la Cx43 astrocytaire du microenvironnement est important et peut favoriser la capacité de migration et d'invasion 3D des cellules U251. D'autre part, les cellules U251 shRNA dont la Cx43 est

réprimée présentent une sensibilité plus importante à la modulation apportée au microenvironnement que ce soit au niveau d'expression de la Cx43 ou à l'exposition des souriceaux aux différents traitements. Le microenvironnement semble donc faciliter le processus invasif des cellules cancéreuses U251 selon le niveau d'expression de la Cx43. Enfin, les traitements au BPA et de ses dérivés chlorés affectent ce processus d'invasion beaucoup plus dans les cellules où la Cx43 est réprimée.

En conclusion, lorsque les cellules de glioblastomes U251 présentent une expression élevée de la Cx43, cette expression semble avoir un effet protecteur contre les influences pro-invasives du microenvironnement. Or, la Cx43 a été également identifiée comme étant une protéine favorisant la formation et la fonction des invadopodes, et donc comme étant une protéine pro-invasive pour les cellules U251.

Pour tenter de résoudre cette contradiction ou ce paradoxe, nous proposons, comme perspectives de ce travail, d'étudier précisément de façon quantitative l'expression des récepteurs aux estrogènes, la localisation de la Cx43 et ses fonctions. Nous avions déjà proposé durant l'étude de l'implication de la Cx43 dans le processus de formation et de fonction des invadopodes que les différentes fonctions de la Cx43 n'avaient pas les mêmes conséquences. La fonction d'échafaudage de la Cx43 permettrait l'augmentation de la vitesse de formation des invadopodes, favorisant ainsi la mise en place d'invadopodes longs et moyens au niveau des cellules étudiées. La fonction hémicanal, quant à elle, interférerait à la fois sur la formation et la fonction de dégradation des invadopodes. Enfin, la fonction de communication jonctionnelle empêcherait complétement la formation de ces structures indispensables à l'invasion. De la même façon, l'effet protecteur de l'expression de la Cx43 aux influences du microenvironnement devrait impliquer prioritairement une de ces fonctions de la Cx43 par rapport aux autres. Donc, des études de gapFRAP, d'interactions protéiques par la technique du FRET, et de la fonction hémicanal à l'échelle de la cellule (présentant des expressions différentes de la Cx43) est indispensable afin de comprendre les mécanismes moléculaires fins que celle-ci contrôle et permettant l'effet protecteur observé contre les influences pro-invasives du microenvironnement.

Annexes

Impact of the astrocytic microenvironment in the invasive process of human glioblastoma after exposure to Bisphenol A and its chlorinated derivatives. Implication of Connexine 43

Zeinaba DAOUD OMAR, Indri KUSHARYANTI, Amandine CHEPIED, Laurence TURI, Marc MESNIL, Norah DEFAMIE.

(Soumis)

Impact of the astrocytic microenvironment in the invasive process of human glioblastoma after exposure to Bisphenol A and its chlorinated derivatives. Implication of Connexine 43

Zeinaba DAOUD OMAR, Indri KUSHARYANTI, Amandine CHEPIED, Laurence TURI, Marc MESNIL, Norah DEFAMIE.

Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, CNRS, University of Poitiers, 1 rue G. Bonnet – TSA 51 106, 86073 Poitiers Cedex 09, France.

Corresponding author:

Dr. Norah DEFAMIE, Group « Physiological and Physiopathological Implications of Connexins», Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, CNRS-ERL 7003 - University of Poitiers, 1, rue Georges Bonnet - TSA 51 106 - 86073 Poitiers Cedex 09 - France
Tel: [33](0)5 49 45 39 75 - Fax: [33] (0)5 49 45 40 14
e-mail: norah.defamie@univ-poitiers.fr

Total number of figures:

Abbreviations:

Cx43: Connexin43; FG-Gelatin: Fluorescent green gelatin; GJIC: gap junctional intercellular communication; LY: Lucifer yellow;

Abstract

Exposure to pollutants can have a lasting effect on human health. Some of these pollutants act as endocrine disruptors (EDs) that cause various chronic diseases. The impact of ED on the occurrence of cancer is difficult to assess and study, but some EDs such as Bisphenol A (BPA) are classified as carcinogenic. In order to develop, tumors need a favorable microenvironment that involves complex mechanisms. Among these mechanisms are interactions mediated either by diffusion of soluble factors or by direct intercellular contacts such as those permitting exchange of information between cells through gap junctions whose protein subunits such as connexin43 (Cx43) may be involved in cancer cell invasion.

In order to evaluate the effects of the tumor microenvironment, the effects of exposure to BPA and its chlorinated derivatives and the role of Cx43 in the invasion capacity of human glioblastoma cells, in-utero and in-vitro studies were performed. The in-utero aspect of the study was done to get primary astrocytes of 6-day old mice that were used to provide microenvironment to glioblastoma cells. In order to modulate this microenvironment, offspring was exposed to BPA and its chlorinated derivatives by daily injections of the mothers during gestation (E0 to E21) and lactation (D0 to D6). Another parameter that was modulated is the level of expression of connexin43 (Cx43) among astrocytes by using wild-type and heterozygous (Cx43+/-) mice and among human glioblastoma cells (U251 cell line) whose Cx43 expression was reduced or not by shRNA.

The results show that BPA and its chlorinated derivatives affect the expression of Cx43 and also the gap junctional intercellular communication of U251 cells depending on their level of Cx43 expression. In-utero treatments of BPA and its chlorinated derivatives affect the expression of Cx43 of primary astrocytes and increase GJIC. In addition, invasion capacity

confirmed by the number of invadopodia is increased or decreased depending on the level of Cx43 expression and the treatments. In addition, compared to conventional medium, conditioned medium of WT or Cx43 +/- astrocytes seems to increase invadopodia formation and invasive capacity of U251 cells, whatever their level of cx43 expression.

In conclusion, BPA and its chlorinated derivatives affect the expression and the communicating function of Cx43 in astrocytes of exposed mice and in U251 glioblastoma cells. In addition, treatments and astrocytic microenvironment appear to favor invasive capacity of U251 cells by increasing the number of invadopodia which are formed in a Cx43-dependent manner.

Keywords: Connexin, Gap junction, Glioblastoma, Cell migration, Cell invasion, Invadopodia, Astrocytes, Condionned medium

Introduction

The most common brain tumor in adults, glioblastoma, is not curable. The incurability of glioblastomas is mostly the consequence of their disseminating capacity combined to their chemotherapy and radiotherapy post-resection resistance. Therefore, elucidating the molecular mechanisms responsible for invasion capacity in glioblastoma cells could result in discovery of promising therapeutic targets.

Tumor development has been associated with a decrease of gap junctional intercellular communication (GJIC), but gap junction proteins, connexins, are suspected to play an important role in tumor progression and invasion. Among the various connexin types, we demonstrated that connexin43 (Cx43) controls the tumor invasion capacity of human glioblastoma U251 cells and is implicated in the formation and function of invadopodia [1,2]. Moreover, Cx43 is a major gap junction in astrocytes and reactive astrocytes are part of brain tumor microenvironment. Therefore, it is possible that glioma invasive capacities would be modulated by modification of the GJIC of the microenvironment.

Since pollutants are known to modulate GJIC, we were interested to test whether such a modulation of GJIC in the tumor microenvironment can impact the tumor invasive capacity. One of such pollutants is the endocrine disruptor, Bisphenol A (BPA), which is of major concern to public health due to its persistent abundance in the environment and its deleterious effects such as reproductive toxicities, altered body weight, early puberty, teratogenesis (through transplacental exposure) and cancers [3-6]. This health concern is complicated by the formation of BPA byproducts in the environment whose effects are not yet known precisely. A major cause of BPA byproducts is the chlorination treatment of drinking water that induces the formation of chlorinated derivatives from BPA present in water as a pollutant. Since accumulation of BPA in human tissues has been demonstrated as well as the presence of these

derivatives [7-11], it is important to understand the consequences of such tissue accumulation on human health.

This aspect is interesting since BPA is known to induce neurotoxicity. In particular, it was shown that exposures of pregnant mice to low doses of BPA (20µg/kg of body weight per day) not only affect neocortical development by accelerating neuronal differentiation/migration but also thalamocortical connections [12,13]. It was also observed that prenatal *in utero* BPA exposures and during lactation induce a disturbed behavior of mice [14,15]. Furthermore, perinatal exposure to BPA has been reported to affect brain development leading to altered emotions (anxiety and fear) in rodents [16,17]. This altered behavior is suspected to be the consequence of changes in neurotransmitter levels [18-20]. Since synaptic transmission and plasticity are modulated by astrocytes which release neuroactive substances or uptake of neurotransmitters through gap junctional networks or gap junction hemichannels [21,22], it is important to consider whether gap junctions are a possible target of BPA and its derivatives that could explain the observed effects in animal models. Such an assumption is confirmed by a set of data showing that BPA may target, at the cellular level, GJIC which is known to be very sensitive to pollutants such as xenobiotics and carcinogens [23].

Therefore, considering that BPA has neurotoxic effects during development, perturbs neurotransmitter levels in brain, inhibits GJIC and participates to cancer rise, we planned to study its effects on pregnant mice expressing different levels of Cx43. To do so, we thus studied the effect of long-term exposures of pregnant mice to BPA and/or its chlorinated derivatives (separately or as a mixture: cocktail effect). Such exposures were performed daily at low doses (doses of BPA found in drinking water) during gestation and lactation of mice. The effects of such exposures have been observed on invasive capacities of U251 cells expressing different levels of Cx43 and taken as a glioblastoma model with a particular interest concerning the

astrocytic microenvironment. This microenvironment was mimicked through U251 cell exposure to conditioned medium from primary cultures of astrocytes isolated from mice exposed *in utero* and during lactation to BPA and its chlorinated derivatives. We hope that these approaches will permit to have a clear picture of the effects of BPA and derivatives on brain tumor progression or invasive capacities and to elucidate the molecular mechanisms responsible for their deleterious consequences.

Materials and Methods

Antibodies

Monoclonal antibodies directed against Cx43 (BD Transduction Laboratories, NJ, USA), cortactin, (Millipore, Billerica, USA) and GAPDH (HyTest, Turku, Finland) were used.Anti-mouse secondary antibodies were conjugated to HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) for Western blot or to Alexa Fluor® antibodies (Molecular Probes, Eugene, USA) for immunofluorescence. Fluorescent labelling of actin cytoskeleton was performed by using TRITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

Animals and treatments

Fertilized female Swiss mice (Jackson labs) were injected daily intraperitoneally from embryonic day 1 (E1) until 6 days (pregnancy and breeding) with either sunflower oil as vehicle control (Ctr) (n = 3), 20 µg/kg/day of BPA (n = 3), 20 µg/kg/day of 3,3′-Dichlorobisphenol A (3,3′-DCBPA) (n = 3) (compound C), 20 µg/kg/day of 3,5-Dichlorobisphenol A (3,5-DCBPA) (n = 3) (compound D) or a mixture with 10 µg/kg/day of each (mix-DCBPA) (n = 3) (compound C+D). The animal holding room was maintained under a 12 h light/dark cycle at 24.5 ± 0.5 °C.

Cell culture conditions

Human U251 glioblastoma cell line (U251 Mock) and its shRNA derived Cx43 knockdown clone (U251 shRNA) (Strale et al., 2012) were cultured in high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Lonza, Brussels, Belgium) supplemented with foetal bovine serum (FBS; 10%, Lonza), L-glutamine (0.5 mM, Sigma-Aldrich) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, Lonza). Cultures were maintained in a water-saturated incubator (37°C, 5% CO_2). Routine cultures were kept under selection pressure (1 µg/mL of puromycin) to maintain an adequate Cx43 knockdown. Moreover, in order to limit the number of passages, clones were initially expanded during their selection to have sufficient stock to perform the scope of studies. Results were obtained from cells that had not reached passage 10. When specified, petri dishes were coated with gelatin (0.2%) in PBS for one hour at room temperature before seeding cells. In some cases, cells were treated with flufenamic acid (FFA; 100µM; Sigma-Aldrich), a connexin channel inhibitor [24].

Mouse Genotypes and Primary Cultures of Astrocytes

Cortex of newborn 6 days old CDI mice strain was removed and kept at 4°C in supplemented DMEM during genotyping. DNA from the tail of each mouse was analyzed by PCR. The mix (Access QuickTM RT-PCR system, Promega) was prepared for a sample with 5µl buffer (5X Green Go Taq® Flexi Buffer), 0.5µl dNTP at 1/10 (100mM dNTP set, Invitrogen), 1µl of each primer [Cx43 sense (5'-CCCCACTCTCACCTATGTCTCC-3 ') and antisense (5'-ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC-3'), Neo sense (5'-GGCCACAGTCGATGAATCCAG-3') and antisense (5'-TATCCATCATGGCTGATGCAA-3'), 0.12 µg GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Enzyme), 1 µl MgCl 2 (25 mM) and 9.375 µl of Milli Q water. The reaction products were loaded on an agarose gel (1.5%, diluted in Tris-Borate-EDTA 0.5X). The typical amplified band for the Cx43 gene was 520 bp and that for the neo gene, 294 bp.

Primary cultures of astrocytes were then prepared from the cortex by mechanical digestion and cell suspensions were seeded and incubated at 37 ° C (5% CO2) until cultures were confluent. Culture media were refreshed (50%) twice à week.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated using an SV Total RNA isolation kit according to the instructions of the manufacturer (Promega, Charbonniere-les-Bains, France). Briefly, total RNA (1 mg) was reversely transcribed using Superscript II (Invitrogen). The reactions of qPCR were performed in 20 mL total volume with 2.5 pmol of each primer, 10 ml of SYBRgreen Master Mix 2X (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 0.5 mL of template. The amplification and analysis were performed using an ABI Prism 9500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Samples were compared using the relative CT method. Specific primers for Cx43 and housekeeping gene (GAPDH) were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium): (1) Cx43 (BC026329): mCx43-forward, 5'-GTG-CCG-GCT-TCA-CTT-TCA-TTA-AG-3'; mCx43-reverse, 5'-CCA-AGG-CGC-TCC-AGT-CA-3' and (2) GAPDH (NM002046): GAPDH-forward, 5'-TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA-GC-3'; GAPDH-reverse, 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GAG-3'.

Invadopodia synchronization

U251 cells were cultured on Oregon Green® 488-conjugated gelatin (FG-Gelatin; Molecular Probes) for 24 h in the presence of 5 µM BB94 (Santa Cruz) to block metalloproteases and invadopodia formation. BB94 was then washed out to allow synchronous invadopodia formation [25].

Western blot

Proteins were subjected to electrophoretic separation using 10% polyacrylamide-SDS gel (InVitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked in 1 M Tris-buffer saline solution (pH 8.0) containing Tween 20 (0.1%) and non-fat dry milk (5%) for 3 h at room temperature. Blots were then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies against Cx43 (1:1000), GAPDH (1:40000) followed by detection using HRP-conjugated antibodies (DakoCytomation) and an enhanced chemiluminescence kit (ThermoScientific, IL, USA). Densitometric analyses were performed using ImageJ software.

Fluorescent-gelatin degradation assay

Sterilized coverslips were coated with 0.01% (w/v) poly-L-lysine solution (Sigma) for 40 min at room temperature, washed with PBS, and fixed with 0.5% glutaraldehyde (Sigma, Saint-Louis, USA) for 15 min followed by extensive washing. Then, coverslips were inverted on a 30 µL drop of Oregon Green® 488-conjugated gelatin (Molecular Probes, Eugene, USA) and incubated at room temperature for 10 min. For inserts, 30 µL of Oregon Green® 488-conjugated gelatin (0.2%) were added on for 10 min, 20 µL gelatin were removed and inserts were put at 37°C for 1 h. Once rinsed with PBS, residual reactive groups in gelatin were quenched with sodium borohydride (5 mg/mL) for 5min followed by extensive washing with PBS.

To assess the ability of cells to form invadopodia and to degrade matrix, cells were plated on coverslips (15 x 10^3 cells/mL) or inserts (10^4 cells/mL) coated with fluorescent gelatin in 24-well plates and maintained in a water-saturated incubator (37°C, 5% CO2). After such a preparation, indirect immunofluorescence was performed [26].

Indirect immunofluorescence

Immunodetection of Cx43 and cortactin, was performed on cells (U251 Mock and U251 shRNA clones) present on coverslips or inserts coated with fluorescent gelatin as described previously

(Chepied et al., submitted). F-actin was detected using TRITC-phalloidin. Cells were fixed in paraformaldehyde (4%) for 20 min at room temperature. After incubation in a blocking solution (2% bovine serum albumin, 1% Triton X-100 in PBS), cells were incubated with primary antibodies (1:250) overnight at 4°C. Alexa Fluor® 555 or 647 - conjugated antibodies (1:250, Invitrogen) and/or TRITC-phalloidin (1:50) were then applied on the preparations for 1 h. Coverslips or inserts were mounted afterwards with Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) prior to observation with confocal microscopy.

Confocal fluorescence microscopy

Confocal images were obtained using a Olympus IX81 laser scanning confocal inverted microscope with 40X UAPO ID/340UV NA 1,35 oil or 60X O.N. 1.4 PLAPO oil objectives. Images were processed with FluoView software.

Dye uptake assay

One hour before experimentation, if necessary, 100 µM FFA were added in culture medium of Petri dishes or in the bottom compartment of the Boyden chamber in inserts. After 10 min, FFA was washed out and U251 cells were incubated at 37°C for 10 min in a calcium-free solution (extracellular solution containing 10 mM EGTA; pH 7.4). The dye tracer Lucifer Yellow (457 kDa) was added (0.5 mg/mL) to the solution for 5 min. Cultures were then washed four times with a calcium-free solution. Samples were observed with a fluorescence microscope (MacroView MVX10 Olympus) [27].

Scrape loading

Cells were seeded in a 33 mm petri dish treated or not with BPA, C, D and C+D for a period of 24 hours. Confluent culture were incubated with HEPES Buffered-Saline solution (140 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl, 1 mM MgCl 10 mM d-glucose, 10 mM HEPES at pH 7.35)

for 10 min at room temperature. The wells were washed for 1 min with calcium-free HBS solution (Ca^{2+}-free HEPES Buffered Saline). Scraping was performed with a razor blade throughout the center of the petri dish before cells were exposed for 1 min to Lucifer Yellow (1 mg / ml). To remove excess Lucifer Yellow and cellular debris, cultures were washed with the calcium-free HBS solution. After scraping a single line, it is necessary to wait 8 min in order that the Lucifer Yellow can diffuse through the gap junctions and wash once with calcium-free HBS before observation under the microscope (LEICA inverted fluorescent microscope) with the X10 objective. The fluorescence surface wass quantified with ImageJ software.

3D migration and invasion assays

The migration and invasion study was performed with ACEA Biosciences xCELLigence Real Time Dual Cell Analyzer (RTCA DP). The RTCA software provides real-time linkage with the three cradles including real-time data analysis and display. The electronic plate for invasion and cell migration measurement was a 16-well plate (ICD-plate 16, ACEA, Biosciences). The plate is an electronically integrated 16-well Boyden chamber consisting of upper chambers and lower chambers that fit together easily. A microporous membrane serves as a base for the upper chamber allowing the cells to be translocated in the lower chamber. The lower face of this membrane is covered with microelectrode sensors detecting the presence of adherent cells. When the cells adhere to their surfaces, these microelectrodes conduct the electrical current which allows a quantitative kinetic measurement of invasion and / or cell migration from the upper chamber to the lower chamber.

Preparation of the plate under the hood:

The plate is divided into two 8-well portions for the migration measurement and 8 remaining wells for the invasion measurement. For the invasion study, the superior chambers are covered with matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix) diluted to 1/20th: 20µl of the

Matrigel solution is added to each well in the upper chamber. The plates are placed in a standard incubator for 3 hours for the matrigel to polymerize. After polymerization of the matrigel, for the entire plate (migration / invasion), 160 µl of culture medium originating either directly from U251 Mock or U251 shRNA cells, treated or not treated with BPA, C, D and C + D, or of medium recovered after confluence with D8 of the primary culture of WT or Cx43 +/- astrocytes from exposed or not mice with BPA and its chlorinated derivatives which have undergone no passage are added to the wells of the lower chamber. Then aligning the blue dots on each side, the upper chamber is nested on the lower chamber and 50µl of culture medium (U251 or astrocytes) as in the lower chambers are added in the upper chambers.

Equilibration of the plate and starting RTCA software:

The plate was placed in the xCELLigence RTCA DP and incubated for 1 hour to allow the membrane to reach equilibrium with the medium. After 1 hour of equilibration with the medium, by launching step 1 in the RTCA software, the background impedance values were determined.

Cell preparation, addition and equilibration in the plate:

After recovery of the petri dish culture medium containing the cells, the monolayer of the cells was washed with PBS and then peeled with Versen (GIBCO® by Life Technologies) 2ml / petri dish by placing it for 10 min in the incubator. The reaction was stopped by recovering the detached cells in complete medium with 10% serum. The cells were counted and then centrifuged at 1000 rpm for 10 min. From a cell pellet, a cell suspension was prepared to have a concentration of 2.5×10^6 cells / ml with the culture medium originating either directly from U251 mock or U251 shRNA cells, treated or not with BPA, C, D and C + D or of medium recovered after confluence at D8 of the primary cultures of WT or Cx43 + / - astrocytes from mice exposed or not with BPA and its chlorinated derivatives and having undergone no passage.

From the cell suspension at 2.5 × 10^6 cells / ml, 100 µl of the cells were added to each well of the upper chamber with a final number of cells at 250,000 cells / well. After adding the cells, it took 2 hours for the cells to settle well in the bottom of the wells.

Start the measurement:

The loaded plate was placed in the xCELLigence RTCA DP device inside the incubator and the measurement was programmed for a duration of 24h with readings every 15 min.

Statistical analyses

All experiments were repeated independently, at least three times. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software. All reported data are expressed as mean ± SEM and significant differences were identified by unpaired Student's *t*-test or One-way Anova. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Results

Effect of BPA and its chlorinated derivatives on Cx43 expression and functions in exposed human glioblastoma U251 cells:

In this study, we used U251 cells as a model of human glioblastoma. In a previous work, we established different U251 clones whose Cx43 expression was reduced by shRNA. One of these clones (U251 shRNA) was obtained by shRNA directed against Cx43 carboxyl terminus and showed decreased Cx43 expression both at mRNA (57.2 ± 4, 5%) and protein (24.7 ± 1.9%) levels compared with parental cells (U251 Mock) (Figure S1). Cx43 expression reduction did not affect its membrane and cytoplasmic localization whereas its coupling function was greatly diminished (66% inhibition compared to U251 Mock cells) (Strale et al., 2012). Subsequently,

toxicity of BPA and its chlorinated derivatives was assessed on U251 cells by using XTT technique. After 24h and 72h of treatment, at different concentrations (10^{-4}-10^{-7} M), we observed a toxic effect on U251 cells (Mock and shRNA) from 10^{-4}M for all treatments (BPA and chlorinated derivatives) (Figure S2). Accordingly, our *in vitro* treatment conditions were set at a concentration of 10^{-6}M during 24 hours.

Then the effects of BPA and its chlorinated derivatives on the expression of Cx43 in U251 Mock and U251 shRNA cells were estimated by quantitative RT-PCR and Western Blot at the conditions previously determined (10^{-6} M for 24h). Overall, the results showed a significant increase in expression of Cx43 mRNA for U251 Mock and U251 shRNA cells after the different treatments (BPA and its chlorinated derivatives). However, Cx43 mRNA expression remained lower for U251 shRNA compared to U251 Mock cells. However, this overall increase in expression was not observed at the protein level which was either increased after BPA (U251 Mock and shRNA cells) and C derivative (U251 shRNA cells) treatments or decreased after cocktail (U251 Mock cells) treatment (Figure 1A).

Afterwards, the effects of the different treatments were estimated on Cx43 localization by immunofluorescence. First, this approach confirmed that in the absence of treatment, Cx43 is mostly detected at the plasma membrane, particularly at intercellular contacts, but also in the cytoplasm of U251 Mock and shRNA cells (Figure 1B). Whatever the treatments (BPA, C, D and C + D), a delocalization of Cx43 from the plasma membrane to the cytoplasm was observed for U251 Mock cells (Figure 1B) with a weak membrane localization for some treatments (D, C + D). On the other hand, the situation looks different for U251 shRNA cells (Figure 1B) in which, regardless of treatments, Cx43 remains predominantly localized in plasma membrane even if those cells, as expected, express less Cx43 than U251 Mock cells.

GJIC and hemichannel functions were then estimated by scrape loading and dye-uptake assays, respectively. By this approach, all treatments significantly reduced GJIC of U251 Mock cells (Figure 2). On the other hand, for U251 shRNA cells, the situation is heterogeneous with a lack of effect (BPA or cocktail C + D) or a significant increase of GJIC after treatments with separated chlorinated derivatives (C, D) (Figure 2). To summarize, the treatments diminish GJIC of U251 Mock cells whereas it seems to be increased in the U251 shRNA cells. To complete the study, Cx43 hemichannel activity was estimated by dye uptake and did not exhibit any difference whatever the conditions for both cell types (Figure S3).

In conclusion, treatments do not act on Cx43 hemichannel activity but on coupling by either decreasing or increasing GJIC depending on Cx43 expression.

Effect of BPA and its chlorinated derivatives on Cx43 expression and functions of exposed primary cultures of astrocytes:

Astrocytes are an important part of the immediate tumor environment of glioblastoma cells. In our laboratory, we set up astrocyte primary cultures expressing different levels of Cx43 depending on their isolation from either Cx43 wild type (WT or $Cx43^{+/+}$) or heterozygous ($Cx43^{+/-}$) mice. And, we have studied the Cx43 expression level and localization in these primary cultures isolated from mice exposed *in utero* and during lactation to BPA and its chlorinated derivatives. These treatments were carried out daily *in vivo* on $Cx43^{+/+}$ mother mice fertilized with male mice $Cx43^{+/-}$ from day E0 until birth (J0) and during lactation (D0-D4) of the young mice (Figure 3A).

Our results show that Cx43 mRNA expression is increased in astrocytes WT derived from mice whose mothers have been treated with BPA or its chlorinated derivative D (Figure 3B). This effect was also observed in astrocytes WT but only for BPA treatment. In addition, as expected,

Cx43 mRNA expression of astrocyte Cx43$^{+/-}$ is lower than astrocytes WT. At the protein level, Cx43 expression is significantly increased in astrocytes derived from mice whose mothers have been treated with BPA or its chlorinated derivatives whatever their genotype (Figure 3B).

The effects of the different treatments were then estimated on Cx43 localization by immunofluorescence showing that Cx43 is located both at the plasma membrane in the cytoplasm of astrocytes in culture regardless of the treatments performed (Figure 4).

In particular, in the case of astrocytes WT, immunofluorescence reveals a strong presence of Cx43 at the plasma membrane which is characteristic of the presence of gap junctions, whatever the treatments. However, for those astrocytes, a marked cytoplasmic localization was observed for unexposed (Ctr) or cocktail exposed (C+D) conditions (Figures 4). On the other hand, for astrocytes Cx43$^{+/-}$, Cx43 membrane localization appears for each condition, accompanied by a greater cytoplasmic delocalization for BPA, C and D conditions (Figure 4).

GJIC and hemichannel functions were then estimated by scrape loading and dye-uptake assays, respectively. From this approach, hemichannel activity was not modified whatever the conditions for astrocytes WT (Figure 5B). On the other hand, for astrocytes +/-, a significant decrease of this activity was observed for BPA condition. And contrary to what was observed for U251 cells, astrocytes +/- have similar hemichannel activity or even decreased (BPA condition), compared to astrocytes WT. In conclusion, the treatments do not seem to affect Cx43 hemichannel function.

On the other hand, BPA and chlorine derivatives conditions significantly increased GJIC of WT and +/- astrocytes (Figure 5A). This increase seems to be associated with a strong membrane localization of Cx43 regardless. Moreover, as expected, a significant difference of GJIC was shown between astrocytes WT and +/- independently of the conditions.

Effect of BPA and its chlorinated derivatives exposures on 3D migration and invasion capacities of U251 cells:

To test the effect of BPA and its chlorinated derivatives on migration and invasion capacities of U251 cells, a quantitative kinetic measurement was performed every 15 min during 24 hours (Figure 6A). Subsequently, histograms corresponding to cell migration or invasion during the ascending phase of the process (10 h after the initiation of the experiment) are presented to facilitate the comparison between the different treatments and cells clones (Figure 6A).

This analysis show that U251 Mock and U251 shRNA cells have similar 3D migratory capacities, except in the absence of treatment (Ctr) where U251 shRNA cells migrate more rapidly (Figure 10A). In addition, after treatment with BPA, U251 Mock cells have greater 3D migration capacity unlike other treatments. In contrast, this capacity is decreased for U251 shRNA cells after the cocktail treatment (Figure 6A).

Considering 3D invasion, this capacity is decreased for U251 shRNA cells compared to U251 Mock cells. In other words, it appears that the invasion capacity is diminished when Cx43 is repressed by shRNA. But this invasion capacity is increased when the U251 cells, whatever they are (U251 Mock or U251 shRNA), are treated with BPA (Figure 6A). On the other hand, no difference in 3D invasion capacity was observed for the other treatments. Globally, unlike the effects produced on 3D migration, a strong effect of BPA was observed on invasion capacity unlike other treatments.

The acquisition of invasion capacity is associated with the formation of cytoplasmic protrusions, the invadopodia, which are involved in the degradation of extracellular matrix components. Therefore, after estimating the invasion capacity of U251 cells under the different treatments, the invadopodia formation of these cells was also estimated for the same conditions. Such estimation reveals that the number of total invadopodia formed per cell is significantly

higher after treatment with BPA for U251 Mock cells as well as for U251 shRNA cells. This effect is also observed after treatment with chlorinated derivatives but only for U251 shRNA cells (Figure 6C).

Moreover, in the absence of treatment, it is interesting to note that the number of invadopodia detected per U251 shRNA cell is reduced compared to that of U251 Mock cells. However, this difference is no longer observed after treatment with BPA or its chlorinated derivatives (Figure 6C).

Thus, the increase in the 3D invasion capacity of U251 Mock and U251 shRNA cells after BPA treatment (Figure 6) can be correlated with the increase of invadopodia formed by these cells. But this correlation is not observed in the case of U251 shRNA cells treated with chlorinated derivatives C and D.

Effect of the astrocyte medium from mice exposed to BPA and its chlorinated derivatives on 3D migration and invasion of U251 cells:

Tumor microenvironment may influence cancer cell behavior by secretion of soluble factors. Therefore, 3D migration and invasion capacities of U251 cells were tested in the presence of culture media from primary cultures of WT or +/- astrocytes isolated from mice exposed to BPA and its chlorinated derivatives.

By doing so, the 3D migration capacity of U251 shRNA cells was decreased in the presence of medium from WT astrocytes of BPA conditions (Figure 7). No difference was found for U251 Mock cells. As expected, it should be noted that the migration capacity of U251 shRNA cells is less important than that of U251 Mock cells in untreated (Ctr) or BPA conditions. This difference in migration capacity is not found for astrocytes of C, D or cocktail conditions.

When U251 Mock cells are in the presence of medium from primary +/- astrocytes, no difference in migration capacity is observed. In contrast, for U251 shRNA cells, this migration capacity increases after treatment with the medium of +/- astrocytes from the cocktail condition. The difference in the migration capacity between U251 Mock and U251 shRNA cells is more marked, except after treatment with conditioned medium from condition (Figure 7).

For U251 Mock cells, migration capacity is increased in the presence of media from WT astrocytes of unexposed (Ctr), D and cocktail conditions. No other significant difference, however, is observed. The migration capacity of U251 Mock cells is not affected by the different types of medium, except from WT astrocytes of D or cocktail conditions (Figure 7).

In contrast, unlike U251 Mock cells, the migration capacity of U251 shRNA cells is not increased after the addition of conditioned media unless for D (WT astrocytes) and cocktail (WT and +/- astrocytes) conditions.

In a second step, the effect of these conditions were tested on the 3D invasion capacity of U251 cells. By this approach, differences appear depending on whether the conditioned medium comes from WT or +/- astrocytes. Thus, the medium of WT astrocytes was not associated with any inhibition of the 3D invasion capacity of U251 shRNA cells except in the case of astrocytes of BPA condition (Figure 8). In the presence of medium from +/- astrocytes, the 3D invasion capacity of U251 shRNA cells was decreased if the astrocytes were of C condition. Moreover, this invasive process was less important for U251 shRNA cells compared to U251 Mock cells in the presence of conditioned medium from astrocytes of C or unexposed conditions (Figure 8). The invasion capacity of U251 Mock cells is greater with the addition of medium from WT astrocytes of D condition. Otherwise no other significant difference was observed. (Figure 8).

For U251 shRNA cells, the 3D invasion capacity is greater in the presence of medium from WT astrocytes of untreated (Ctr), D and cocktail conditions. When exposed to the medium of +/-

astrocytes, U251 shRNA cells showed no difference in invasion capacity, except for BPA, C or cocktail conditions (Figure 8).

In a second step, the number of invadopodia was estimated for U251 cells in presence of medium of astrocytes from the different conditions (Ctr, BPA and its chlorinated derivatives).

By doing so, the number of invadopodia of U251 Mock cells is equivalent in the presence of medium from WT astrocytes whatever the conditions. However, it is possible to observe significant differences between some treatments. Indeed, when astrocytes are from C condition, the number of total invadopodia per cell is decreased compared to BPA condition. In the same way, the number of total invadopodia is decreased when astrocytes are from C condition compared to cocktail condition.

For U251 shRNA cells, in the presence of medium of WT astrocytes, the number of invadopodia is significantly increased if the astrocytes are from originate from C and cocktail conditions compared to the unexposed (Ctr) condition. An increase in invadopodia between BPA condition and C, D and cocktail conditions is also observed.

After addition of medium astrocyte +/- medium, no difference is observed for U251Mock cells. On the other hand, for U251shRNA cells, a difference in the number of total invadopodia was observed between the BPA and C conditions, between the C and cocktail conditions or between the D and cocktail conditions.

The media from astrocytes (WT or +/-) increased the number of total invadopodia of U251Mock cells compared to conventional medium. On the other hand, more contrasting effects were observed for U251shRNA cells for which the medium from WT astrocytes increased the number of invadopodia for all conditions compared to the classical medium, except for BPA condition. Meanwhile, the media from +/- astrocytes increased the number of invadopodia for all conditions except for C condition.

Discussion

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive brain tumor due to its very invasive nature, responsible for its recurrence in patients. Previous studies have shown that Cx43 is involved in the process of invasion of these tumors. Indeed, there is a correlation between the invasion capacity measured *in vitro* and *ex vivo* and the level of expression of Cx43 [1]. This invasion process of GBM cells is correlated with the formation of membrane protrusions, called invadopodia. We previously showed that Cx43 is present in the the invadopodia And is implicated both in their formation process and in their capacity to degrade the extracellular matrix (ECM). Our work has shown that Cx43 is involved in that process by acting as a scaffolding protein binding to key partners necessary for the formation of long and mature invadopodia. On the other hand, we also observed that Cx43 hemichannel function intervened in the inhibition of the ECM degradation function of invadopodia. It also appeared that the GJIC function seemed incompatible with their formation [2].

GBM progression depends on complex interactions with its microenvironment (*i.e.* astrocytes) that contributes to proliferation, invasion and resistance to treatment [28,29]. In addition, certain pollutants such as BPA and its chlorinated compounds can disrupt biological processes such as reproduction or metabolism through their estrogenic effects, and have been described as potential mutagenic and carcinogenic compounds [30].

Therefore, considering all these aspects, we were interested to check the effects of Cx43 expression, astrocytic medium (taken as part of GBM microenvironment) and BPA treatments on the invasion capacity of human U251 GBM cells. Moreover, In order to emphasize on the fact that Cx43 is involved in the invasion capacity of GBM cells, we used U251 cells expressing

endogen Cx43 (U251 Mock cells) or repressed by shRNA (U251 shRNA clone) as previously described [2].

The first part of this study was to validate the Cx43 expression level of U251 Mock and U251 shRNA cells and its modulation after exposure or not to BPA and its chlorinated compounds (molecules C, D and their cocktail, C+D). By proceeding to such treatments, it appeared that Cx43 mRNA level was increased in U251 Mock and U251 shRNA cells after BPA treatment. For other treatments, the results were more heterogeneous. For instance, if Cx43 mRNA was decreased in U251 Mock cells after C+D cocktail treatment, opposite effect was obtained in U251 shRNA cells treated with molecule C. Therefore, according to the level of expression of Cx43, treatments with chlorinated derivatives of BPA cause different effects, while BPA increases the expression of Cx43, whatever its original level of expression in U251 cells.

As shown by indirect immunofluorescence, Cx43 which is mostly localized at the plasma membrane of U251 Mock cells when untreated is delocalized to the cytoplasm after treatments with BPA or its chlorinated compounds even if a weak localization in the plasma membrane is still observed for the treatments C and C+D. On the contrary, Cx43 stays mostly localized in the plasma membrane of U251 shRNA cells whatever the treatments. Therefore, depending on the initial expression of Cx43, treatments with BPA or its chlorinated compounds act differently. For U251 Mock cells that have a higher expression of Cx43, the treatments result in its significant delocalization whereas for U251 shRNA cells, Cx43 remains in the plasma membrane, regardless of the treatment.

Moreover, a significant decrease of GJIC is observed in U251 Mock cells, regardless of the treatment while it is maintained or even increased in U251 shRNA cells. These results seem to fit with the subcellular localization of Cx43. Indeed, the cytoplasmic localization of Cx43 in U251 Mock cells after treatments may explain the decrease of GJIC while, in the same conditions, the maintenance of its membrane localization allows GJIC in U251 shRNA cells.

In addition, it is worth to note that GJIC of U251 shRNA cells remains lower than U251 Mock cells regardless of the treatments. Those results suggest that in the presence of a sufficient amount of Cx43, treatments act on its localization and its communication function. In contrast, a weak Cx43 expression would cause insensitivity to the decrease of GJIC as to ensure a minimal intercellular communication.

In parallel, we performed the same study of Cx43 expression, localization and function in primary cultures of astrocytes, from Cx43 wild-type (WT) or heterozygous (+/-) 4-6 day-old mice. These young mice were exposed to BPA or its chlorinated derivatives through their mothers which were treated during their development and lactation.

Interestingly, such expositions increased the level of Cx43 in astrocytes which appeared to be mostly localized in the plasma membrane independently of their genotype (WT, +/-) and treatments. These results are globally similar to what we observed in U251 shRNA cells whereas the treatment-induced decreased GJIC in U251 Mock cells which is not associated with a decreased Cx43 expression is probably the consequence of its membrane delocalization.

The second part of our study focused on the migration and invasion process of U251 cells after treatments with BPA and its chlorinated derivatives. This study was conducted in the presence or absence of an astrocytic microenvironment mimicked by the culture media of WT or +/- astrocytes. In those conditions, the 3D migration capacity looked similar for both clones, except for control conditions where U251 shRNAs migrate more rapidly. During this 3D migration, cells undergo significant remodeling to pass from an upper compartment to a lower one through 8µm-diameter pores. In a such similar study, it was shown that the decrease of Cx43 in U118 human glioma cells would increase migration by reducing adhesion to the ECM, and changing their collective migration to an individual way of migrating. Moreover, in this work, GJIC appeared to play a more important role in migration than the cytoplasmic interactions of the C-terminal part of Cx43. This study also revealed that the decrease of Cx43 promotes migration

by increasing the speed and influencing the direction of the cells, but it does not allow estimating the role of GJIC in collective migration [31].

During the 3D invasion process, cancer cells undergo both cellular deformation combined ECM degradation. And by testing this capacity, our results show that when Cx43 is repressed in U251 shRNA cells, the invasion capacity is also decreased. Unlike the migration process, 3D invasion then shows a very marked effect of BPA treatment compared to other treatments. We can also note that, after treatment, the difference of invasion capacity between U251 Mock and U251 shRNA cells is no longer found. It is known that during this 3D invasion process, invadopodia, play an important role in ECM degradation. We previously showed that these structures exhibit different kinetics of formation and degradation function depending on the level of expression of Cx43. And, indeed, for U251 Mock cells, under control conditions, the formation of invadopodia is faster and the ECM degradation is greater in the case of U251 Mock cells than U251 shRNA cells which express less Cx43 (Chépied et al. , submitted). This process seems to be due the capacity of Cx43 to act as a scaffolding protein. These characteristics explain the difference in the observed invasion process between U251 Mock and U251 shRNA cells. This result is confirmed by the quantification of the total number of invadopodia in these two cell types under control conditions. Indeed, U251 shRNA cells have a decreased number of invadopodia compared to that of U251 Mock cells.

The number of total invadopodia formed by U251 Mock cells is significantly greater after treatment with BPA than control conditions. While this increase in invadopodia number formation is found for BPA, C and D treatments for U251shRNA cells, this could explain an identical 3D invasion capacity between the two cell types after these treatments. The increase in the 3D invasion capacity of U251 Mock and U251 shRNA cells after BPA treatment can therefore be correlated with an increase in the number of total invadopodia.

But then how to explain that after treatment with BPA or its chlorinated derivatives, the invasive process is no longer different between U251 Mock and U251 shRNA cells? Our results show that, despite the increased expression of Cx43 after certain treatments, the expression of Cx43 in U251 shRNA cells is still lower than U251 Mock cells. The same type of idea can be made concerning GJIC. Indeed, despite its increase, GJIC is constantly more important for U251 Mock cells than U251 shRNA cells. The only apparent but unquantifiable difference is the subcellular localization of Cx43. For U251 Mock cells, Cx43 is highly localized in the cytoplasm after treatment, whereas membrane localization remains present for U251 shRNA cells. Invadopodia are membrane protrusions forming at very specific domains of the plasma membrane that are lipid rafts. At this level, our previous studies have shown that Cx43 which localizes in these lipidic platforms plays an important role in scaffolding proteins necessary for invadopodia formation such as actin, cortactin, src, cofilin, etc. It would therefore be interesting to quantify the possible links between Cx43 and these key proteins, within U251 cells after treatments with BPA and its chlorinated derivatives. Perhaps, then, it would be possible to differentiate theCx43 which is localized in the plasma membrane and involved GJIC from Cx43 that are specifically involved as a scaffold protein necessary for invadopodia formation. The amount of total invadopodia produced in correlation with the 3D invasion process seems to be related to the localization of Cx43 within the lipid platforms. This would explain the increase in invasion capacity and the number of invadopodia of U251 shRNA cells compared to U251 Mock cells resulting in identical processes after treatment, contrary to what is observed under control conditions.

By considering 3D migration, U251 shRNA cells migrate less than U251 Mock cells under control conditions and in medium from astrocytes from mice exposed to BPA whereas no difference is found for C, D and cocktail exposures. This result shows that the microenvironment (astrocytic medium) influences the migratory capacity of U251 cells in a

manner depending on the expression level of Cx43 but without any apparent effect of the medium of astrocytes from mice exposed to BPA and its chlorinated compounds for U251 Mock cells. On the other hand, the U251 shRNA cells whose Cx43 is repressed are sensitive to these conditions. In addition, compared to the conventional medium, the migration capacity of the U251 Mock cells increases in medium of WT astrocytes but does not seem to be affected by the medium of astrocytes from other conditions except from mice exposed to molecule D or the cocktail. On the other hand, the migration capacity of U251 shRNA cells is not increased in medium of astrocytes except if they are from mice exposed to the D molecule (WT astrocytes) and to the cocktail (WT and +/- astrocytes). Thus, the addition of the astrocyte culture medium from mice exposed to treatments D and C + D seems to affect the migratory capacity of U251 mock and U251 shRNA cells compared with conventional medium. These results show that modulation of the microenvironment can affect the behavior of U251 cells. But why and how only astrocytic media from mice exposed to D and C + D treatments affect this migration capacity of U251 cells?

As for 3D invasion, the result shows that U251 shRNA cells are less invasive than U251 Mock cells in the presence of the medium of +/- astrocytes from unexposed mice (Ctr) and exposed to C. In the presence of WT astrocyte medium, no invasion difference was observed between U251 mock and U251 shRNA cells except for BPA exposition. However, in the presence of the WT astrocyte medium, U251 shRNA cells exhibit an invasive capacity similar to U251 Mock cells. This result shows that modulation of the expression level of Cx43 in the microenvironment can influence the invasiveness of U251 cells. In addition, compared with the conventional medium, the 3D invasion capacity of the U251 Mock cells does not seem to be affected by the different types of WT astrocyte media except in the presence of the medium of WT astrocytes from mice exposed to D treatment that increases it. For U251 shRNA cells, the 3D invasion capacity is greater in the presence of WT astrocyte media from untreated (CTR)

mice or exposed to D and the cocktail. After invasion, in presence of medium from +/- medium, no difference was observed for U251 Mock cells. Likewise, U251 shRNA cells show no difference in their invasion function except for BPA, C molecule or C+D mixture treatments. As for 3D migration, U251 shRNA cells are more sensitive to the modulation of the microenvironment. Indeed, mouse exposures with BPA and its chlorinated compounds affect the 3D invasive capacity of U251 shRNA cells in a manner which depends on the expression level of Cx43 in astrocytes.

Moreover, in the presence of WT astrocyte medium, U251 Mock cells form the same total number of invadopodia compared to the control conditions but with significant differences between the different exposures. For U251 shRNA cells, the number of invadopodia increases in the presence of WT astrocyte medium from mice exposed to C and the cocktail compared to CTR condition. In addition, an increase in invadopodia is observed between BPA exposure and the C, D and cocktail exposures. Furthermore, in the presence of +/- astrocyte medium, the result shows no difference in the number of invadopodia formed in U251 Mock cells, but on the other hand, a difference is observed between the different exposures This result of the total number of invadopodia shows that there is a correlation with the results obtained in 3D invasion, allowing us to say that U251 shRNA cells whose Cx43 is repressed (U251 shRNA) are more sensitive to the effects of exposures and the modulation of the Cx43 level of expression of astrocytes of the microenvironment. In comparison with classical medium, in the presence of astrocyte media, U251 Mock cells exhibit increased formation of invadopodia whereas, for U251 shRNA cells, such an increase is also observed except for BPA (WT astrocyte medium) and C (+/- astrocyte medium) conditions. Globally, astrocyte media seem to favor the formation of invadopodia within U251 cells.

The study of 3D migration and invasion as well as the formation of invadopodia in U251 cells in the presence of astrocyte from mice exposed to BPA and its chlorinated compounds seems to reveal two aspects. On one hand, this study reveals that the level of Cx43 expression in the astrocytic microenvironment is important and may promote the ability of 3D migration and invasion of U251 cells. On the other hand, this study also reveals that U251 shRNA cells whose Cx43 is repressed are sensitive to the modulation provided to the microenvironment whatever it is (Cx43 expression level or or exposures). The tumor microenvironment appears to facilitate the invasive process of U251 cancer cells in a manner which depends on the expression level of Cx43. In addition BPA treatments and its chlorinated derivatives affect this process of invasion more in cells expressing low levels of Cx43.

Ethics approval and consent to participate

All animal experimental procedures were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for care and use of laboratory animals and conformed to the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests (Animal Health and Protection Veterinary Service). The protocol was approved by the ethics committee "COMETHEA no. 84" (no. 02.160).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

Not applicable

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by funds from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (Comités de la Vienne, Deux-Sèvres and Charente-Maritime) and "Cancéropole Grand Ouest". ZDO was recipient of a doctoral fellowship from Djibouti and IK from Indonésie

Authors' contributions

ZDO performed experiments, analysed the data, and wrote the manuscript. IK and AC contributed to technical support. LT contributed to animals care. MM coordinated the project and wrote the manuscript. ND conceived the hypothesis, designed the study, coordinated the study, interpreted data and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Dr E. Hervouet for his gift of the U251 shRNA clone. The technical support of AC Balandre was appreciated. We are grateful to the imaging platform ImageUP of the University of Poitiers and Dr A. Cantereau for her helps.

References

[1] Strale PO, Clarhaut J, Lamiche C, Cronier L, Mesnil M, Defamie N. Down-regulation of connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion. Mol. Carcinogenesis. 2012; 51: 845-60.

[2] Chepied A, Daoud-Omar Z, Meunier-Balandre AC, Laird DW, Mesnil M, Defamie N. The gap junction protein, connexin43, is involved in formation and function of invadopodia in human glioblastoma cells.. Submitted.

[3] European Union, Report EUR 17549, 1997

[4] Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. Toxicology. 2006;226(2-3):79-89.

[5] Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. Environ Health Perspect. 2010 Aug;118(8):1055-70.

[6] Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev. 2012 Jun;33(3):378-455.

[7] Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Navalón A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. Reprod Toxicol. 2007 Aug-Sep;24(2):259-64.

[8] Jiménez-Díaz I, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navea N, Navalón A, Fernández MF, Olea N, Vílchez JL..Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Dec 15;878(32):3363-9.

[9] Vela-Soria F, Ballesteros O, Zafra-Gómez A, Ballesteros L, Navalón A. 18. UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. Anal Bioanal Chem. 2014 Jun;406(15):3773-85

[10] Liao C, Kannan K. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environ Sci Technol. 2012 May 1;46(9):5003-9.

[11] Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method. Talanta. 2012 Oct 15;100:175-82.

[12] Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. J Neurosci Res. 2006 Nov 1;84(6):1197-205.

[13] Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. Neurosci Lett. 2007 Jun 13;420(2):100-5.

[14] Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, Kato S, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. Brain Dev. 2012 Jan;34(1):57-63.

[15] Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, Edwards M, Connelly JJ, Rissman EF. Gestational exposure to low dose bisphenol A alters social behavior in juvenile mice. PLoS One. 2011;6(9):e25448.

[16] Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C, Nakazawa K, Amano K, Sajiki J, Shimizu E. Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Dec 3;39(2):273-9.

[17] Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. Environ Health Perspect. 2004 Aug;112(11):1159-64.

[18] Honma T, Miyagawa M, Suda M, Wang RS, Kobayashi K, Sekiguchi S. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on brain neurotransmitters in female rat offspring. Ind Health. 2006 Jul;44(3):510-24.

[19] Matsuda S, Saika S, Amano K, Shimizu E, Sajiki J. Changes in brain monoamine levels in neonatal rats exposed to bisphenol A at low doses. Chemosphere. 2010 Feb;78(7):894-906.

[20] Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C, Nakazawa K, Amano K, Sajiki J, Shimizu E. Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Dec 3;39(2):273-9.

[21] Pannasch U, Derangeon M, Chever O, Rouach N. Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. Commun Integr Biol. 2012 May 1;5(3):248-54.

[22] Stehberg J, Moraga-Amaro R, Salazar C, Becerra A, Echeverría C, Orellana JA, Bultynck G, Ponsaerts R, Leybaert L, Simon F, Sáez JC, Retamal MA. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. FASEB J. 2012 Sep;26(9):3649-57.

[23] Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. Reprod Toxicol. 2004 May;18(3):413-21.

[24] Ayala I,Baldassarre M, Giacchetti G, Caldieri G, Tetè S, Luini A, Buccione R. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. J. Cell Sci. 2008; 121:369-78.

[25] Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc. Natl. Acad. Sc.i U S A. 2002; 99:495-500.

[26] Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. Cancer Res. 2006; 66: 3034-3043.

[27] Beaty BT, Wang Y, Bravo-Cordero JJ, Sharma VP, Miskolci V, Hodgson L, Condeelis J. Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. J. Cell Biol. 2014; 205: 737-751.

[28] Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. Glia 2011; 59, 1169–1180.

[29] Li G, Qin Z, Chen Z, Xie L, Wang R, Zhao H. Tumor Microenvironment in Treatment of Glioma. Open Med. 2017; 12, 247–251.

[30] Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2014; 37, 738–758.

[31] Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. Oncotarget 2015; 6, 11447–11464.

Figure legends

Figure 1: The effect of BPA and its chlorinated derivatives on the expression (mRNA and protein) and localization of Cx43 in U251 Mock and U251 shRNA cells. A) The cells were treated or not with BPA or its chlorinated derivatives (Ctr, BPA, C, D, C + D) at the concentration of 10^{-6} M, for 24 hours. The level of Cx43 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to GAPDH mRNA. The data are presented as percentage of the control condition by using Graph Prism ± SEM (n = 3, upper part of the figure). The level of Cx43 protein expression was analyzed by Western blotting. The detected bands corresponding to Cx43 were quantified by ImageJ software. The data are presented as percentage of the control condition by using Graph Prism ± SEM (n = 3; the figure). Overall, if the amount of Cx43 mRNA is significantly increased after treatment regardless of the cell type, the effect is more heterogeneous at the protein level. B) For U251 mock cells, in the absence of treatment, Cx43 (green) is localized at the level of the plasma membrane (arrow heads) but also in the cytoplasm (arrows) of the cells. In the presence of any treatment (BPA, C, D and C+D), the Cx43 is delocalized from the plasma membrane to the cytoplasm with the maintenance of a weak localization in the plasma membrane for some treatments (D, C+D). For U251 shRNA cells, in the absence of treatment, Cx43 (green) is localized in the plasma membrane (arrow heads) but also in the cytoplasm (arrows) of the cells. Whatever the treatments (BPA, C, D and C+D), Cx43 remains localized at the level of the plasma membrane. The localization of Cx43 (green) is compared to actin (red). The white rectangles represent the enlarged areas (zoom). (Scale bar: 50 µm, zoom: 10 µm).

Figure 2: Estimation of the gap junctional intercellular communication (GJIC) capacity of U251 Mock and U251 shRNA cells treated or not treated with BPA and its chlorinated derivatives by scrape loading. The images corresponding to the diffusion of Lucifer Yellow are shown for U251 Mock and U251 shRNA cells under the different conditions tested (Ctr,

BPA, C, D, C+D). The diffusion of Lucifer Yellow from the damaged cells (scrape), and corresponding to the GJIC capacity, was quantified by ImageJ. This quantification, indicated as an area of Lucifer Yellow incorporation, is shown as histograms for U251 Mock and U251 shRNA cells, respectively. This approach confirms that all treatments significantly reduce GJIC of U251 Mock cells compared to the control condition (Ctr). The effect of the treatments is more heterogeneous for U251 shRNA cells for which GJIC is either unchanged (BPA, C+D) or increased (C, D). The data are presented as mean ± SEM (n = 3). Scale bar: 100 µm.

Figure 3: Expression of Cx43 (mRNA and protein) in primary cultures of astrocytes derived from mice (Cx43 +/- and Cx43 +/+) treated or not during pregnancy and lactation with BPA and its chlorinated derivatives (C, D, C+D). A) Protocol of exposure to BPA or its chlorinated derivatives throughout the gestation and lactation of the mice. B) The level of Cx43 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to GAPDH mRNA. The data are presented as percentage of the control condition by using Graph Prism ± SEM (n = 3, upper part of the figure). The level of Cx43 protein expression was analyzed by Western blotting. The detected bands corresponding to Cx43 were quantified by ImageJ software. The data are presented as percentage of the control condition by using Graph Prism ± SEM (n = 3; the figure). The results obtained from astrocytes derived from Cx43 +/- and Cx43 + / + mice are indicated by Astro +/- and Astro WT, respectively. These results confirm that astrocytes derived from Cx43 +/+ mice express more Cx43 than those from Cx43 +/- mice. These results also show that if the amount of Cx43 protein is increased significantly after treatment (BPA, C, D, C+D) regardless of the genotype of the cells, the effect is more heterogeneous at the mRNA level.

Figure 4: Localization of Cx43 in primary cultures of WT and +/- astrocytes (Astro WT and Astro +/-) from young mice whose mothers were treated or not with BPA and its chlorinated derivatives. For WT astrocytes, whatever the treatments (Ctr, BPA, C, D, C+D),

Cx43 (green) is detected at the level of the plasma membranes (arrow heads, and arrows) as well as in the cytoplasm (big arrow heads) of astrocytes characterized by high expression of GFAP (red). However, cytoplasmic staining of Cx43 appears to be more important in the cytoplasm of astrocytes derived from certain conditions (Ctr, C+D). For +/- astrocytes, Cx43 (green) is detected at the level of the plasma membrane (arrow heads and arrows) and in the cytoplasm (big arrow heads) of astrocytes characterized by high expression of GFAP (red). On the other hand, a greater cytoplasmic delocalization is visible for certain conditions (BPA, C, D). The white rectangles represent the enlarged areas (zoom). The nuclei of the astrocytes are stained in blue. (Scale bar: 50 µm, zoom: 10 µm).

Figure 5: Estimation of the gap junctional intercellular communication (GJIC) capacity and hemichannel activity of Cx43 in primary astrocytes (WT and +/-) from young mice whose mothers were treated or not with BPA and its chlorinated derivatives. A) GJIC of astrocytes was estimated by scrape loading using Lucifer Yellow. The images corresponding to the diffusion of Lucifer Yellow are shown for astrocytes WT and +/- from mice whose mothers were treated with BPA and its chlorinated derivatives (BPA, C, D, C+D) or not (Ctr). The diffusion of Lucifer Yellow from damaged astrocytes (scrape), and corresponding to the GJIC capacity, was quantified by ImageJ. This quantification, indicated as an area of Lucifer Yellow diffusion is shown as histograms for astrocytes WT and +/-, respectively. This approach indicates that all treatments significantly increase the GJIC capacity of astrocytes regardless of their genotype. Data are presented as mean ± SEM (n = 2). Scale bar: 100 µm. B) Photos taken with the fluorescence macroscope visualize the incorporation of Lucifer Yellow (green), reflecting the hemichannel activity in astrocytes (Astro WT) and (Astro +/-). The quantification of Lucifer Yellow incorporation spots was performed using ImageJ and is represented as histograms ± SEM (n = 3). *, Significant difference for the same treatment between astrocytes

WT and +/-. *, Significant difference between different treatments for astrocytes +/-. Scale bar: 2 mm.

Figure 6: Estimation of 3D migration and invasion capacities and quantification of invadopodia formed by U251 Mock and U251 shRNA cells after treatment or not with BPA and its chlorinated derivatives. The 3D migration (A) and invasion (B) data obtained using the RTCA DP program are plotted against time (hours) over a 24 hour period (n = 2) for U251 Mock and U251 shRNA cells. The histograms on the right of the figure allow to compare 3D migration (A) and invasion (B) capacities between U251 Mock cells (unmarked columns) and U251 shRNA cells (striped columns), 10 hours after beginning the experiment (± SEM, n = 2). *, Significant difference for the same treatment between U251 Mock and U251 shRNA cells. *, Significant difference between different treatments for U251 shRNA cells. *, Significant difference between different treatments for U251 Mock cells. C) The histograms represent the total number of invadopodia per U251 Mock or U251 shRNA cell for the different treatments tested (Ctr, BPA, C, D, C+D). The histogram presented to the right of the figure allow to compare the results obtained between the two cell types (± SEM, n = 3). In the absence of treatment, the number of invadopodia formed per cell is higher for U251 Mock cells than U251 shRNA cells. BPA significantly increases the number of the invadopodia in both cell types while the chlorinated derivatives only increase it for U251 shRNA cells.

Figure 7: Estimation of the 3D migration capacity of U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of medium of WT or +/- astrocytes from young mice whose mothers were treated or not with BPA and its chlorinated derivatives. The 3D migration data which were obtained using RTCA DP are plotted against time (hours) over 24h (n = 2) for U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of the medium of astrocytes WT (A) or +/- (B). The histograms on the right of the figure allow to compare the 3D migration capacities between U251 Mock cells (unmarked columns) and U251 shRNA cells (striped columns), 10 hours after the start of the

experiment (± SEM; n=2) for the indicated conditions. C) Histograms allowing to compare the percentage of 3D migration of U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of media from U251 cells or astrocytes WT and +/-. *, Significant difference for the same treatment between U251 Mock and U251 shRNA cells. *, Significant difference between different treatments for U251 shRNA cells.

Figure 8 : Estimation of the 3D invasion capacity and quantification of the numbers of invadopodia formed by U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of medium of WT or +/- astrocytes from young mice whose mothers were treated or not with BPA and its chlorinated derivatives. The 3D invasion data obtained using RTCA DP are plotted as a function of time (hours) over a 24 hour period (n = 2) for U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of culture media. Astrocytes WT (A) or +/- (B). The histograms on the right of the figure allow to compare the 3D invasion capacities between U251 Mock cells (unmarked columns) and U251 shRNA cells (striped columns), 10 hours after the start of the experiment (± SEM; n = 2) for the indicated conditions. C) Histograms allowing to compare the percentage of 3D invasion of U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence of media from U251 cells or astrocytes WT and +/-. *, Significant difference for the same treatment between U251 Mock and U251 shRNA cells. *, Significant difference between different treatments for U251 shRNA cells. *, Significant difference between different treatments for U251 Mock cells. D) Histograms ± SEM (n = 3) represent the numbers of invadopodia per cell after the treatments. U251 mock / astrocytes WT and CX43 +/- and U251 shRNA/astrocytes WT and CX43 +/-. *, difference for the same treatment between U251 Mock and U251 shRNA cells; *, difference between different treatments within U251 shRNA; *, difference between different treatments within U251 Mock cells.

Figure 1:

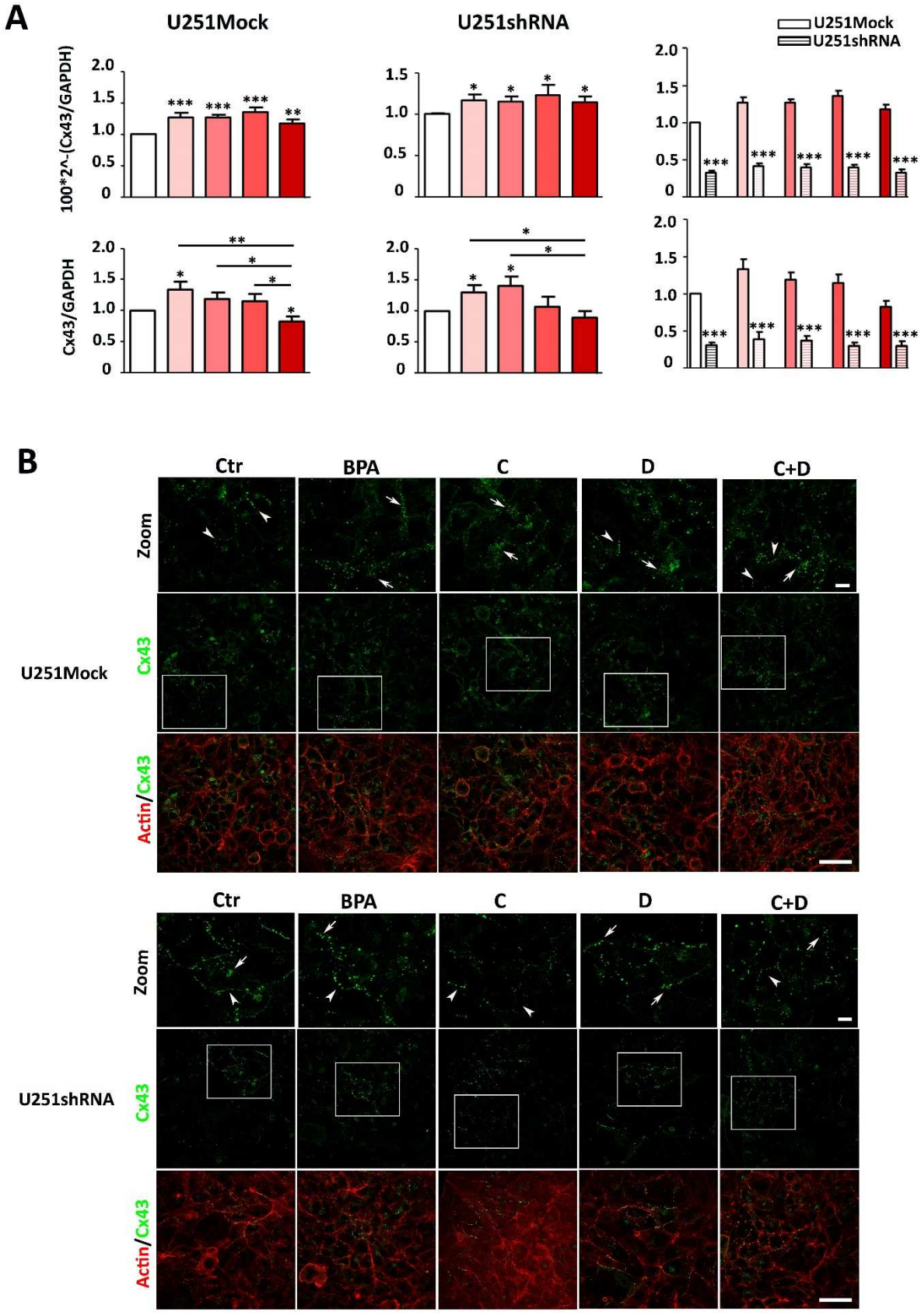

A
U251Mock
U251shRNA
U251Mock
U251shRNA
100*2^-(Cx43/GAPDH)
Cx43/GAPDH
B
Ctr
BPA
C
D
C+D
Zoom
U251Mock
Cx43
Actin/Cx43
U251shRNA

Figure 2:

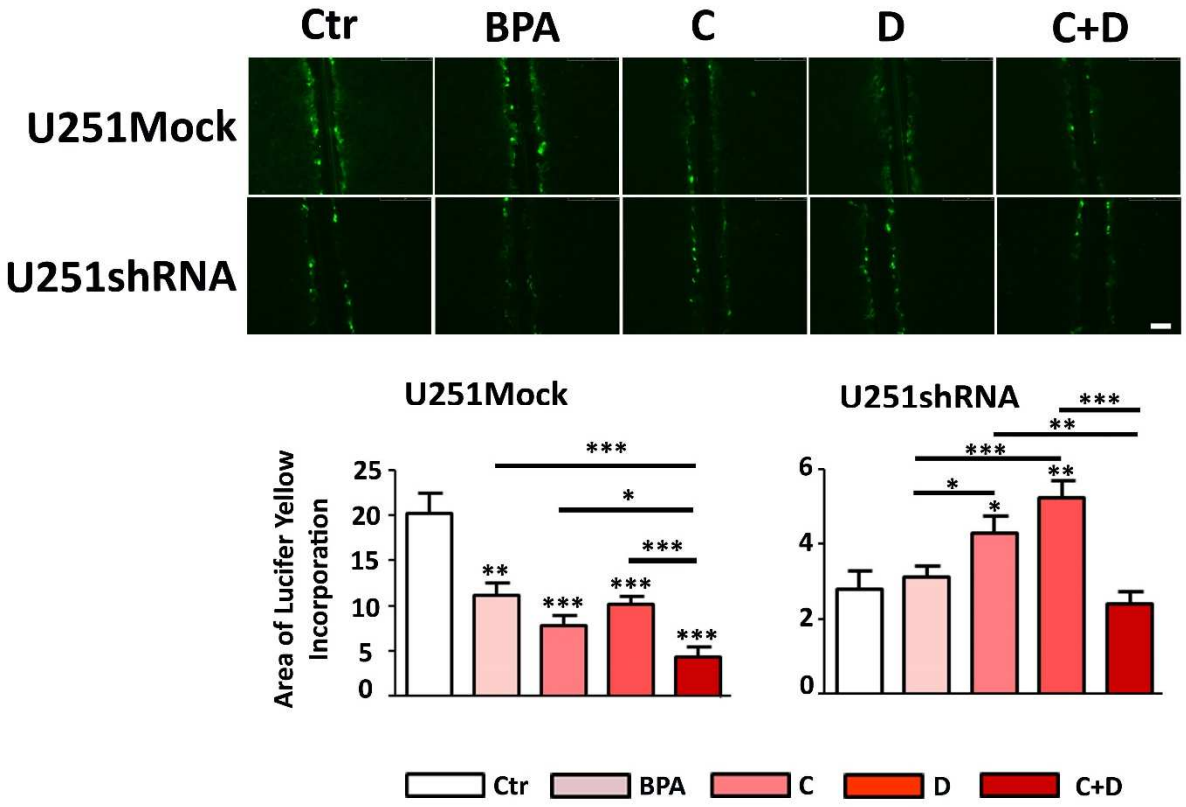

Ctr
BPA
C
D
C+D
U251Mock
U251shRNA
U251Mock
U251shRNA
Area of Lucifer Yellow Incorporation
25
20
15
10
5
0
6
4
2
0
***
*
**
Ctr
BPA
C
D
C+D

Figure 3:

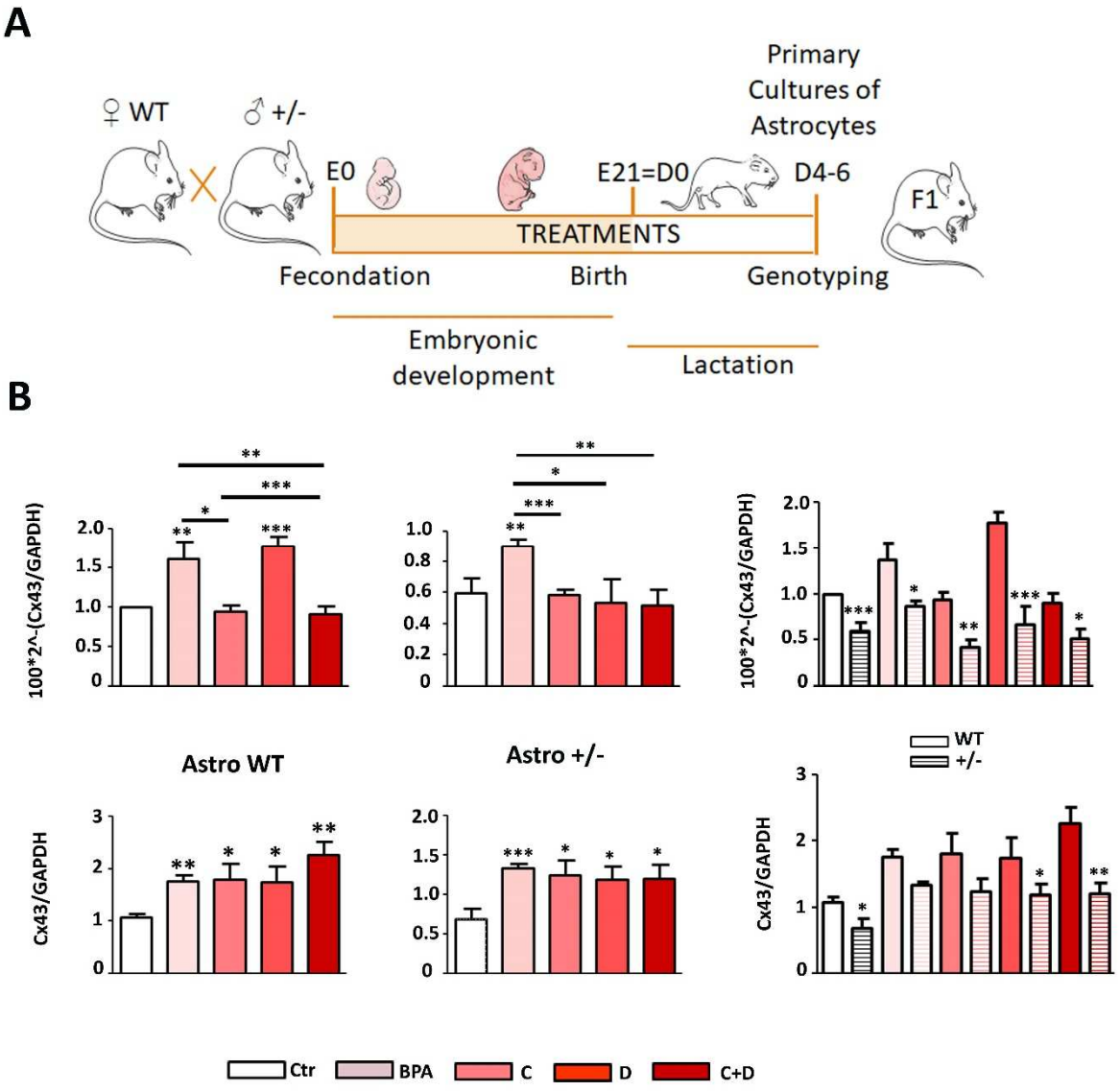

A
♀ WT
♂ +/-
E0
E21=D0
D4-6
Primary Cultures of Astrocytes
F1
TREATMENTS
Fecondation
Birth
Genotyping
Embryonic development
Lactation
B
100*2^-(Cx43/GAPDH)
Astro WT
Astro +/-
Cx43/GAPDH
WT
+/-
Ctr
BPA
C
D
C+D

Figure 4:

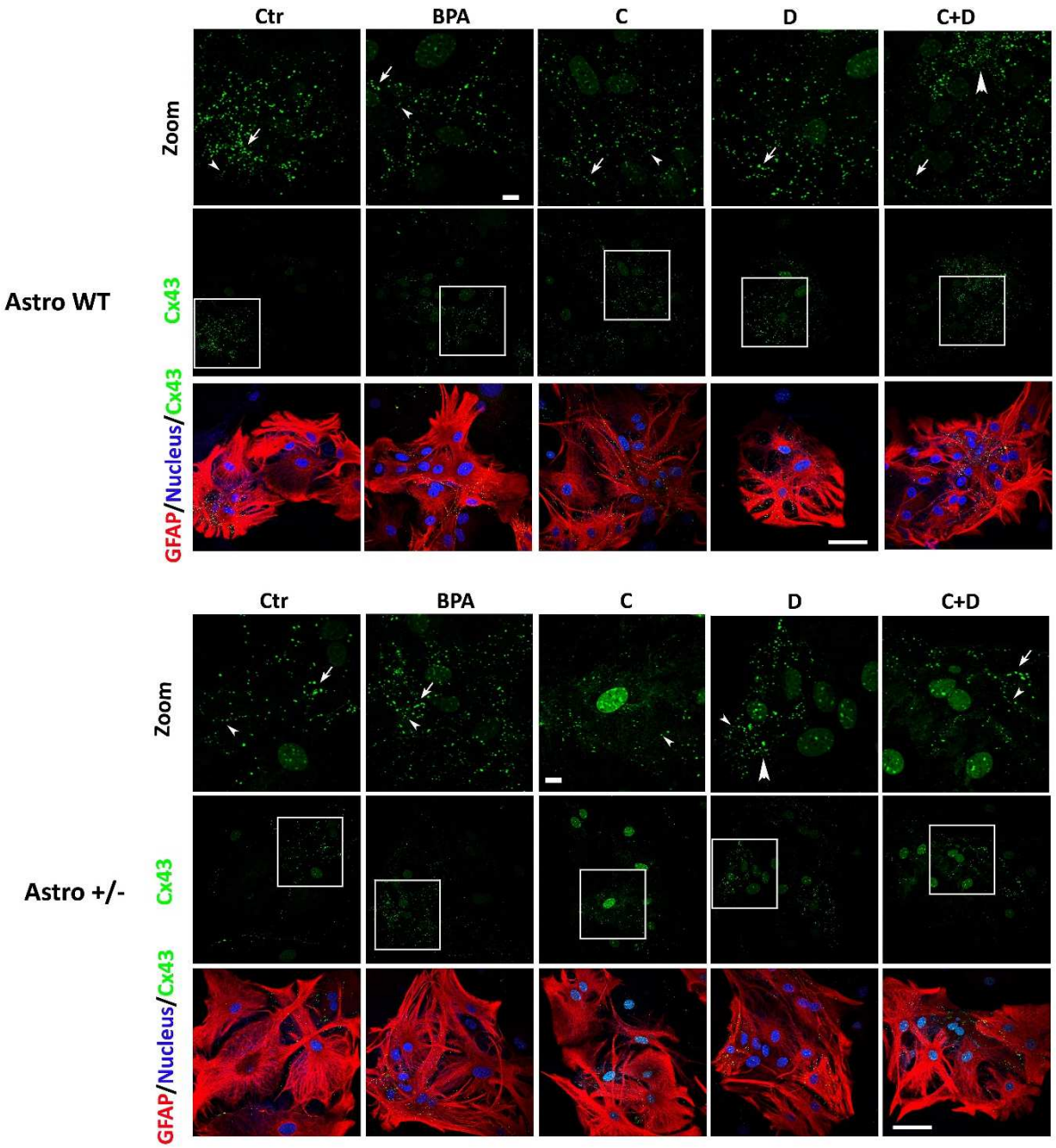

Ctr
BPA
C
D
C+D
Zoom
Cx43
GFAP/Nucleus/Cx43
Astro WT
Ctr
BPA
C
D
C+D
Zoom
Cx43
GFAP/Nucleus/Cx43
Astro +/-

Figure 5:

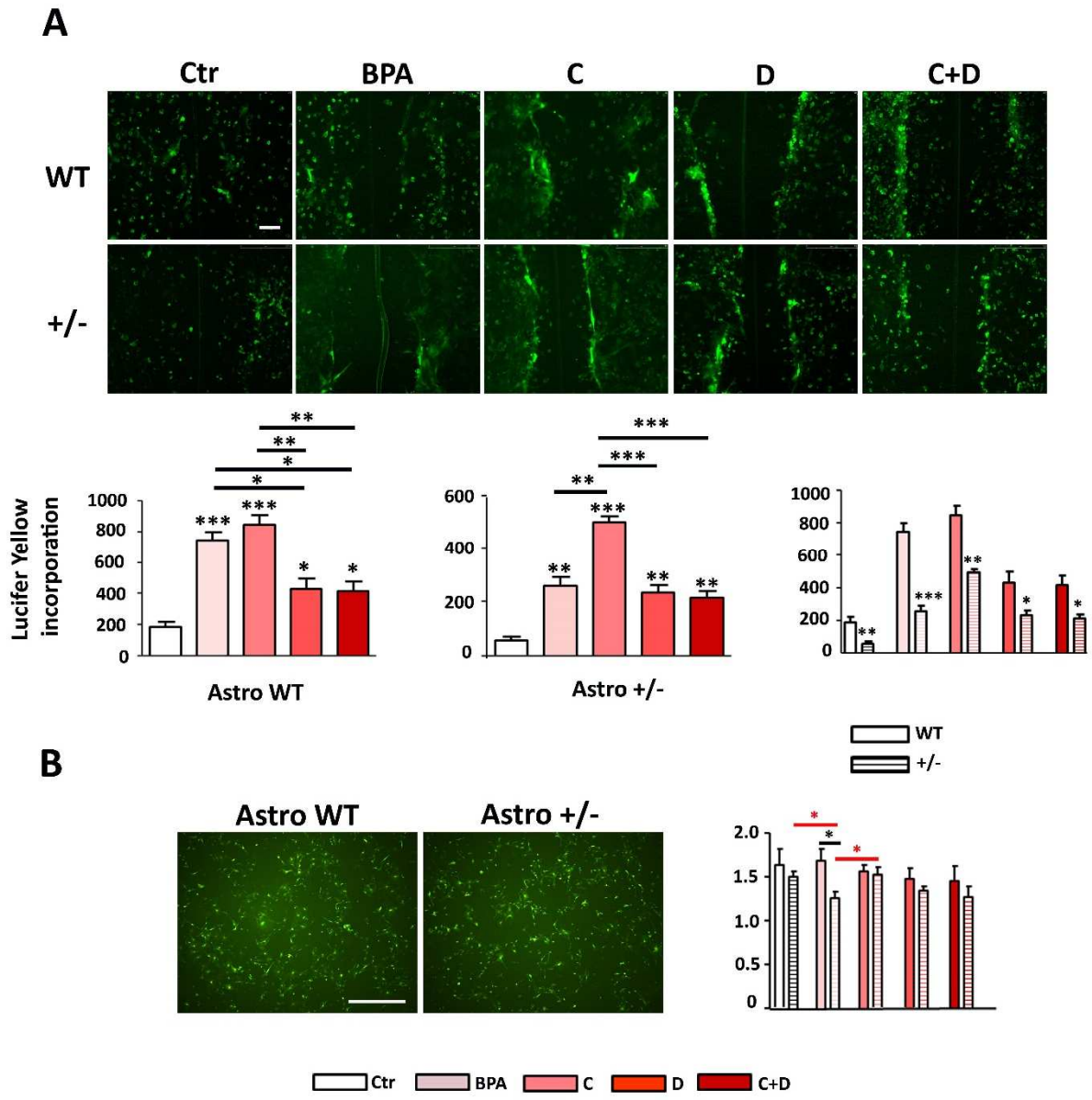

A
Ctr
BPA
C
D
C+D
WT
+/-
Lucifer Yellow incorporation
Astro WT
Astro +/-
B
Astro WT
Astro +/-
WT
+/-
Ctr
BPA
C
D
C+D

Figure 6:

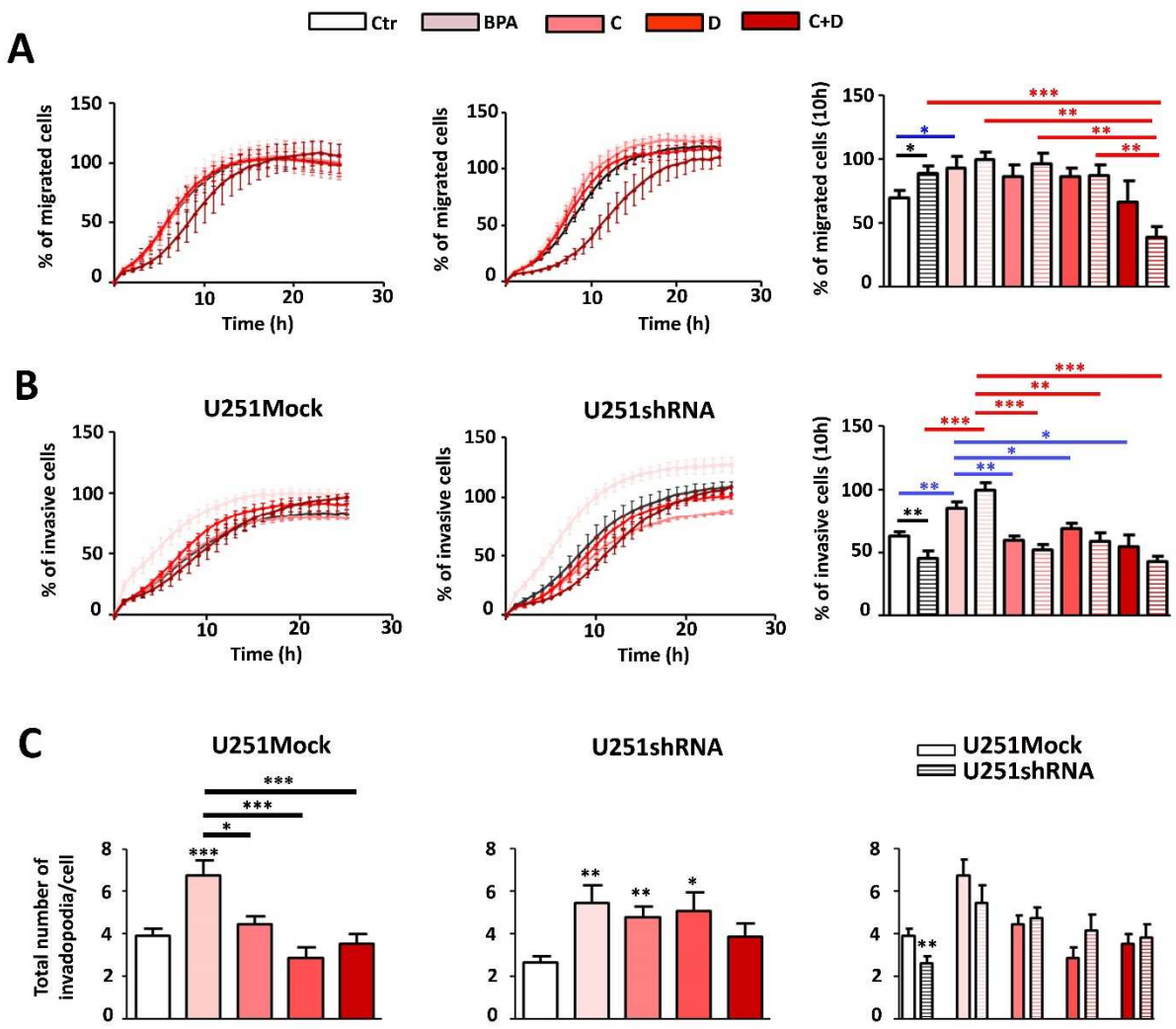

Ctr
BPA
C
D
C+D
A
% of migrated cells
Time (h)
% of migrated cells (10h)
B
U251Mock
U251shRNA
% of invasive cells
% of invasive cells (10h)
C
U251Mock
U251shRNA
Total number of invadopodia/cell

Figure 7:

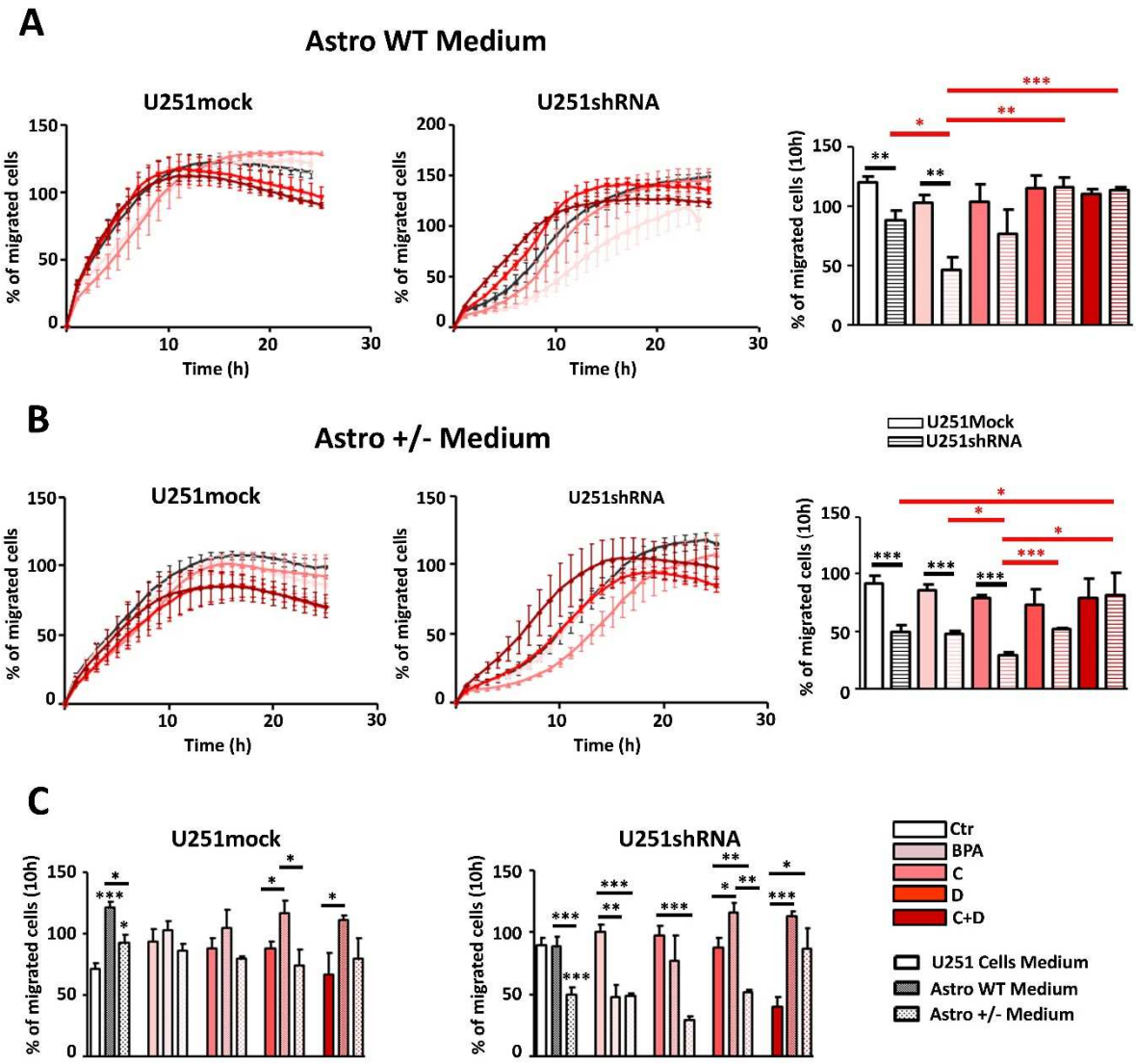
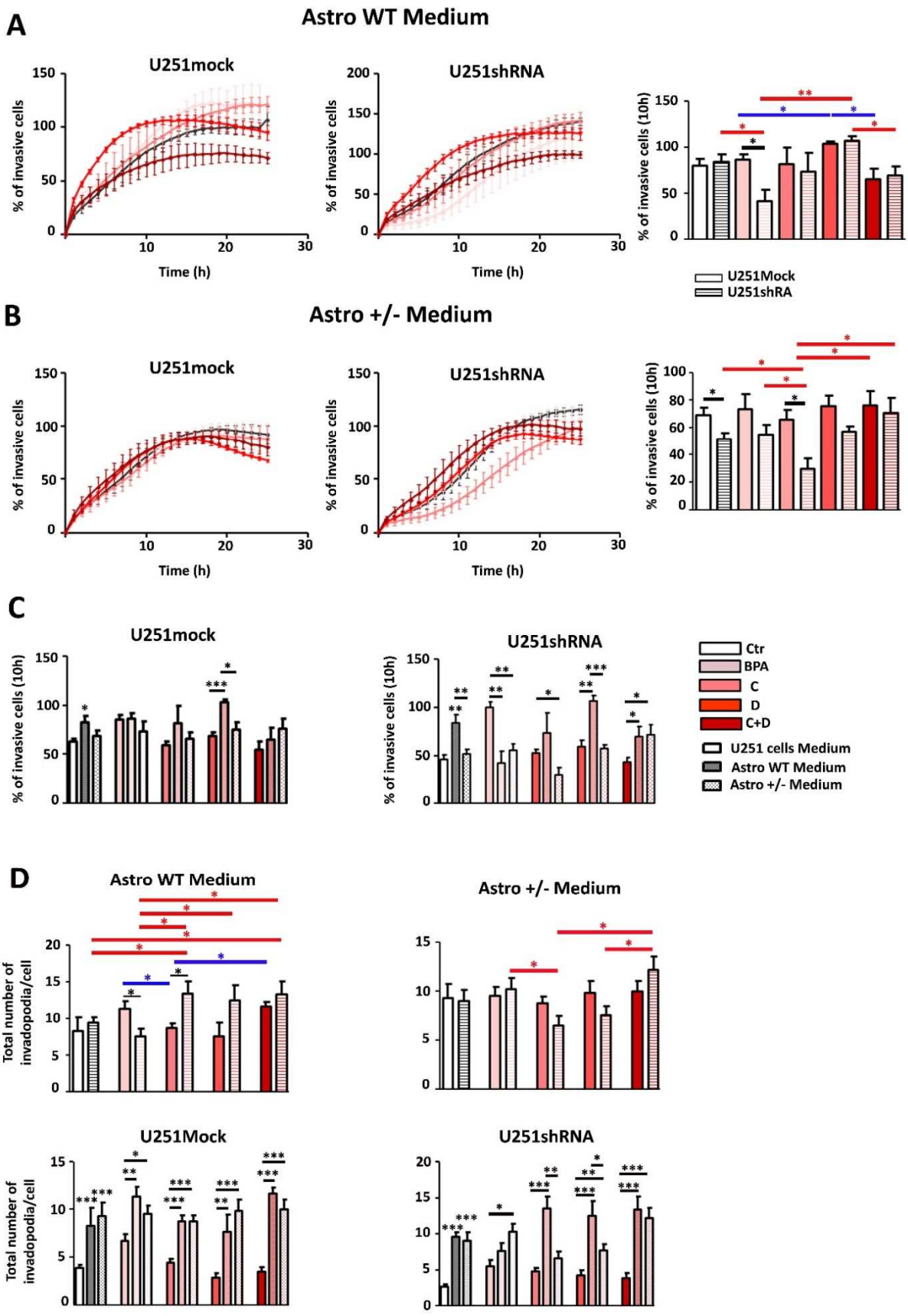

A
Astro WT Medium
U251mock
U251shRNA
% of migrated cells
Time (h)
% of migrated cells (10h)
B
Astro +/- Medium
U251Mock
U251shRNA
C
U251mock
U251shRNA
% of migrated cells (10h)
Ctr
BPA
C
D
C+D
U251 Cells Medium
Astro WT Medium
Astro +/- Medium

Figure 8 :


A
Astro WT Medium
U251mock
U251shRNA
% of invasive cells
Time (h)
% of invasive cells (10h)
U251Mock
U251shRA
B
Astro +/- Medium
C
Ctr
BPA
C
D
C+D
U251 cells Medium
Astro WT Medium
Astro +/- Medium
D
Astro WT Medium
Astro +/- Medium
Total number of invadopodia/cell
U251Mock
U251shRNA

Supplementary Figures legend

Figure S1: Expression level of Cx43 in U251 Mock and shRNA cells. Expression levels of mRNA and Cx43 protein were compared between U251 Mock and U251 shRNA cells by quantitative RT-PCR (left) and Western blot (right), respectively. Histograms ± SEM (n = 3) show decreased expression of Cx43 both at the transcriptional and protein level in U251 shRNA cells compared to U251 Mock cells. The expression of Cx43 is quantified by comparison with GAPDH.

Figure S2: *In vitro* toxicity of BPA and its chlorinated derivatives on U251 Mock and U251 shRNA cells. Toxicity estimation was performed using the XTT technique. For this, colorimetric measurements (OD 490nm) were taken 24h and 72h after seeding 6,000 cells / well for the different treatments Ctr (solvent), BPA, C, D and C+D, at different concentrations (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} and 10^{-7}M). The results show that U251 Mock and U251 shRNA cells do not exhibit any particular toxicity associated with their level of Cx43 expression. For both cell types, no treatment is toxic for doses less than or equal to 10^{-5}M. Toxicity significantly appears from 10^{-4}M for all treatments. The data are mean ± SEM (n = 3) from duplicate tests.

Figure S3: Estimation of the hemichannel activity in U251 Mock and U251 shRNA cells treated or not with BPA and its chlorinated derivatives. Photos taken with the fluorescence macroscope visualize the incorporation of Lucifer Yellow (green), reflecting the hemichannel activity of the U251 Mock and U251 shRNA cells in the presence or absence of FFA, a specific inhibitor of the hemichannel activity of Cx43 (scale bar: 2 mm). Quantification of Lucifer Yellow incorporation spots was performed using ImageJ and is represented as histograms ± SEM (n=3).

Figure S1:

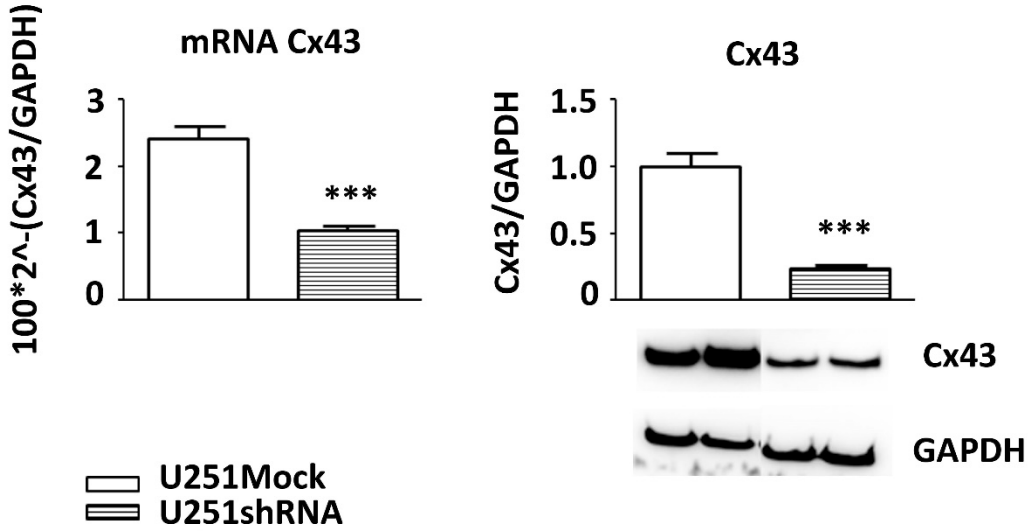


Figure S2:

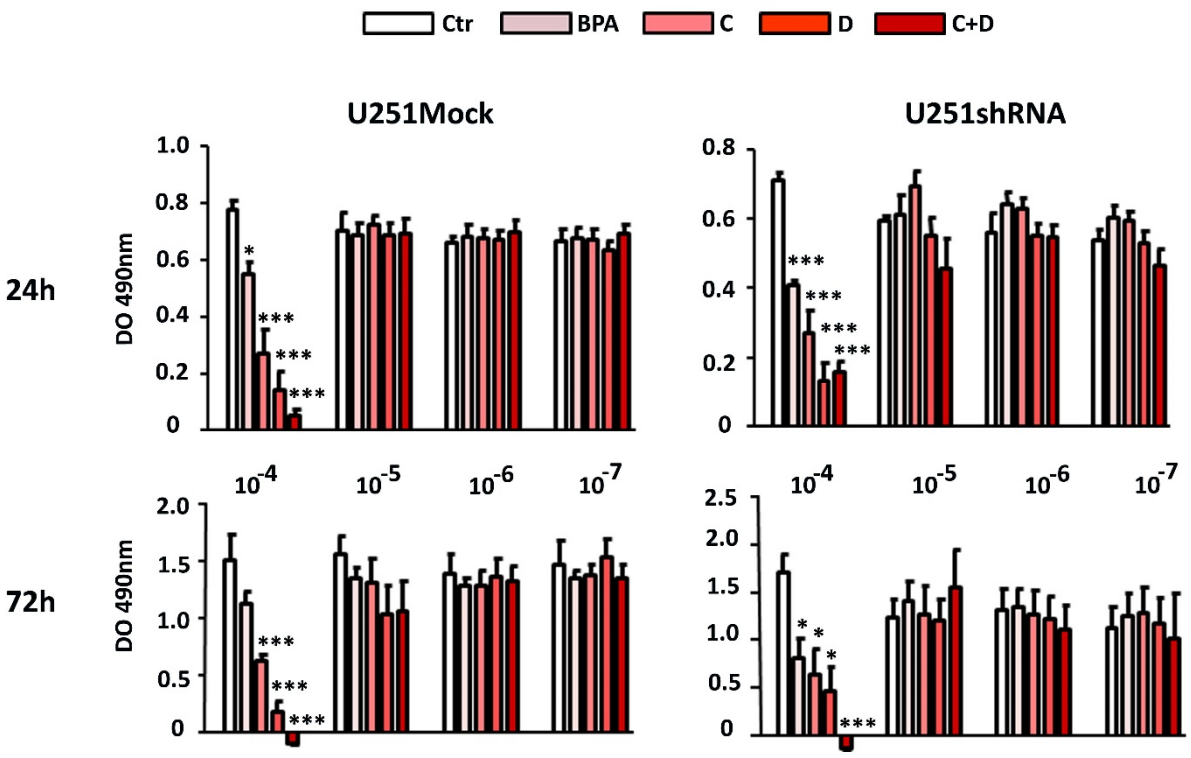
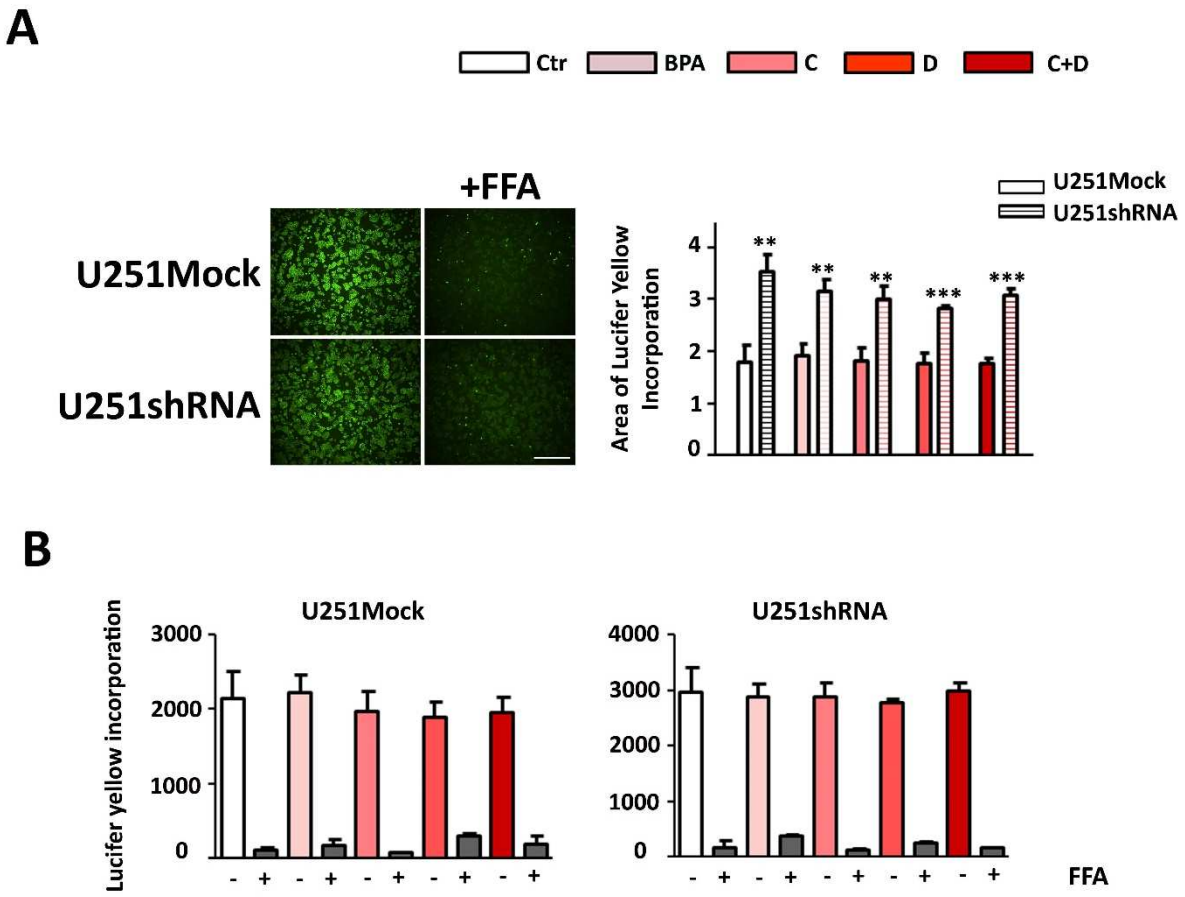


Figure S3:


A
Ctr
BPA
C
D
C+D
+FFA
U251Mock
U251shRNA
U251Mock
U251shRNA
Area of Lucifer Yellow Incorporation
0
1
2
3
4
**
**
**
***
***
B
U251Mock
U251shRNA
Lucifer yellow incorporation
0
1000
2000
3000
4000
- + - + - + - + - +
FFA

The gap junction protein, connexin43, is involved in formation and function of invadopodia in human glioblastoma cells

Amandine CHEPIED[1], Zeinaba DAOUD OMAR[1], Annie-Claire MEUNIER-BALANDRE[1], Dale W. LAIRD[2], Marc MESNIL[1], Norah DEFAMIE[1].

(Soumis)

The gap junction protein, connexin43, is involved in formation and function of invadopodia in human glioblastoma cells

Amandine CHEPIED[1], Zeinaba DAOUD OMAR[1], Annie-Claire MEUNIER-BALANDRE[1], Dale W. LAIRD[2], Marc MESNIL[1], Norah DEFAMIE[1]

[1]Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, CNRS, University of Poitiers, 1 rue G. Bonnet – TSA 51 106, 86073 Poitiers Cedex 09, France.

[2]Department of Anatomy and Cell Biology, Schulich School of Medicine and Dentistry, The University of Western Ontario, London, ON, Canada.

Corresponding author:

Dr. Norah DEFAMIE, Group « Canaux et Connexines dans les Cancer et Cellules Souches (4CS)», Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, CNRS-ERL 7003 - University of Poitiers, 1, rue Georges Bonnet - TSA 51 106 - 86073 Poitiers Cedex 09 - France
Tel: [33](0)5 49 45 39 75 - Fax: [33] (0)5 49 45 40 14
e-mail: norah.defamie@univ-poitiers.fr

Total number of figures: 8

Abbreviations:

Cx43: Connexin43; Ct: Carboxy-terminus; ECM: Extracellular matrix; FA: Focal adhesion; FAK: Focal adhesion kinase; FFA: Flufenamic acid; FG-Gelatin: Fluorescent green gelatin; GJIC: gap junctional intercellular communication; LY: Lucifer yellow; MMP: Matrix metallo-proteinase; MT1-MMP:

Membrane-associated type-I transmembrane MMP; matrix metalloproteinase; N-WASP: N-Wiskott–Aldrich syndrome protein.

Abstract (200 words max)

The resistance of glioblastomas to treatments is mainly the consequence of their invasive capacities. Therefore, in order to better treat these tumors, it is important to understand the molecular mechanisms which are responsible for this behavior. Previous work suggested that gap junction proteins, the connexins, facilitate the aggressive nature of glioma cells. Here, we demonstrate that one of them, connexin43 (Cx43), is implicated in the formation and function of invadopodia responsible for invasion capacity of human glioblastoma cells. Immunofluorescent approaches combined with confocal analysis revealed that Cx43 was detected in all formation stages of invadopodia exhibiting proteolytic activity. Clearly, Cx43 appeared to be localized in invadopodia at low cell density and less associated with the establishment of gap junctions. Accordingly, lower extracellular matrix degradation correlated with less mature invadopodia and MMP2 activity when Cx43 expression was decreased by shRNA strategies. Moreover, the kinetics of invadopodia formation was dependent on Cx43 dynamic interactions with partners including Src and cortactin. Interestingly it also appeared that invadopodia formation and MMP2 activity is dependent of Cx43 hemichannel activity. In conclusion, these results reveal that Cx43 is involved in the formation and function of the invadopodia of glioblastoma cells.

Keywords: Cell invasion, Connexin, Gap junction, Glioblastoma, Invadopodia

Introduction

The most common brain tumor in adults, glioblastoma, is characterized by a low 5-year survival (less than 3% for primary glioblastoma or ~10% for secondary glioblastoma) [1]. Such a low curability is mostly the consequence of glioblastoma cells disseminating and infiltrating widely within the brain, rendering the tumor resection incomplete. Therapy is further hindered by the resistance of these infiltrating cells to chemo- and radiotherapies. Therefore, elucidating the molecular mechanisms responsible for glioblastoma invasion is necessary to develop more adapted therapeutic targets.

During the last decade, several *in vitro* studies revealed that the expression of the gap junction protein, connexin43 (Cx43), could favor migration and invasion of brain tumor cells [2-4]. Similar observations were not only obtained in the glioma context but also during development since Cx43 seems necessary for cortical migration of neuron precursors [5] and neural crest cells [6-8]. Paradoxically, Cx43 was initially considered a tumor suppressor as glioma cell expression of Cx43 decreased their proliferation *in vitro* and *in vivo* [9-11]. Such observations conferred to Cx43 opposing roles in glioma cells; acting as a tumor suppressor by decreasing cell growth in one context and acting as an oncogene by increasing invasion capacity in another [12]. How Cx43 mediates such contradictory effects is unknown although data obtained with rat C6 glioma cells and neuron precursors provided a hint that suggests that regulation of migration and invasion is linked to protein interactions that occur at the Cx43 carboxy terminus (Ct) [13, 14]. These results led to the hypothesis that the intracellular Ct domain of Cx43 mediates rearrangement of actin cytoskeleton, thus affecting cell migration [15, 16] even if Cx43 hemichannels were also suggested to have an effect on migration as shown for neurite outgrowth [17].

The actin cytoskeleton is involved in the invasion process by playing a key role in focal adhesions (FAs) [18, 19] and invadopodia formation and function [20, 21]. FAs permit adhesion to extracellular matrix (ECM) components and invadopodia their degradation. FAs are characterized by integrin clusters connected to actin fibers while invadopodia are membrane protrusions which form as a consequence of rapid actin polymerization [22, 23]. Tumor cell invasion is a consequence of coordinated mechanisms acting on FA turnover and digestive processes favored by invadopodia formation. Such coordination is possible through a common set of proteins that temporally and spatially acts on FA formation and invadopodia growth [24]. One of these proteins is Src which interacts with focal adhesion kinase (FAK) for activating integrins and adhesion [25-27]. Apparently, such interaction prevents Src from engaging in invadopodia formation [28]. When Src is released from FA, it phosphorylates key components (cortactin, N-WASP, cofilin) required for invadopodia formation which is initiated by recruiting the scaffold protein TKS5 [28, 29]. Several of the key actors modulating invadopodia growth (cortactin, Src, cofilin) are known to interact with the Ct domain of Cx43 [30, 31]. However, despite these observations, the molecular mechanisms linking Cx43 to tumor cell invasion remain obscure.

To better understand the role played by Cx43 in invasion, we used a human glioblastoma cell line, U251. These cells endogenously express Cx43 and are invasive [32]. To circumvent limitations associated with overexpressing Cx43 to assess the role of Cx43 in tumorigenesis, we used shRNAs to downregulate its expression. In this study, we show for the first time that Cx43 is a component of the protein complex involved in the formation and function of invadopodia. Upon Cx43 knockdown in U251 cells, the number and length of invadopodia were decreased. Our data suggest that Cx43 acts on invadopodia through its interactome by bringing together the molecular components (src, cortactin) necessary for their formation but not through its hemichannel activity which negatively regulates the kinetics of their formation and function.

Materials and Methods

Antibodies

Monoclonal antibodies directed against Cx43 (BD Transduction Laboratories, NJ, USA), cortactin, MT1-MMP (Millipore, Billerica, USA) and GAPDH (HyTest, Turku, Finland) were used as well as polyclonal antibodies directed against FAK, P-FAK pY^{397}, P-cortactin pY^{466}, Src (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), P-Src pY^{416} (Cell Signaling, Danvers, USA) and TKS5 (Millipore). Anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were conjugated to HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) for Western blot or to Alexa Fluor® antibodies (Molecular Probes, Eugene, USA) for immunofluorescence. Fluorescent labelling of actin cytoskeleton was performed by using TRITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

Cell culture conditions

Human U251 glioblastoma cell line and its two shRNA derived Cx43 knockdown clones (shRNA 1 and shRNA 2 clones) [32] were cultured in high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Lonza, Brussels, Belgium) supplemented with foetal bovine serum (FBS; 10%, Lonza), L-glutamine (0.5 mM, Sigma-Aldrich) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, Lonza). Cultures were maintained in a water-saturated incubator (37°C, 5% CO_2). Routine cultures were kept under selection pressure (1 µg/mL of puromycin) to maintain an adequate Cx43 knockdown. Moreover, in order to limit the number of passages, clones were initially expanded during their selection to have sufficient stock to perform the scope of studies. Results were obtained from cells that had not reached passage 10. When specified, petri dishes were coated with gelatin (0.2%) in PBS for one hour at room temperature before seeding cells. In some cases, cells were treated for 1 h with PP2

(10mM) in DMSO (Calbiochem, Darmstadt, Germany), a Src inhibitor, or flufenamic acid (FFA; 100µM; Sigma-Aldrich), a connexin channel inhibitor [33].

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated using an SV Total RNA isolation kit according to the instructions of the manufacturer (Promega, Charbonniere-les-Bains, France). Briefly, total RNA (1 mg) was reversely transcribed using Superscript II (Invitrogen). The reactions of qPCR were performed in 20 mL total volume with 2.5 pmol of each primer, 10 ml of SYBRgreen Master Mix 2X (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 0.5 mL of template. The amplification and analysis were performed using an ABI Prism 9500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Samples were compared using the relative CT method. Specific primers for Cx43 and housekeeping gene (GAPDH) were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium): (1) Cx43 (BC026329): mCx43-forward, 5'-GTG-CCG-GCT-TCA-CTT-TCA-TTA-AG-3'; mCx43-reverse, 5'-CCA-AGG-CGC-TCC-AGT-CA-3' and (2) GAPDH (NM002046): GAPDH-forward, 5'-TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA-GC-3'; GAPDH-reverse, 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GAG-3'.

Invadopodia synchronization

U251 cells were cultured on Oregon Green® 488-conjugated gelatin (FG-Gelatin; Molecular Probes) for 24 h in the presence of 5 µM BB94 (Santa Cruz) to block metalloproteases and invadopodia formation. BB94 was then washed out to allow synchronous invadopodia formation [34].

Western blot

Proteins were subjected to electrophoretic separation using 10% polyacrylamide-SDS gel (InVitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire,

UK). Membranes were blocked in 1 M Tris-buffer saline solution (pH 8.0) containing Tween 20 (0.1%) and non-fat dry milk (5%) for 3 h at room temperature. Blots were then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies against Cx43 (1:1000), cortactin (1:1000), GAPDH (1:40000) and MT1-MMP (1:1000) or polyclonal antibodies against P-cortactin (1:1000), total Src (1:1000), Y416 P-Src (1:1000), FAK (1 :1000), P-FAK (1:1000) and TKS5 (1:1000) followed by detection using HRP-conjugated antibodies (DakoCytomation) and an enhanced chemiluminescence kit (ThermoScientific, IL, USA). Densitometric analyses were performed using ImageJ software.

Fluorescent-gelatin degradation assay

Sterilized coverslips were coated with 0.01% (w/v) poly-L-lysine solution (Sigma) for 40 min at room temperature, washed with PBS, and fixed with 0.5% glutaraldehyde (Sigma, Saint-Louis, USA) for 15 min followed by extensive washing. Then, coverslips were inverted on a 30 µL drop of Oregon Green® 488-conjugated gelatin (Molecular Probes, Eugene, USA) and incubated at room temperature for 10 min. For inserts, 30 µL of Oregon Green® 488-conjugated gelatin (0.2%) were added on for 10 min, 20 µL gelatin were removed and inserts were put at 37°C for 1 h. Once rinsed with PBS, residual reactive groups in gelatin were quenched with sodium borohydride (5 mg/mL) for 5min followed by extensive washing with PBS.

To assess the ability of cells to form invadopodia and to degrade matrix, cells were plated on coverslips (15 x 10^3 cells/mL) or inserts (10^4 cells/mL) coated with fluorescent gelatin in 24-well plates and maintained in a water-saturated incubator (37°C, 5% CO2). After such a preparation, indirect immunofluorescence was performed [29].

Indirect immunofluorescence

Immunodetection of Cx43, cortactin, P-FAK, TKS5 and MT1-MMP was performed on cells (U251 mock and shRNA clones) present on coverslips or inserts coated with fluorescent gelatin

as described previously. F-actin was detected using TRITC-phalloidin. Cells were fixed in paraformaldehyde (4%) for 20 min at room temperature. After incubation in a blocking solution (2% bovine serum albumin, 1% Triton X-100 in PBS), cells were incubated with primary antibodies (1:250) overnight at 4°C. Alexa Fluor® 555 or 647 - conjugated antibodies (1:250, Invitrogen) and/or TRITC-phalloidin (1:50) were then applied on the preparations for 1 h. Coverslips or inserts were mounted afterwards with Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) prior to observation with confocal microscopy.

Confocal fluorescence microscopy

Confocal images were obtained using a Olympus IX81 laser scanning confocal inverted microscope with 40X UAPO ID/340UV NA 1,35 oil or 60X O.N. 1.4 PLAPO oil objectives. Images were processed with FluoView software.

Co-immunoprecipitation

In presence of antibodies against Cx43, 200 µg of protein from each cell type (U251 mock and shRNA clones) were incubated in RIPA buffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 1% NP40; 1 mM Na_3VO_4; 50 mM NaF) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. The immune complexes were collected by incubating the mixture with 50 µL of protein G-sepharose beads for 2h. Non-specifically bound proteins were removed by washing the beads 5 times in 1mL RIPA buffer after centrifugation. Bound material was then solubilized in 30 µL of two-fold concentrated Laemmli sample buffer and boiled for 5min. Then, samples were analysed by Western blot.

Zymography

In Petri dishes containing confluent cells, culture medium was replaced for 4 h by FBS-free medium. Then, FBS-free medium was changed for 24 h. Culture medium was collected,

centrifuged and concentrated. Proteins were quantified and loaded in a migration gel (1.5 mm thickness; 10% polyacrylamide-SDS; 0.3% gelatin) for 1.5h at 120V. Gel was incubated 3 times in water containing 2.5% Triton-X-100 for 1 h and washed with incubation buffer (50 mM Tris; 10 mM $CaCl_2$; 150 mM NaCl; 2.5 µM $ZnCl_2$; 0.05% Brij 35; pH 7.5) for 20 min and left in this buffer for 48 h at 37°C. Gel was stained for 1 h with Coomassie blue (10% acetic acid; 30% methanol; 0.5% Coomassie blue) and discoloured (4% acetic acid, 8% methanol) 5 times for 20 min each. Lysis bands were observed and quantified using ImageJ software.

Dye uptake assay

One hour before experimentation, if necessary, 100 µM FFA were added in culture medium of Petri dishes or in the bottom compartment of the Boyden chamber in inserts. After 10 min, FFA was washed out and U251 cells were incubated at 37°C for 10 min in a calcium-free solution (extracellular solution containing 10 mM EGTA; pH 7.4). The dye tracer Lucifer Yellow (457 kDa) was added (0.5 mg/mL) to the solution for 5 min. Cultures were then washed four times with a calcium-free solution. Samples were observed with a fluorescence microscope (MacroView MVX10 Olympus) [35].

Statistical analyses

All experiments were repeated independently, at least three times. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software. All reported data are expressed as mean ± SEM and significant differences were identified by unpaired Student's *t*-test or One-way Anova. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Results

U251 cells form invadopodia

In order to assess if U251 cells develop invadopodia and degrade ECM, they were seeded on FG-gelatin. Five hours later, black areas of digested gelatin became visible underneath cells as observed by confocal microscopy (Fig. 1). At most of these gelatin-depleted areas, two components enriched in invadopodia, cortactin and F-actin, were detected revealing these invasive structures as ventral protrusions of U251 cells (Fig.1A). Moreover, colocalization of cortactin with the membrane-associated type-I transmembrane MMP (MT1-MMP) or TKS5 in areas of gelatin degradation confirmed these structures as invadopodia (Fig. S1A and S1B). Since studies showed that invadopodia and FA share common components (actin, cortactin), we specifically looked for the presence of FAK as a surrogate for positioning FA. The presence of FA in U251 cells was indeed demonstrated by detecting the activated phosphorylated form of FAK (P-FAK) in zones distinct from matrix degradation where cortactin was not expressed (Fig. 1B). Moreover, the fact that P-FAK was colocalized with cortactin and associated with gelatin degradation at the leading edge of cells suggested they were constituents of lamellipodia necessary for cell migration (Fig. 1B).

Cx43 is a component of invadopodia

Since Cx43 was suggested to support cancer cell invasiveness [5-8], its presence and localization was assessed in U251 cells seeded on FG-gelatin. Cx43 appeared to be localized in ventral protrusions at the location of digested areas where F-actin accumulated (Fig. 2A). Moreover, we observed that Cx43 was also colocalized with cortactin and TKS5 (Fig. S2A and S2B). In contrast, Cx43 was not colocalized with P-FAK and sites of cell-cell apposition (Fig. 2B). As such, it appears that Cx43 could represent a marker of invadopodia and not of FAs.

Formation of invadopodia can be divided into three stages: initiation/invadopodium precursor (stage I), assembly/polymerization stage (stage II) and maturation/mature invadopodium (stage III) [24, 36]. To distinguish these stages, U251 cells were seeded on filters (pores of 1 µm

diameter) coated with FG-gelatin (Fig. 3C, scheme). Through colocalization of F-actin and cortactin, invadopodia development was revealed across the 1µm-pores of the filter. We distinguished 3 different lengths of active invadopodia, called lengths I, II or III which correlate to the stages described above (Fig. 3C, right panel). Invadopodia appeared 4 hours after seeding the cells (length I) while lengths II and III were observed 6 and 8 hours later, respectively (Fig. 3A). Using confocal microscopy, Cx43 was detected at the basis of length I structures and mostly at the tip of the invadopodia at lengths II and III (Fig. 3B).

Cx43 interacts with key proteins in formation of invadopodia

Knowing that Cx43 interacts with many partners through its Ct domain, we therefore tested for the expression of some important proteins in the formation process of the invadopodia, and their possible interaction with Cx43. Since Src-dependent phosphorylation modulates Cx43 function (found in invadopodia but not in FA) and FAK (found in FA but not in invadopodia), we were interested to compare their respective amount (Cx43, FAK and Src) in U251 cells when cultured in conditions permitting invadopodia formation (gelatin) or not (plastic). By western-blot, it appeared that those conditions did not affect Cx43 levels, even in presence or absence of PP2, a src activity inhibitor (Fig. 4A, Cx43). Similar results were found for FAK, P-Src, cortactin and MT1-MMP, except for P-FAK, Src and TKS5, whose levels were higher when cells were cultured on gelatin compared to plastic (Fig. 4A, P-FAK; Fig 4B, Src and TKS5). Thus, in conditions permitting invadopodia formation, an increase of specific protein expression was observed (Fig.4A, P-FAK; Fig 4B, Src and TKS5).

In parallel, by performing co-immunoprecipitation, we showed that Src/Cx43 and cortactin/Cx43 interactions were increased when cells were seeded on gelatin (Fig 4D). However, no difference was observed for MT1-MMP/Cx43 interaction in the different culture conditions (Fig. 4D, right). Furthermore, co-immunoprecipitation revealed no interaction

between Cx43 and P-Src, FAK, P-FAK, P-cortactin or TKS5 (data not shown). Taken together, these results suggest that Cx43 acts on invadopodia growth by interacting with partners such as Src and cortactin. Indeed, on plastic, when invadopodia formation is not permitting, Cx43/Src or cortactin interactions were weak. On the contrary, when invadopodia formation is stimulated by gelatin, these interactions became significantly increased. Since Src and cortactin are known to be key proteins involved in invadopodia formation, Cx43 interaction with these two key proteins is probably essential for invadopodia formation.

Interestingly, Src and cortactin expression were increased and P-Src or P-cortactin was decreased on gelatin when Src autophosphorylation was inhibited by PP2 (Fig. 4B, src and P-src; C, P-cortactin). In contrary, no effect of PP2 was found on P-FAK (Fig. 4, P-FAK).

As it has been already shown in the process of invadopodia formation [28, 29], Src autophosphorylation, needed for its activation and cortactin phosphorylation, is not involved in Cx43 expression nor in its interaction with Src and cortactin.

Therefore, Cx43 could act also as an interacting protein as shown by its localization in invadopodia. This assumption was even confirmed by cultivating cells at different densities. When cells were grown at high density that promoted gap junction plaque formation, less invadopodia were observed (Fig. S3A and S3C). These results suggest that gap junctions and invadopodia formation would depend on culture densities (Fig. S3B).

Cx43 knockdown is associated with reduced gelatin degradation

The presence of Cx43 at different lengths of invadopodia formation suggests that it may be involved in their formation and growth. To verify if Cx43 is really involved in the formation of invadopodia, two Cx43 shRNA clones exhibiting decreased Cx43 expression (60-75%) were used [32]. When seeded on FG-gelatin, both clones showed a reduction in their ability to digest

FG-gelatin (Fig. 5A). The capacity of Cx43 shRNA cells to degrade FG-gelatin was 1.5-3 times less than mock cells (Fig. 5C). Moreover, immunofluorescence confirmed that Cx43 expression was decreased in both Cx43 knockdown clones (Fig. 5A) while cortactin localization was not changed. These results show that decreased FG-gelatin degradation is correlated with inhibition of Cx43 expression. MT1-MMP being detected in invadopodia of U251 cells (Fig. S1), we tested matrix metalloproteinase 2 (MMP2) activity by zymography. This approche revealed that MMP2 activity was slightly decreased in Cx43 knockdown cells compared to controls (Fig. S4B).

Cx43 knockdown is associated with decreased invadopodia formation and growth

In addition to Cx43 knockdown resulting in decreased FG-gelatin digestion, there was a significant reduction in the number of invadopodia per shRNA cell compared to mockcells (Fig. 5D). To assess if the stage of invadopodia formation was affected by reduced Cx43 expression, 8 hours after seeding cells on gelatin-coated filters, the number of invadopodia reaching lengths II (slice xy b) and III (slice xy c) were quantified (Fig. 5B, bottom panel). Mock cells exhibited the highest number (3 to 4) of invadopodia per cell for both lengths (Fig. 5E). Cx43 knockdown cells (shRNA 1) exhibited a similar number of length II invadopodia but half (2 per cell) length III compared to mock cells while shRNA 2 cells exhibited a low number (2 per cell) of lengths II and III invadopodia (Fig. 5E). Therefore, the reduced number of invadopodia was related to decreased Cx43 expression in U251 cells and supports the hypothesis that Cx43 is involved in their formation and growth.

Cx43 facilitates formation and growth of invadopodia by interacting with key proteins

To decipher molecular mechanisms linking Cx43 to invadopodia formation and function, we estimated whether members of the Cx43 interactome present in invadopodia were affected by

decreasing Cx43 expression. Indeed, in shRNA clones, we no longer observed an increase in expression of P-FAK, TKS5 and Src in the gelatin conditions compared to plastic, contrary to what was observed in mock cells (Fig. 6A and B). Similarly, no interaction difference was observed between Cx43 and Src or cortactin whatever the culture conditions (Fig. 6C).

Moreover, we observed that the expression of key proteins in the formation of invadopodia increases after decreasing expression of Cx43 for sh-RNA 2 clone, in plastic culture (P-FAK, TKS5 and Src, Fig 6 A and B; for FAK, P-Src, Cortactin and MT1-MMP, Fig. S5A). No change was observed for Cx43/MT1-MMP interaction (Fig. S5C).

So when Cx43 expression is decreased (shRNA clones), its interaction level with Src and cortactin was similar whatever the culture conditions (Fig. 6C). This suggests that this interaction (Cx43/Src or Cx43/cortactin) is independent of gelatin stimulation, meaning that, instead of being transient, this interaction becomes permanent in shRNA cells contrary to mock cells. This transient interaction between Cx43 and Src or cortactin appears to be crucial for invadopodia formation.

Furthermore, by measuring the levels of Src phosphorylated at Tyr-416 (Y416 c-Src) compared to total Src (estimation of Src kinase activity), no difference was observed in mock cells whatever the culture conditions or shRNA cells (Fig. S5B). Similarly, P-cortactin/total cortactin or P-FAK/total FAK were not changed in mock or shRNA cells (data not shown). Therefore, Src or cortactin activity is not responsible for the difference in invadopodia formation observed when Cx43 expression is decreased.

Evidence that Cx43 hemichannels inhibit formation of invadopodia

Since Cx43 may exhibit hemichannel activity when not involved in the formation of gap junctions, we studied hemichannel activity in Cx43 shRNA clones by the functional uptake of

the fluorescent tracer Lucifer Yellow (LY) (Fig. 7A). Unexpectedly, greater hemichannel activity was observed when total Cx43 levels were reduced as compared to mock cells (Fig. 7A). Dye uptake was inhibited by flufenamic acid (FFA), an inhibitor of Cx43 hemichannel and channel function, suggesting that LY was entering the cells via Cx43 hemichannels. To minimize the possibility that dye uptake in Cx43 knockdown cells was mediated by elevated levels of Panx1 channels, we excluded this hypothesis by observing that Panx1 levels were the same in shRNA clones and mock cells (Fig. 7B). The higher LY uptake is probably the consequence of an increased Cx43 hemichannel activity since we also observed higher ATP release in shRNA clones compared to mock cells (data not shown). Taken together, these results indeed suggest that hemichannels activity is inversely correlated with the expression of Cx43.

Co-immunoprécipitation showed an increased Cx43/src interaction when Cx43 expression is decreased (Fig. 6C). This suggests that increased in hemichannel activity and in Cx43/src interaction are correlated in shRNA cells.

In further assessments, we examined whether Cx43 hemichannel activity is present in invadopodia. To accomplish this, mock and shRNA cells were seeded on porous filters (1 µm diameter) coated with gelatin that is impermeable to LY. Therefore, LY was added underneath the filter, allowing the fluorescent molecule to be in direct contact with the extremity of invadopodia crossing gelatin and the filter. In such conditions, LY uptake occurred more readily in shRNA clones compared to mock cells (Fig. 7C). Moreover, dye uptake was inhibited by FFA suggesting that Cx43 hemichannels were responsible for LY uptake (Fig. 7C). These findings show that Cx43 exhibits higher hemichannel activity in Cx43 depleted cells that could prevent efficient formation and growth of invadopodia. Moreover, since no difference in hemichannel activity was seen between mock cells and shRNA 2 cells, it was probably due to the shorter length of invadopodia in shRNA2 cells at the times tested. Finally, the incubation

of cells with hemichannel inhibition FFA resulted in a similar number and length of invadopodia in shRNA clones and mock cells (Fig. 7D).

Discussion

In cancer, invadopodia are cellular protrusions allowing ECM degradation that facilitates local invasion by tumor cells. Previous studies showed that invadopodia are made of protein networks interacting with actin filaments. The stages of invadopodia formation are highly regulated and require a series of protein phosphorylation and protein-protein interaction events [24, 36]. Understanding how these structures are formed is of interest in therapeutics if one is to design drugs to circumvent the invasion capacity and tumor recurrence. To investigate the role of Cx43 in these processes, we studied invadopodia formation and function in invasive human glioblastoma cells. In previous work, using a Cx43 knockdown approach, we observed that the invasive capacity of these cells was positively correlated with Cx43 expression level [32]. This correlation was in agreement with studies showing Cx43 involvement in glioma cell migration and invasion [2-4].

Here, we used immunolabeling and imaging approaches to demonstrate that glioblastoma cells digest gelatin at sites of invadopodia (ventral protrusions containing actin, cortactin, MT1-MMP and TKS5) and at FAs at the leading edge of the cells (containing actin, cortactin and P-FAK) (Fig. 1 and S1). By such approaches, for the first time, we show that Cx43 is localized in invadopodia at each stage of their growth (Fig. 2, S2 and 3). Moreover, we also reveal that diminished level of Cx43 is correlated with a decreased in invadopodia formation and function. Indeed, the reduction of Cx43 expression induces a diminished number of lengths II and III invadopodia and also a decreased MMP2 proteolytic activity (Fig. 5 and S4).

Our studies support a role for Cx43 at the site of invadopodia formation through a possible complex protein network (Fig. 4). By co-immunoprecipitation, we found that Cx43

dynamically interacts with Src and cortactin (Fig. 4D). However, no interactions between Cx43 and P-Src, P-cortactin or TKS5 were detected. When the cells are grown on gelatin (ECM mimetic stimulation), Src, P-FAK and TKS5 expressions (Fig. 4A, B) and Cx43 interaction with specific partners (cortactin, Src; Fig.4 D) were facilitated. However, when Cx43 was knocked down, this phenomenon was not observed (Fig. 6). ECM is known to act on integrin protein activation or on cell surface protein-integrin complexes. This may suggest that in mock cells, the presence of gelatin directs cells toward adhesion through the stimulation of FAs, as shown by the increased level of P-FAK. It also increased invasion capacities by inducing the formation of invadopodia, except in Cx43 knock down cells.

During invasion, FAs are first stimulated to permit invadopodia formation. In FAs, ligation of integrins to ECM provokes FAK autophosphorylation permitting its interaction with Src [24]. The subsequent phosphorylation of FAK by Src (P-FAK) activates Src/P-FAK complex which phosphorylates, in turn, paxillin and p130CAS [37, 38]. These events permit FA assembly/disassembly that is essential for cell migration [39]. Our results show that Cx43 is not colocalised with P-FAK and FAK (Fig. 2) and is absent in FAs, even though others have shown Cx43 to interact indirectly with integrin-α5, *via* protein 14-3-3Θ [40], which localized in invadopodia [41] (Fig. 8). Moreover, it is known that Cx43 associates with other key elements of invadopodia which include cortactin, cofilin 1, caveolin-1, actin filaments or tubulin [30, 31]. In invasive cells, in which invadopodia occur, a switch allows Src to be released from FAs to bind other substrates (cortactin, TKS5, caveolin-1, Cx43) necessary for invadopodia formation [28]. When Src is released from FA, rapid and transient interactions occur between Src and Cx43 [42] leading to Cx43 phosphorylation on Y247 (Fig. 8). Once Cx43 becomes phosphorylated, this may regulate its interaction with other binding partners such as ZO-1 and tubulin [43, 44]. After Src autophosphorylation, this interaction is broken, allowing phosphorylation of cortactin favored by its interaction with Cx43 [30]. Once phosphorylated,

the Src/cortactin complex does not seem to be linked with Cx43 anymore, permitting its proximity with a TKS5 complex (containing N-WASP, Nck1, Arp2/3 complex necessary for actin polymerization) (Fig. 8). Therefore, Cx43 may have an effect on the rate of invadopodia formation by exerting a role in interacting proteins that enhances proximity between FA and invadopodia. In other words, Cx43 could facilitate interaction between Src and cortactin-cofilin complex. Indeed, when Cx43 expression is inhibited, cells no longer have the ability to activate all processes (FA and invadopodia formations). In such conditions, lower release and phosphorylation of partners involved in invadopodia formation, and thus decreased actin polymerization, are observed (Fig. 8).

Surprisingly, we found that densely plated glioblastoma cells formed numerous gap junctions but less invadopodia (Fig. S3). At a first glance, this appears contradictory with previous observations showing that gap junctional intercellular communication (GJIC) increases glioma cell invasion. However, this was observed in the case of heterocellular GJIC between glioma and stroma cells [32, 4] and homocellular GJIC between glioma cells favoring collective cell migration [45]. Both of these cases are different from single cell migration/invasion examined in our current study. Indeed, Cx43 has minimal opportunity to form GJIC in sparse cultures and is then more available to potentially participate in invadopodia formation.

Intriguingly, decreased levels of Cx43 in glioblastoma cells correlate with increased cellular levels of Cx43 hemichannel activity, even within invadopodia (Fig. 7). So far, no study showed that reducing Cx43 expression increases their hemichannel activity. But new data have highlighted the role the Cx43 Ct domain in the regulation of Cx43 hemichannel activity. Indeed, the recruitment of Src on this Ct domain leads to an increased activity of Cx43 hemichannels. Moreover, the use of negative regulators of Src causes inhibition of the Cx43 hemichannel [46, 47]. In our results, we observed a significant higher interaction between Cx43 and Src in shRNA

cells compared to mock cells (Fig. 6C). This Cx43/Src interaction could therefore explain the increased hemichannel activity in those cells.

In addition, hemichannel activity seems to have a negative effect on invadopodia formation. Indeed, its inhibition (FFA) induced a number of invadopodia similar to that observed in mock cells (Fig. 7D). At the invadopodia level, the function of Na^+/H^+ exchanger, NHE1, has been shown to be important for invadopodia formation and function, mostly in breast cancer cells [36, 48, 49]. Moreover, it was shown that NHE1 protein interacts with Cx43 [50]. NHE1 allows output of H^+ ions resulting in acidification of extracellular microenvironment which favors MMPs activation. In parallel, in those conditions, the cytosol becomes alkaline inducing cortactin and cofilin separation that is essential for actin polymerization and invadopodia formation [51]. After reducing Cx43 expression, we observed an increased hemichannel activity associated with decreased MMP2 activity (Fig. S4) and invadopodia formation (Fig. 7D). Therefore, it would be possible that the opening of Cx43 hemichannels occurring in Cx43 knockdown cells would prevent both activation of MMP-2 in ECM and invadopodia formation by permitting re-entry of H^+ in the cytosol (Fig. 8).

Our results show for the first time that a gap junction protein, Cx43, is localized in invadopodia of glioblastoma cells and is involved in their formation and function. Together with previous data, Cx43 seems to play an important role in invasion process of glioblastoma cells by exerting two different functions. As an interacting protein, Cx43 would allow rapid interaction between two major partners involved in invadopodia formation, Src and cortactin. Moreover, Cx43 hemichannel activity seems to have an inhibitory role in invadopodia elongation and function by its action on actin polymerization, supported by cortactin-cofilin

complex, on one hand, and by its indirect action on MMP2 activity present in invadopodia, on the other hand.

In conclusion, understanding the involvement of Cx43 in invadopodia formation can help developing therapies to prevent cancer cell invasion. As a possibility, truncation of the Cx43 Ct domain could prevent its interacting role necessary for invadopodia formation without perturbing its ability to establish GJIC.

Acknowledgements

The authors thank Dr E. Hervouet for his gift of the shRNA clones. The technical support of G. Epistolin and I. Courtin was appreciated. We are grateful to the imaging platform ImageUP of the University of Poitiers and Dr A. Cantereau for her helps.

Author contributions

AC performed experiments, analysed the data, and wrote the manuscript. ACB contributed to technical support. DL contributed to Invadopodia specific Dye Uptake Assay design and helped writing the manuscript. MM coordinated the project and wrote the manuscript. ND conceived the hypothesis, designed the study, coordinated the study, interpreted data and wrote the manuscript.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No conflict of interest

Grant Support

This work was supported by funds from the “Ligue Nationale contre le Cancer” (Comités de la Vienne, Deux-Sèvres and Charente-Maritime) and “Cancéropole Grand Ouest”.

A. Chépied was recipient of a doctoral fellowship from the “Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche”.

References

[1] Kleihues P, Barnoltz-Sloan J, Ohgaki H. Tumours of the nervous system. Pp 511-521 in World Cancer Report, Stewart BW and Wild CP, eds. International Agency for Research on Cancer, WHO Press, Lyon, 2014.

[2] Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H, Haubrich S, Willecke K, Goldman SA *et al.* Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. J. Neurosci. 2002; 22: 4302–4311.

[3] Zhang W, Nwagwu C, Le DM, Yong VW, Song H, Couldwell,WT. Increased invasive capacity of connexin43- overexpressing malignant glioma cells. J. Neurosurg. 2003; 99: 1039–1046.

[4] Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, de Boüard S, Palfi S, Venance L, Tardy M, Peschanski M. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. BMC Cell Biol. 2005; 6: 7.

[5] Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature. 2007; 448: 901–907.

[6] Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. J. Cell Biol. 1998; 143: 1725-34.

[7] Lo CW, Waldo KL, Kirby ML. Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells. Trends Cardiovasc. Med. 1999; 9: 63-9.

[8] Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. Development. 2006; 133: 3629-39.

[9] Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CC. Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1991; 88: 1883-7.

[10] Naus CC, Elisevich K, Zhu D, Belliveau DJ, Del Maestro RF. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. Cancer Res. 1992; 52: 4208-13.

[11] Bond SL, Bechberger JF, Khoo NK, Naus CC. Transfection of C6 glioma cells with connexin32: the effects of expression of a nonendogenous gap junction protein. Cell Growth Differ. 1994; 5: 179-86.

[12] Sin WC, Crespin S, Mesnil M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. Biochim. Biophys. Acta. 2012; 1818: 2058-67.

[13] Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. Glia. 2007; 55: 1554-64.

[14] Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. J. Neurosci. 2009; 29: 2009-21.

[15] Crespin S, Bechberger J, Mesnil M, Naus CC, Sin WC. The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. J. Cell Biochem. 2010; 110: 589-97.

[16] Matsuuchi L, Naus CC. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. Biochim. Biophys. Acta. 2013; 1828: 94-108.

[17] Belliveau DJ, Bani-Yaghoub M, McGirr B, Naus CC, Rushlow WJ. Enhanced neurite outgrowth in PC12 cells mediated by connexin hemichannels and ATP. J. Biol. Chem. 2006; 281: 20920-31.

[18] Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. Curr. Opin. Cell Biol. 1999; 11: 274-286.

[19] Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. Trends Cell Biol. 2004; 14: 241-249.

[20] Buccione R, Orth JD, McNiven MA. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and cicular dorsal ruffles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 647-657.

[21] Buccione R, Caldieri G, Ayala I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for focal degradation of the extracellular matrix. Cancer Metastasis Rev. 2009; 28: 137-149.

[22] Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. Eur. J. Cell Biol. 2006; 85: 213-218.

[23] Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extra-cellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 2007; 17: 107-117.

[24] Murphy DA, Courtneige SA. The “ins” qand ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature rev. Mol. cell biol. 2011; 12: 413-26.

[25] Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signaling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nat. Cell Biol. 2004; 6: 154-161.

[26] Tilghman RW, Slack-Davis JK, Sergina N, Martin KH, Iwanicki M, Hershey ED, Beggs HE, Reichardt LF, Parsons JT. Focal adhesion kinase is required for the special organization of the leading edge in migrating cells. J. Cell Sci. 2005; 118: 2613-2623.

[27] Schaller MD, Hildebrand JD, Parsons JT. Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. Mol. Biol. Cell. 1999; 10: 3489-3505.

[28] Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. J. Cell Biol. 2009; 185: 357-370.

[29] Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. Cancer Res. 2006; 66: 3034-3043.

[30] Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D. Diversity in protein–protein interactions of connexins: emerging roles. Biochim. Biophys. Acta. 2004; 1662: 22–41.

[31] Olk S, Turchinovich A, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, Zoidl G, Dermietzel R. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. Glia. 2010; 58: 494-505.

[32] Strale PO, Clarhaut J, Lamiche C, Cronier L, Mesnil M, Defamie N. Down-regulation of connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion. Mol. Carcinogenesis. 2012; 51: 845-60.

[33] Ayala I,Baldassarre M, Giacchetti G, Caldieri G, Tetè S, Luini A, Buccione R. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. J. Cell Sci. 2008; 121:369-78.

[34] Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc. Natl. Acad. Sc.i U S A. 2002; 99:495-500.

[35] Beaty BT, Wang Y, Bravo-Cordero JJ, Sharma VP, Miskolci V, Hodgson L, Condeelis J. Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. J. Cell Biol. 2014; 205: 737-751.

[36] Cea LA, Cisterna BA, Puebla C, Frank M, Figueroa XF, Cardozo C, Willecke K, Latorre R, Sáez JC. De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013; 110:16229-34.

[37] Wang Y, Cao H, Chen J, McNiven MA. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. Mol. Biol. Cell. 2011; 22:1529-38.

[38] Yu HG, Nam JO, Miller NL, Tanjoni I, Walsh C, Shi L, Kim L, Chen XL, Tomar A, Lim ST, Schlaepfer DD. p190RhoGEF (Rgnef) promotes colon carcinoma tumor progression via interaction with focal adhesion kinase. Cancer Res. 2011; 71: 360-70.

[39] Karginov AV, Tsygankov D, Berginski M, Chu PH, Trudeau ED, Yi JJ, Gomez S, Elston TC, Hahn KM. Dissecting motility signaling through activation of specific Src-effector complexes. Nat. Chem. Biol. 2014; 10: 286-90.

[40] Batra N, Riquelme MA, Burra S, Jiang JX. 14-3-3θ facilitates plasma membrane delivery and function of mechanosensitive connexin 43 hemichannels. J. Cell Sci. 2014; 127: 137-46.

[41] Mueller SC, Ghersi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M, Nakahara H, Yeh Y, Chen WT. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. J. Biol. Chem. 1999; 274: 24947-52.

[42] Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. J. Biol. Chem. 2001; 276: 8544-9.

[43] Tabernero A, Gangoso E, Jaraiz-rodriguez M, Medina JM. The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas : a molecular puzzle. Neuroscience. 2016; 323:183-94

[44] Sorgen PL, Duffy HS, Sahoo P, Coombs W, Delmar M, Spray DC. Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. J. Biol. Chem. 2004; 279: 54695–54701.

[45] Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. Oncotarget. 2015; 6:11447-64.

[46] Iyyathurai J, Wang N, D'hondt C, Jiang JX, Leybaert L, Bultynck G. The SH3-binding domain of Cx43 participates in loop/tail interactions critical for Cx43-hemichannel activity. Cell Mol Life Sci. 2018 : 75: 2059-2073.

[47] Gangoso E, Talaverón R, Jaraíz-Rodríguez M, Domínguez-Prieto M, Ezan P, Koulakoff A, Medina JM, Giaume C, Tabernero A. A c-Src Inhibitor Peptide Based on Connexin43 Exerts Neuroprotective Effects through the Inhibition of Glial Hemichannel Activity. Front Mol Neurosci. 2017; 10: 418.

[48] Busco G1, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E, Mancini MT, Dell'Aquila ME, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. FASEB J. 2010; 24: 3903-15.

[49] Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S, Reshkin SJ, Gore J, Roger S. NaV1.5 Na^+ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. J Cell Sci. 2013; 126: 4835-42.

[50] Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A. Subcellular localization of the Na+/H+ exchanger NHE1 in rat myocardium. Am. J. Physiol. 1999; 276: H709-17.

[51] Frantz C, Barreiro G, Dominguez L, Chen X, Eddy R, Condeelis J, Kelly MJ, Jacobson MP, Barber DL. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. J. Cell Bio. 2008; 183: 865-879.

Figure legends

Figure 1: U251 cells form invadopodia. Cells were cultured on coverslips coated with FG-gelatin (1.5 x 10^4 cells/mL) and observed by confocal microscopy in the *xy* dimension. After 5

hours, localization of (**A**) F-actin (Red) and cortactin (Blue) or (**B**) cortactin (Red) and P-FAK (Blue) was determined by indirect immunofluorescence or using TRITC-phalloidin. Invadopodia formation (*) and focal adhesions (§) were observed. Each left panel is *xy* images, right top panel is *xz* images and right bottom panel is a *xz* enlargement of the regions of interest (N=10). The yellow line in the *xy* images is the axis shown in the *xz* dimension (Scale bar: 20µm on *xy* dimension and 2µm on *xz* dimension).

Figure 2: U251 cells form invadopodia containing Cx43. Cells were cultured on coverslips coated with FG-gelatin (1.5 x 10^4 cells/mL) and observed by confocal microscopy in the *xy* dimension. After 5 hours, localization of (**A**) F-actin (Red) and Cx43 (Blue) or (**B**) Cx43 (Red) and P-FAK (Blue) was determined by indirect immunofluorescence or using TRITC-Phalloidin. Invadopodia formation (*) and focal adhesions (§) were observed. Each left panel is *xy* images, right top panel is *xz* images and right bottom panel is an *xz* enlargement of the regions of interest (N=10). The yellow line in the *xy* images is the axis shown in the *xz* images (Scale bar: 20µm on *xy* dimension and 2µm on *xz* dimension).

Figure 3: Cx43 involvement in invadopodia formation and maturation. (**A**, **B**) Cells were cultured (1x10^4 cells/mL) on inserts (1µm porosity) coated with FG-gelatin allowing invadopodia formation and maturation. Filters from inserts were observed by confocal microscopy in *xz* dimension at 4h (left panel), 6h (middle panel) or 8h (right panel) after seeding cells. (**A**) F-actin (Red) and cortactin (Blue) or (**B**) F-actin (Red) and Cx43 (Blue) were observed by indirect immunofluorescence or using TRITC-Phalloidin. Three stages of invadopodia formation and maturation were determined according to invadopodia length and time of culture: Initiation Stage (SI) at 4h, Assembly Stage (SII) at 6h, and Elongation/Maturation Stage (SIII) at 8h (N=10) (Scale bar: 2µm). (**C**) Schematic

representation of insert experiment with the three stages of invadopodia formation and maturation on left panel. Right panel represents the observed invadopodia length (µm) according to the stages of invadopodia formation and maturation (SI (N=40): 2.24 ± 0.06µm; SII (N=40): 4.69 ± 0.2µm and SIII (N=15): 12.69 ± 0.56µm). ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM.

Figure 4: Protein (Cx43, FAK, P-FAK, Src, P-Src, cortactin, P-cortactin, TKS5 and MT1-MMP) expressions and interactions in correlation with Cx43 expression. (**A**) Densitometric analysis of Cx43 (left), FAK (middle) and P-FAK (right) expression levels after normalization by GAPDH expression. (**B**) Densitometric analysis of Src (left), P-Src (middle) and TKS5 (right) protein expression level after normalization to GAPDH levels according to Cx43 expression level (N=5). **(C)** Densitometric analysis of cortactin (left), P-cortactin (middle) and MT-MMP (right) protein expression levels after normalization by GAPDH expression (N=4). **(D)** Ratio of immunoprecipitation of Cx43 (left) from U251 cells and immunoblotting of Src (N=3), immunoblotting of cortactin (N=5) or immunoblotting of MT1-MMP (N=5). Red bar highlights differences due to gelatin culture condition and black bar highlights differences due to Cx43 expression diminution. Green bar highlights differences due to PP2 exposition. *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM (see Table).

Figure 5: Invadopodia formation and maturation depend on Cx43 expression level. (**A**) U251 mock cells (top) or shRNA 1 (middle) and 2 (bottom) cells were observed. ShRNA 1 and 2 cells exhibit less Cx43 mRNA and Cx43 protein compared to mock cells[30] (mRNA: 65.4 ± 4.8% and 42.8 ± 4.5%, respectively; protein: 39.1 ± 3.0% and 24.7 ± 1.9%, respectively). Cells were cultured on coverslips coated with FG-gelatin (1.5 x 10^4 cells/mL) and observed by confocal microscopy in *xy* dimension. (**A**) After 5 hours, localization of Cx43 (Red) and

cortactin (Blue) was determined by indirect immunofluorescence on coverslips in the three U251 clones. (N=10) (Scale bar: 20 µm). (**B**) Schematic representation of the experiment that was described in top panel. Three different levels of observation were determined (*xy a* slice corresponds to cell body; *xy b* slice was just below insert and corresponds to assembly stage of invadopodia formation; *xy c* slice was 4.5µm underneath the insert and corresponds to elongation/maturation stage of invadopodia formation). Bottom panel presents confocal microscopy of the three U251 clones cultured on inserts coated with FG-gelatin. Cortactin (Blue) was detected by indirect immunofluorescence. Cells were observed in the *xz* dimension (top) or *xy a, b* or *c* dimensions (bottom), (N=10), (Scale bar: 20µm on *xy* dimension and 2µm on *xz* dimension). (**C**) Percentage of cells presenting gelatin degradation due to the presence of invadopodia was determined according to Cx43 expression level in U251 mock cells and shRNA clones. (**D**) Total number of invadopodia per cell was determined according to Cx43 expression level. (**E**) Number of long and medium invadopodia per cell was determined according to Cx43 expression level. Medium invadopodia correspond to Assembly stage of invadopodia formation (Stage II, *xy b* slice) and long invadopodia correspond to Elongation/Maturation stage of invadopodia formation (Stage III, *xy c* slice). *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM (see Table).

Figure 6: Protein (Cx43, P-FAK, TKS5 and Src) expressions and interactions in correlation with Cx43 expression. (**A**) Densitometric analysis of Cx43 (left), P-FAK (middle) and TKS5 (right) expression levels after normalization to GAPDH levels. (**B**) Densitometric analysis of Src protein expression level after normalization to GAPDH levels according to Cx43 expression level (N=5). **(C)** Ratio of immunoprecipitation of Cx43 from U251 cells and immunoblotting of Src (middle) and cortactin (right) (N=3). Red bar highlights differences due to gelatin culture condition and black bar highlights differences due to Cx43 expression

diminution. Green bar highlights differences due to PP2 exposition. *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM (see Table).

Figure 7: Correlation between increased hemichannel activity and decreased Cx43 expression. U251 cells were cultured on coverslips (**A**) or on inserts (**C**) coated with gelatin for 8 hours. Lucifer Yellow (0.5 mg/mL) was added on coverslips or below the inserts permitting its uptake in cells via Cx43 hemichannels. For inserts, only Cx43 hemichannels in invadopodia were accessible to Lucifer Yellow. To determine the specific involvement of Cx43 hemichannel, a Cx inhibitor, flufenamic Acid (FFA; 100 µM), was used. (**A**) Top Panel: Representative records of Lucifer yellow uptake of U251 cells cultured on coverslips coated with gelatin (N=5) (Scale bar: 50µm). Bottom panel: Quantification of Lucifer Yellow uptake depending on Cx43 expression level. (**B**) Densitometric analysis of Pannexin 1 (Panx1) expression levels after normalization by GAPDH expression. Panx1 expression is not significantly modulated in shRNA clones compared to mock cells on plastic (control, red), gelatin (0.2%, green) or gelatin+PP2 (5µM, blue) conditions (N=3). The increase of Lucifer Yellow uptake which is observed is therefore due to Cx43 decrease and not to Panx1. (**C**) Top Panel: Representative record of Lucifer yellow uptake of U251 cells cultured on inserts coated with gelatin (N=5) (Scale bar: 50µm). Bottom panel: Quantification of Lucifer Yellow uptake depending on Cx43 expression level. (**D**) Medium (red), long (green) and total number of invadopodia (blue) per cell was determined according to Cx43 expression level and in presence or not of FFA. Medium invadopodia correspond to the Assembly stage of invadopodia formation (length II) and long invadopodia correspond to Elongation/Maturation stage of invadopodia formation (Length III). *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM (see Table).

Figure 8: Putative role of Cx43 in invadopodia formation. Each stage of invadopodia formation is described in two parts: the cancer cell with localization of invadopodia structure (left) and a description of protein interactions occurring during the invadopodia formation and growth (right). See Discussion.

Legends of the Supplementary figures

Figure S1: U251 cells are able to form invadopodia. Cells were cultured on coverslips with FG-gelatin (1.5 x 10^4 cells/mL) and observed by confocal microscopy in *xy* dimension. After 5 hours, localization of (**A**) MT1-MMP (Red) and cortactin (Blue) or (**B**) cortactin (Red) and TKS5 (Blue) was determined by indirect immunofluorescence. Invadopodia formation (*) is observed. Left panel is *xy* images, right top panel is *xz* images and right bottom panel is *xz* enlargement of regions of interest (N=10). The yellow line in *xy* images is the axis of *xz* dimension. (Scale bars: 20µm on *xy* plan and 2µm on *xz* plan).

Figure S2: U251 cells form invadopodia containing Cx43. Cells were cultured on coverslips coated with FG-gelatin (1.5 x 10^4 cells/mL) and observed by confocal microscopy in *xy* dimension. After 5 hours, localization of (**A**) Cx43 (Red) and cortactin (Blue) or (**B**) Cx43 (Red) and TKS5 (Blue) was determined by indirect immunofluorescence. Invadopodia formation (*) and focal adhesions (§) were observed. Each left panel is *xy* images, right top panel is *xz* images and right bottom panel is *xz* enlargement of regions of interest (N=10). The yellow line in *xy* images is the axis of *xz* dimension. (Scale bar: 20µm on xy plan and 2µm on xz plan).

Figure S3: Invadopodia formation and maturation are reduced when U251 mock cells are cultured at high density. (**A**,**B**) Confocal microscopy of U251 mock cells cultured on inserts

coated with FG-gelatin at low (top panel) or high (bottom panel) density. (**A**) Cx43 (Red), (**B**) cortactin (Blue) is detected by indirect immunofluorescence and F-actin (Red) by phalloïdin. Cells were observed in *xy* dimension (N=10) (Scale bar: 20µm). (**C**) Length II, length III and total number of invadopodia per cell was determined according to cell density culture condition. Length II invadopodia correspond to Assembly stage of invadopodia formation and length III invadopodia correspond to Elongation/Maturation stage of invadopodia formation. At low density, total number per cell of length II invadopodia is 4.63 ± 0.80; length III invadopodia, 4.13 ± 0.51 and total number of invadopodia, 14.06 ± 0.82. At high density, the total number per cell of length II invadopodia is 2.89 ± 0.56 per cell; length III invadopodia, 2.0 ± 0.37 and total number of invadopodia, 5.36 ± 1.04. *P < 0.05 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM.

Figure S4: Type 2 Matrix Metalloprotease (MMP2) decreases with Cx43 expression level. (**A**) Representative gelatin zymography gel after 72 hours of incubation. U251 mock cells (left), sh-RNA 1 (middle) or sh-RNA 2 (right) supernatant was 10-fold concentrated before electrophoresis. (**B**) Densitometric evaluation of gelatin zymography according to Cx43 expression level (N=7). Mock cells: 1.00; sh-RNA 1: 0.78 ± 0.06; sh-RNA 2: 0.66 ± 0.06. **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM.

Figure S5: Protein (Cx43, FAK, P-Src, cortactin, P-cortactin, MT1-MMP) expression and interactions in correlation with Cx43 expression. (**A**) First line: Densitometric analysis of Cx43 (left), FAK (middle) and P-Src (right) expression levels after normalization by GAPDH expression. Cx43 is significantly reduced in sh-RNA clones compared to mock cells cultivated on plastic (control, red), gelatin (0.2%, green) or gelatin + PP2 (5µM, blue) conditions (N=9). Second line: Densitometric analysis of Cortactin (left) and P-cortactin (middle) and MT1-MMP

(right) protein expression level after normalization by GAPDH expression according to Cx43 expression level (N=5). **(B)** Representation of Src activity by Src/P-Src ratio, (N=5) (**C**) Ratio of immunoprecipitation of Cx43 from U251 cells and immunoblotting of MT1-MMP (N=3). Red bar highlights differences due to gelatin culture condition and black bar highlights differences due to diminution of Cx43 expression. Representative blot are present under all densitometric analysis. *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001. Values shown as mean ± SEM (see Table).

Table: Detailed data from figures 4, 5, 6 and S5.

Figure 1:

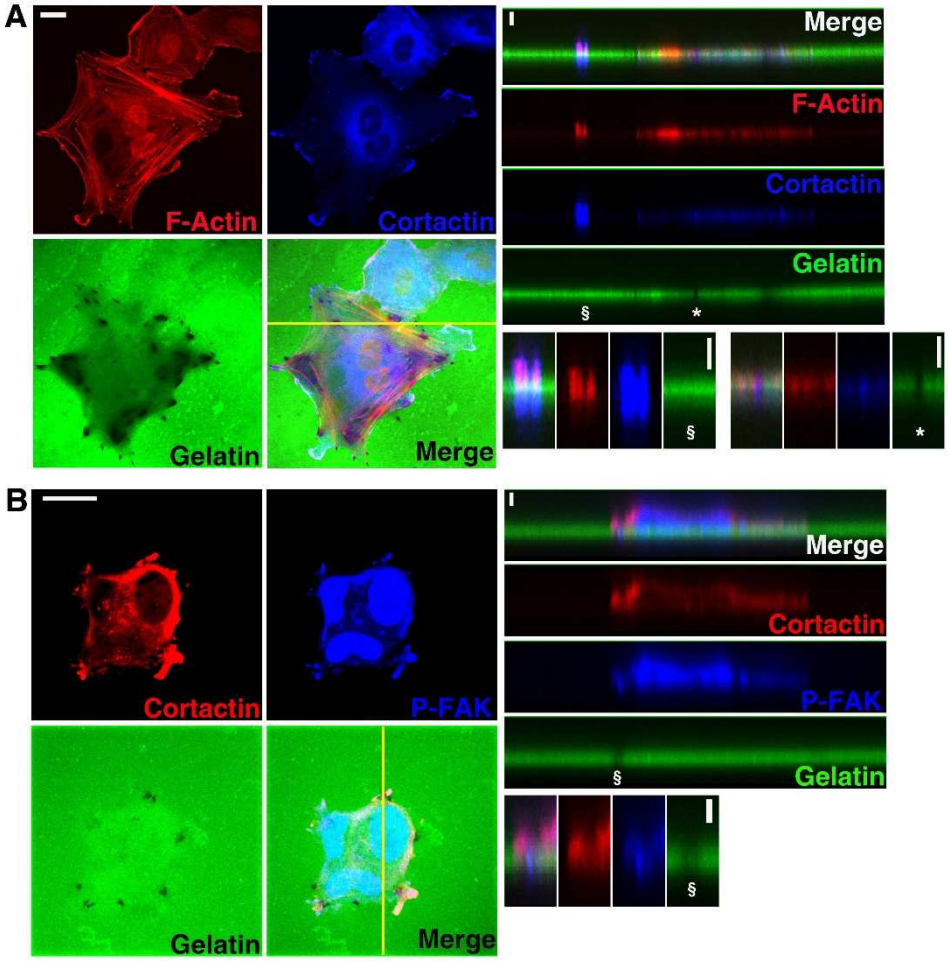

A
F-Actin
Cortactin
Merge
F-Actin
Cortactin
Gelatin
§
*
Gelatin
Merge
§
*
B
Cortactin
P-FAK
Merge
Cortactin
P-FAK
Gelatin
§
Gelatin
Merge
§

Figure 2:

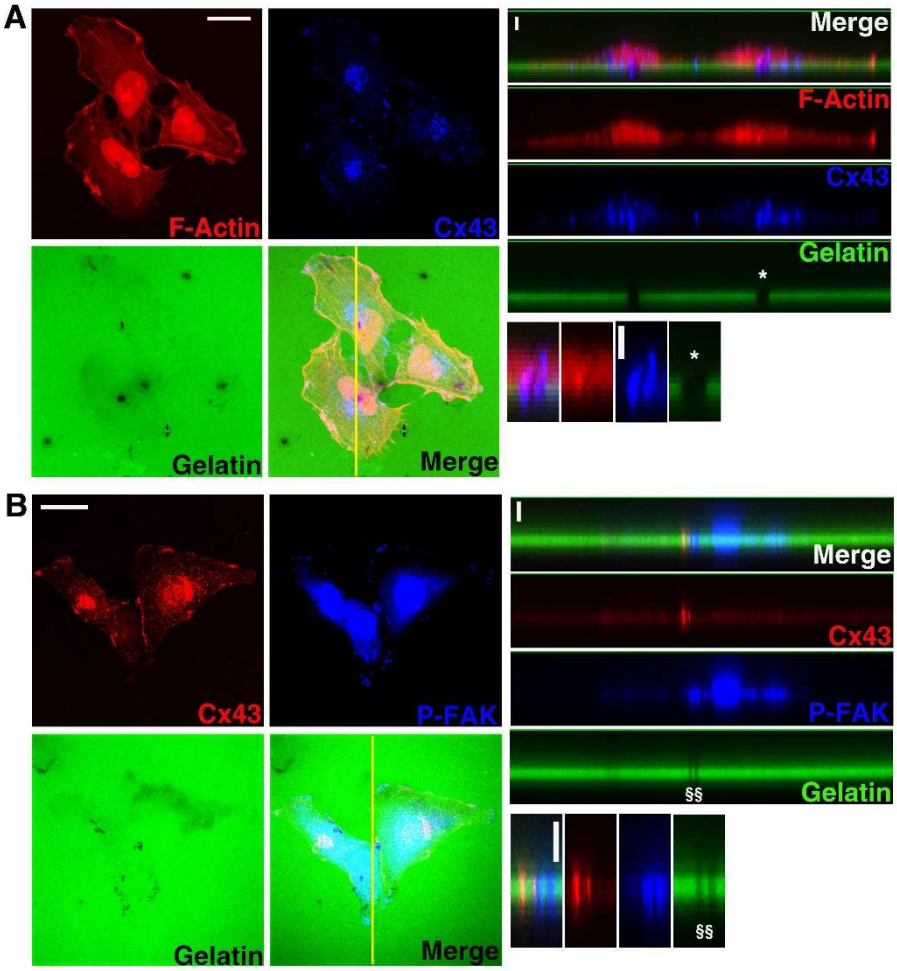

A
F-Actin
Cx43
Merge
F-Actin
Cx43
Gelatin
*
Gelatin
Merge
*
B
Cx43
P-FAK
Merge
Cx43
P-FAK
§§
Gelatin
Gelatin
Merge
§§

Figure 3:

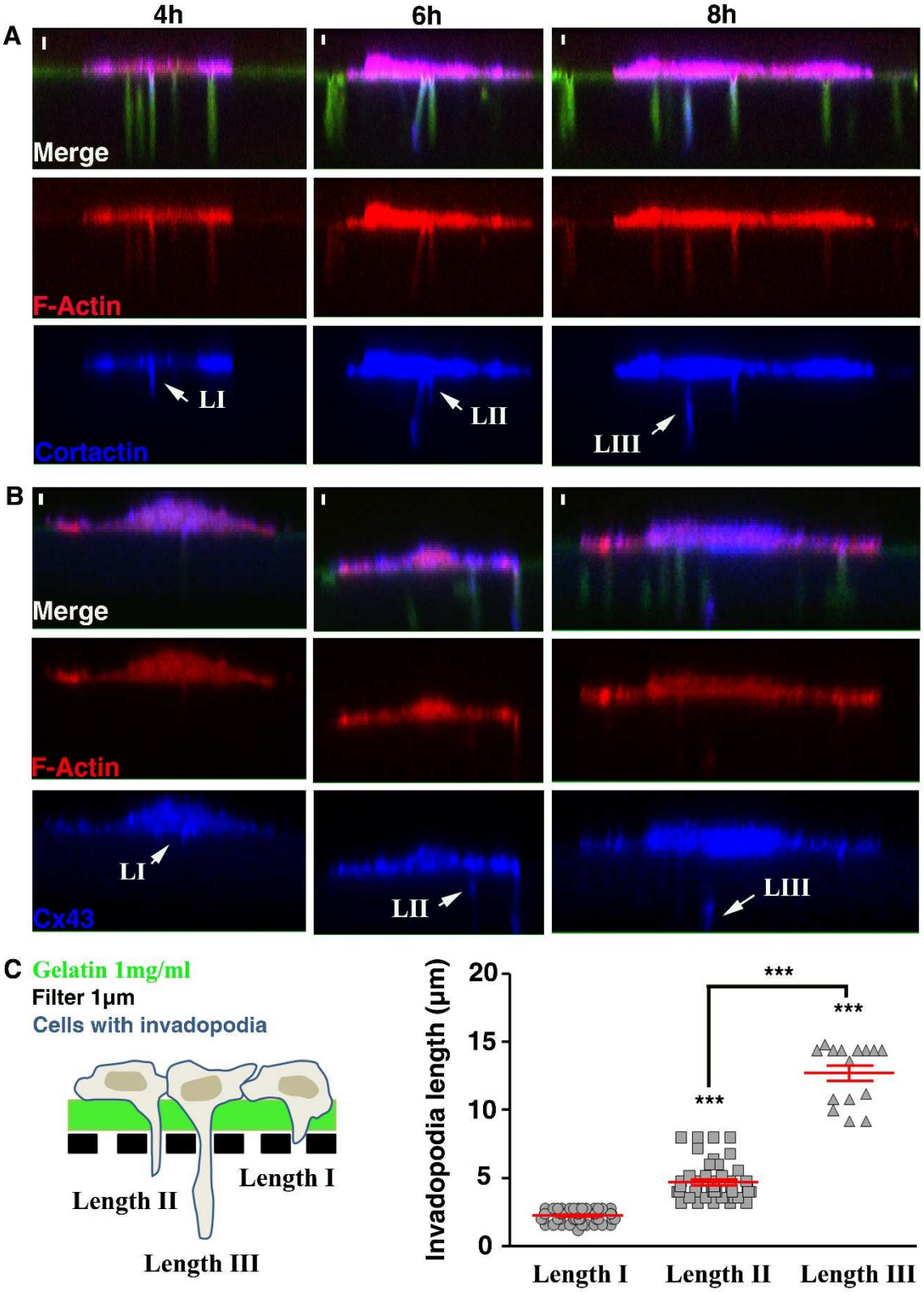

A
4h
6h
8h
Merge
F-Actin
Cortactin
LI
LII
LIII
B
Merge
F-Actin
Cx43
LI
LII
LIII
C
Gelatin 1mg/ml
Filter 1µm
Cells with invadopodia
Length I
Length II
Length III
Invadopodia length (µm)
20
15
10
5
0
***
***
***
Length I
Length II
Length III

Figure 4:

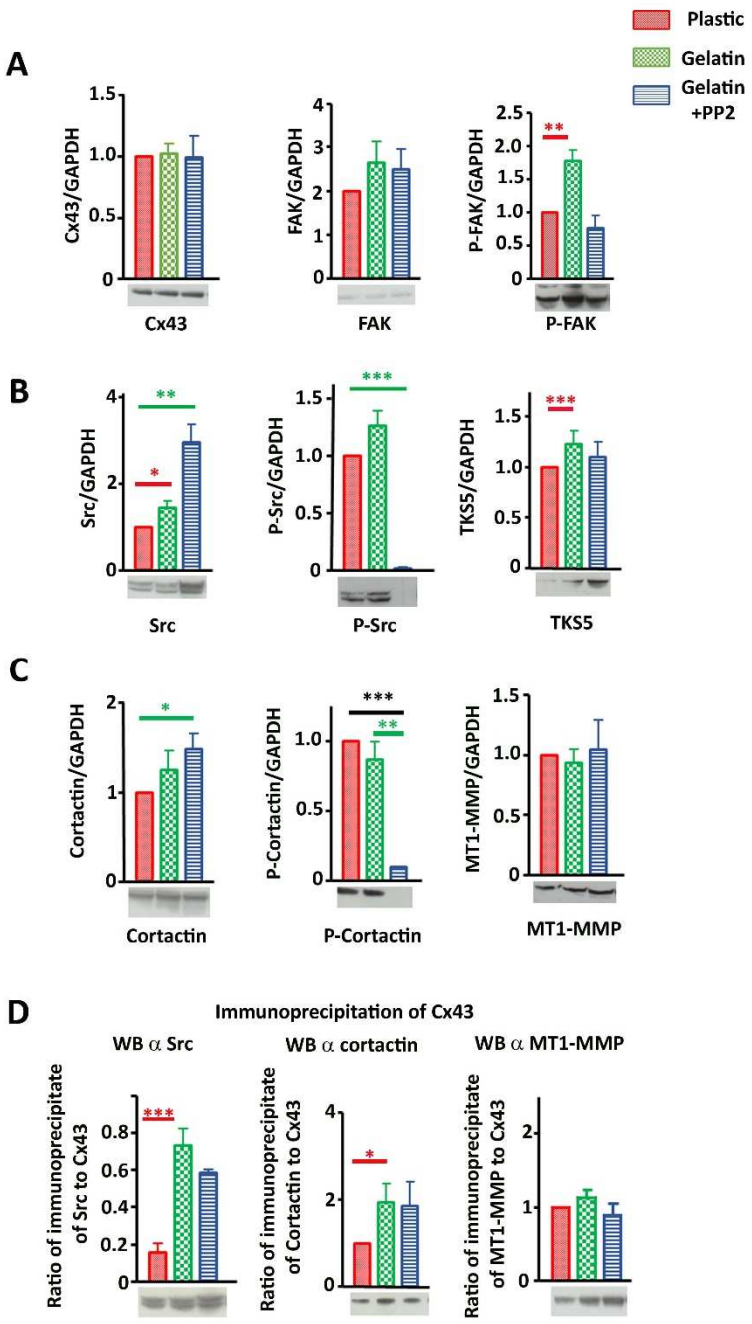

A
Plastic
Gelatin
Gelatin +PP2
Cx43/GAPDH
Cx43
FAK/GAPDH
FAK
P-FAK/GAPDH
P-FAK
B
Src/GAPDH
Src
P-Src/GAPDH
P-Src
TKS5/GAPDH
TKS5
C
Cortactin/GAPDH
Cortactin
P-Cortactin/GAPDH
P-Cortactin
MT1-MMP/GAPDH
MT1-MMP
D
Immunoprecipitation of Cx43
WB α Src
WB α cortactin
WB α MT1-MMP
Ratio of immunoprecipitate of Src to Cx43
Ratio of immunoprecipitate of Cortactin to Cx43
Ratio of immunoprecipitate of MT1-MMP to Cx43

Figure 5:

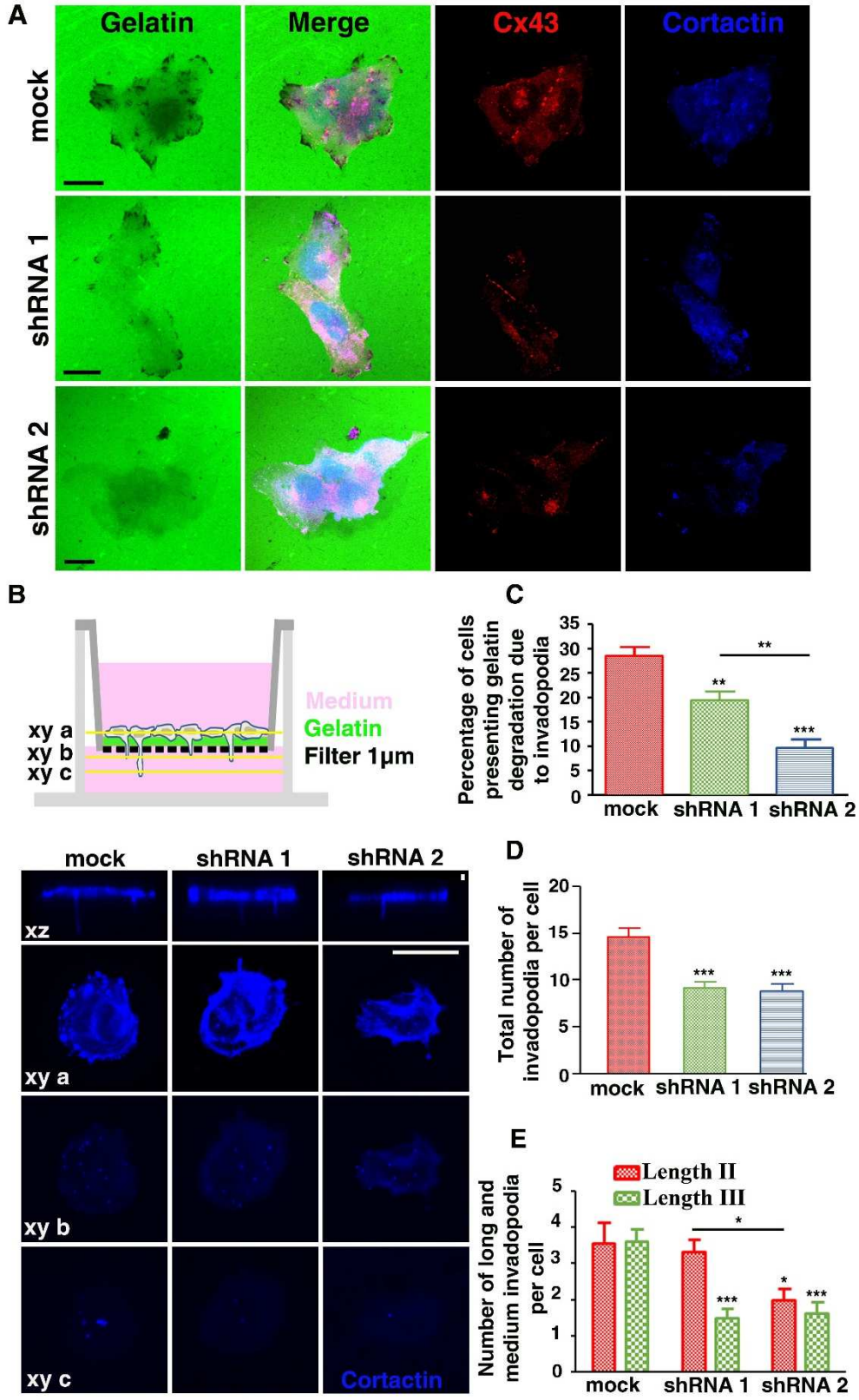

A
Gelatin
Merge
Cx43
Cortactin
mock
shRNA 1
shRNA 2
B
Medium
Gelatin
Filter 1µm
xy a
xy b
xy c
C
Percentage of cells presenting gelatin degradation due to invadopodia
mock
shRNA 1
shRNA 2
D
Total number of invadopodia per cell
mock
shRNA 1
shRNA 2
xz
xy a
xy b
xy c
Cortactin
E
Length II
Length III
Number of long and medium invadopodia per cell
mock
shRNA 1
shRNA 2

Figure 6:

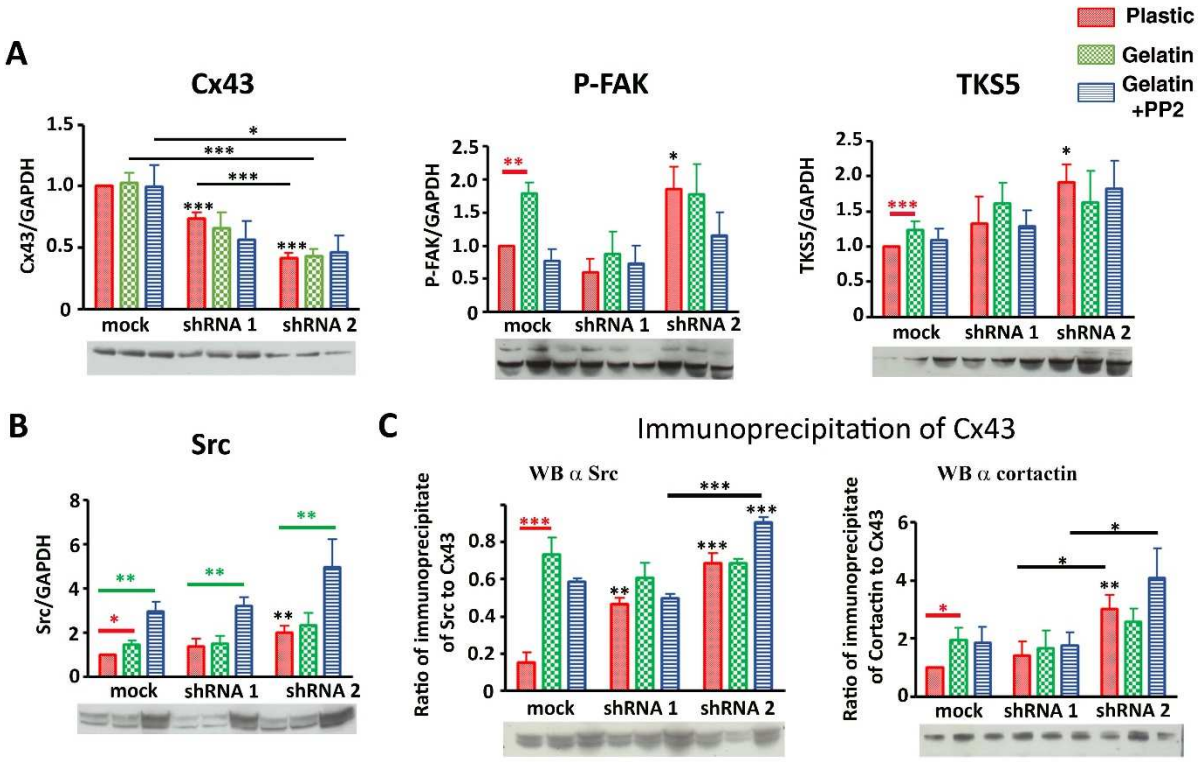

A
Cx43
P-FAK
TKS5
Plastic
Gelatin
Gelatin +PP2
Cx43/GAPDH
P-FAK/GAPDH
TKS5/GAPDH
mock
shRNA 1
shRNA 2
B
Src
Src/GAPDH
C
Immunoprecipitation of Cx43
WB α Src
WB α cortactin
Ratio of immunoprecipitate of Src to Cx43
Ratio of immunoprecipitate of Cortactin to Cx43

Figure 7:

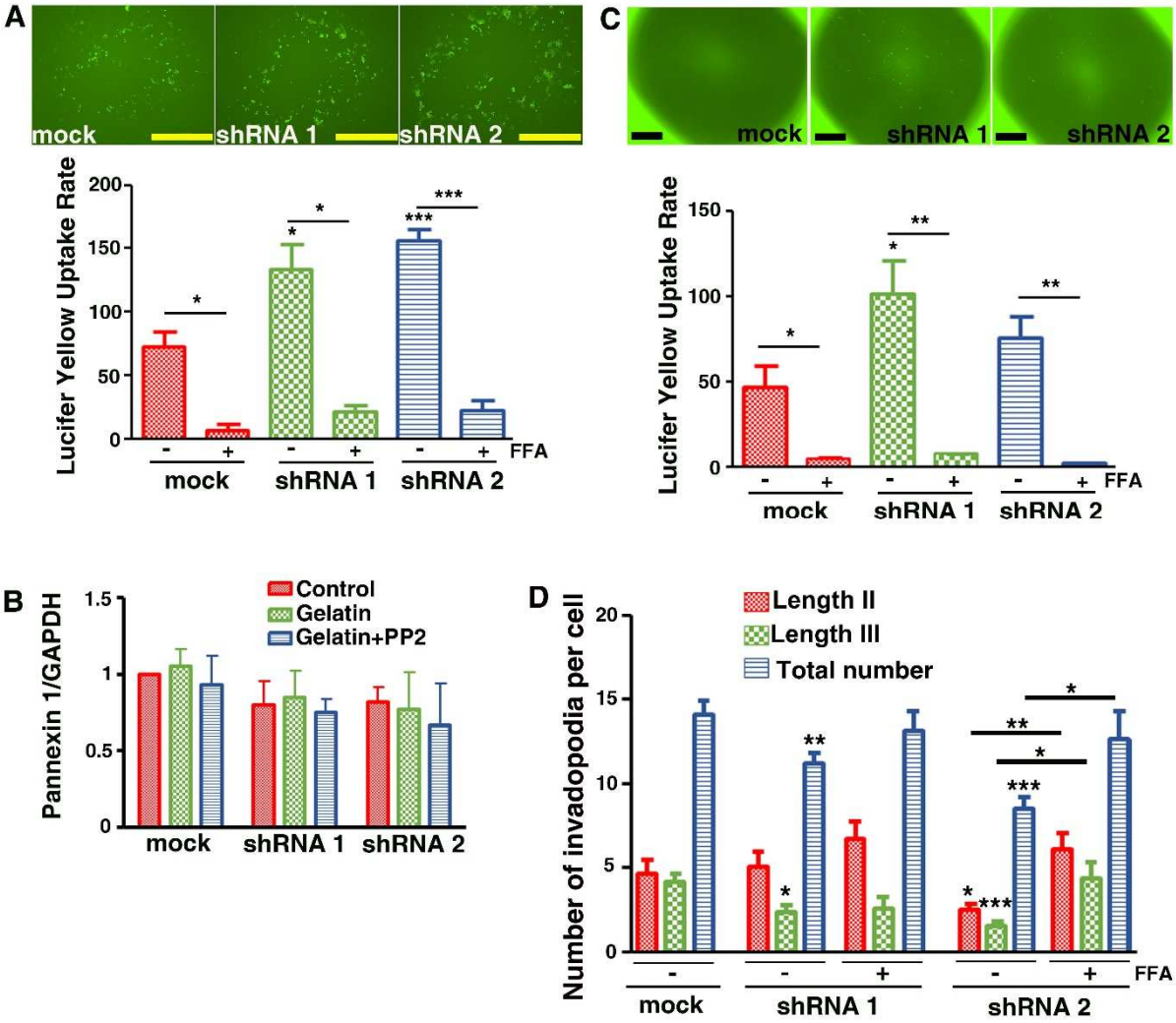

A
mock
shRNA 1
shRNA 2
Lucifer Yellow Uptake Rate
200
150
100
50
0
FFA
C
mock
shRNA 1
shRNA 2
Lucifer Yellow Uptake Rate
150
100
50
0
FFA
B
Pannexin 1/GAPDH
1.5
1
0.5
0
Control
Gelatin
Gelatin+PP2
mock
shRNA 1
shRNA 2
D
Number of invadopodia per cell
20
15
10
5
0
Length II
Length III
Total number
FFA
mock
shRNA 1
shRNA 2

Figure 8:

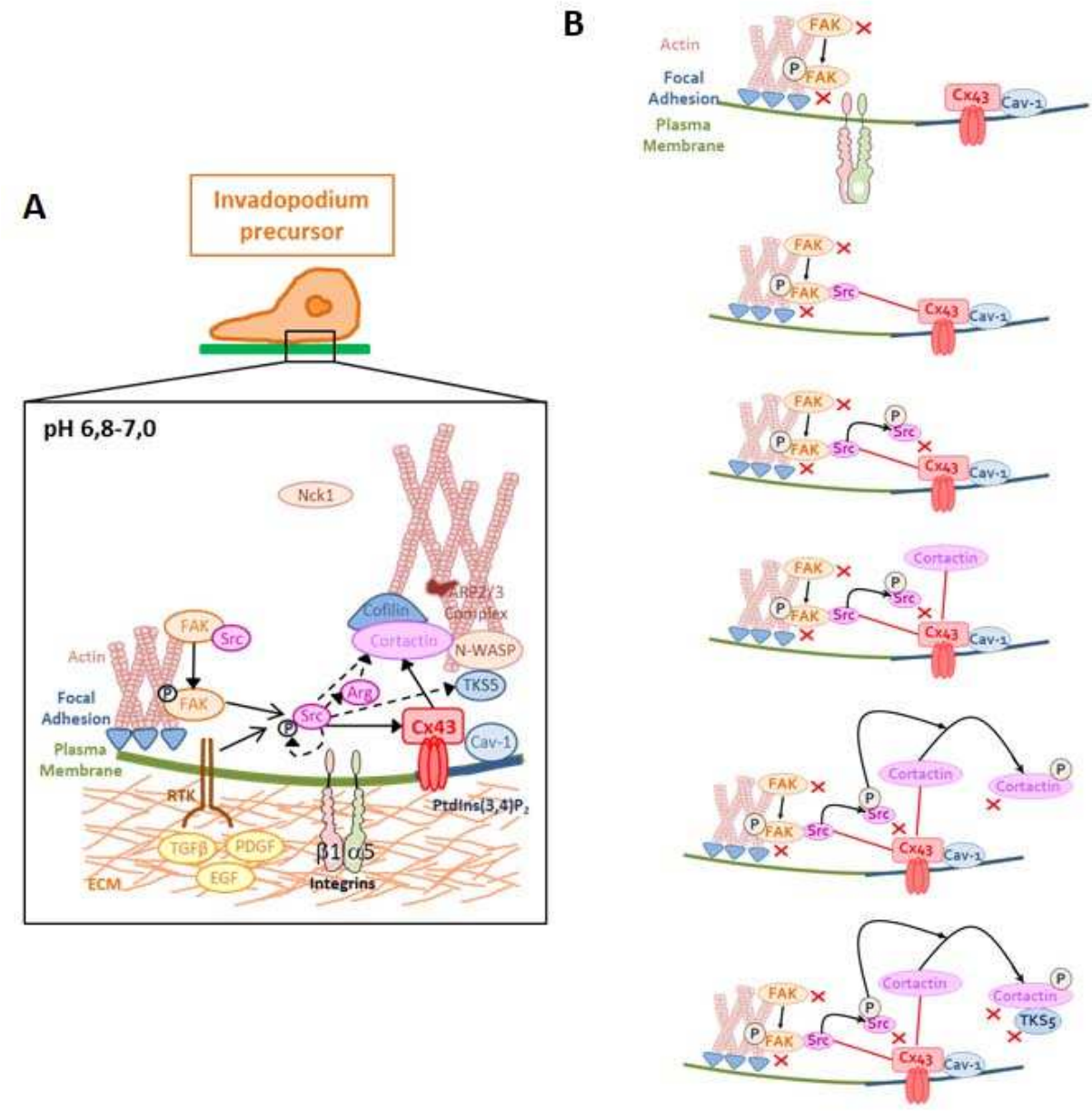

A
Invadopodium precursor
pH 6,8-7,0
Nck1
Cofilin
ARP2/3 Complex
Cortactin
N-WASP
TKS5
Arg
Actin
Focal Adhesion
Plasma Membrane
FAK
Src
Cx43
Cav-1
RTK
TGFβ
PDGF
EGF
ECM
β1 α5
Integrins
PtdIns(3,4)P2
B
Actin
Focal Adhesion
Plasma Membrane
FAK
Src
Cx43
Cav-1
Cortactin
TKS5

Figure S1:

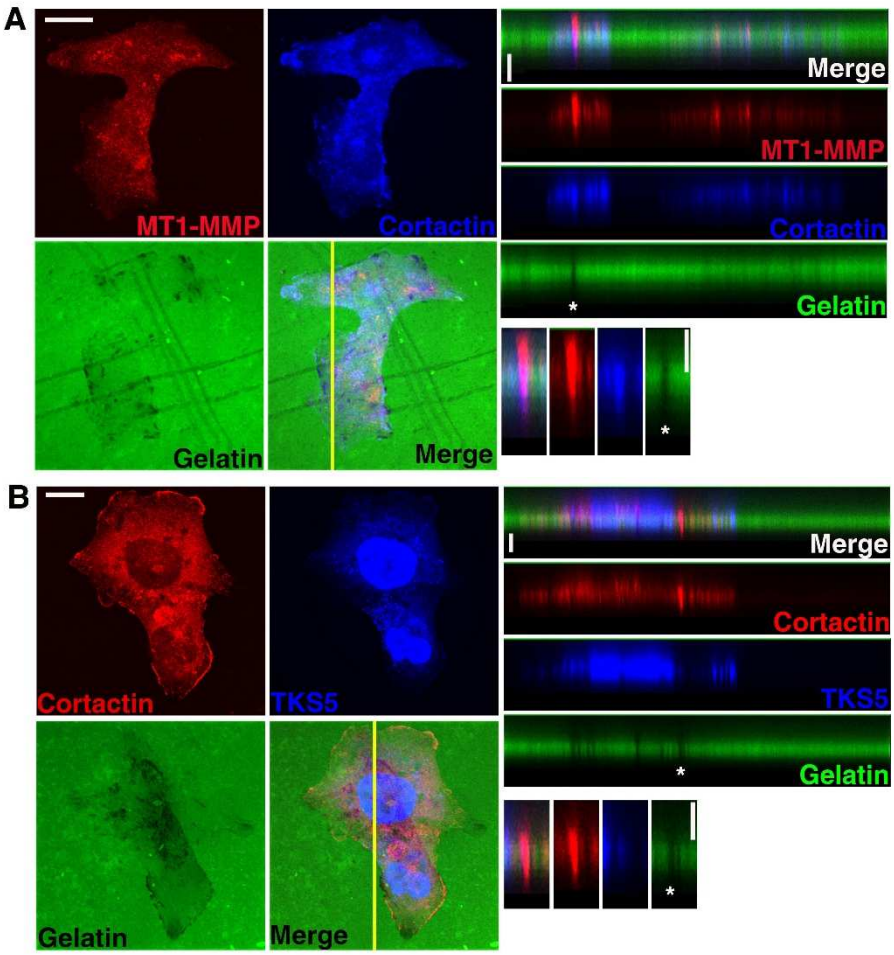

A
MT1-MMP
Cortactin
Merge
MT1-MMP
Cortactin
Gelatin
Gelatin
Merge
B
Cortactin
TKS5
Merge
Cortactin
TKS5
Gelatin
Gelatin
Merge

Figure S2:

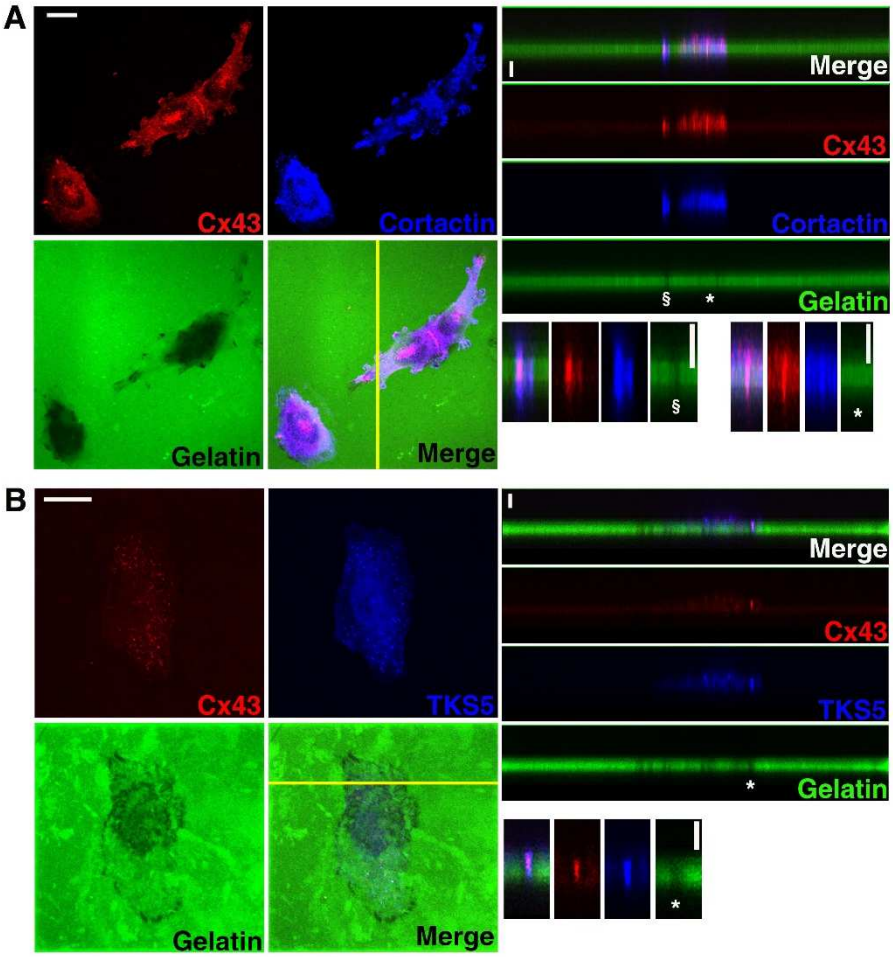

A
Cx43
Cortactin
Merge
Cx43
Cortactin
Gelatin
§
*
Gelatin
Merge
§
*
B
Cx43
TKS5
Merge
Cx43
TKS5
Gelatin
*
Gelatin
Merge
*

Figure S3:

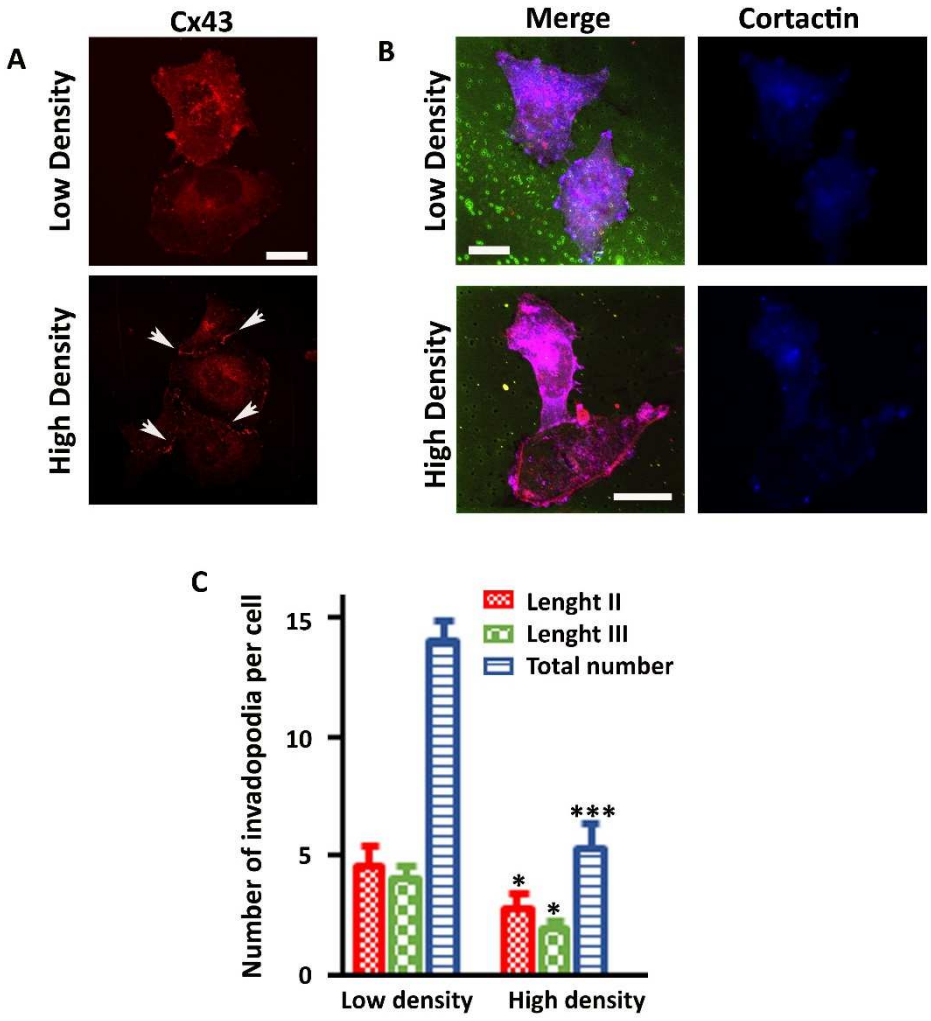

A
Cx43
Low Density
High Density
B
Merge
Cortactin
Low Density
High Density
C
Number of invadopodia per cell
15
10
5
0
Lenght II
Lenght III
Total number
*
*
***
Low density
High density

Figure S4:

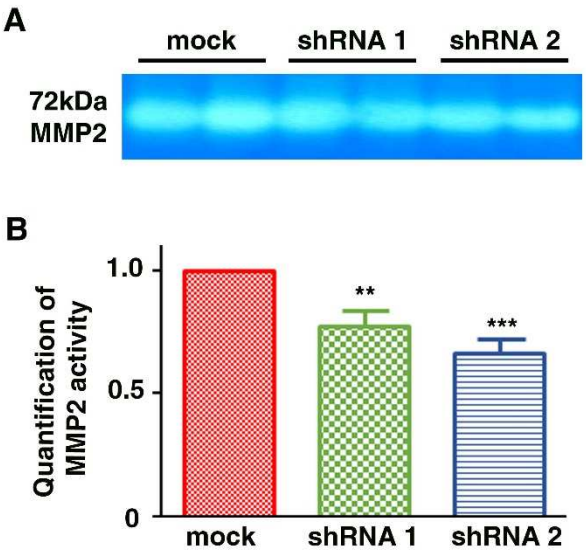


Figure S5:

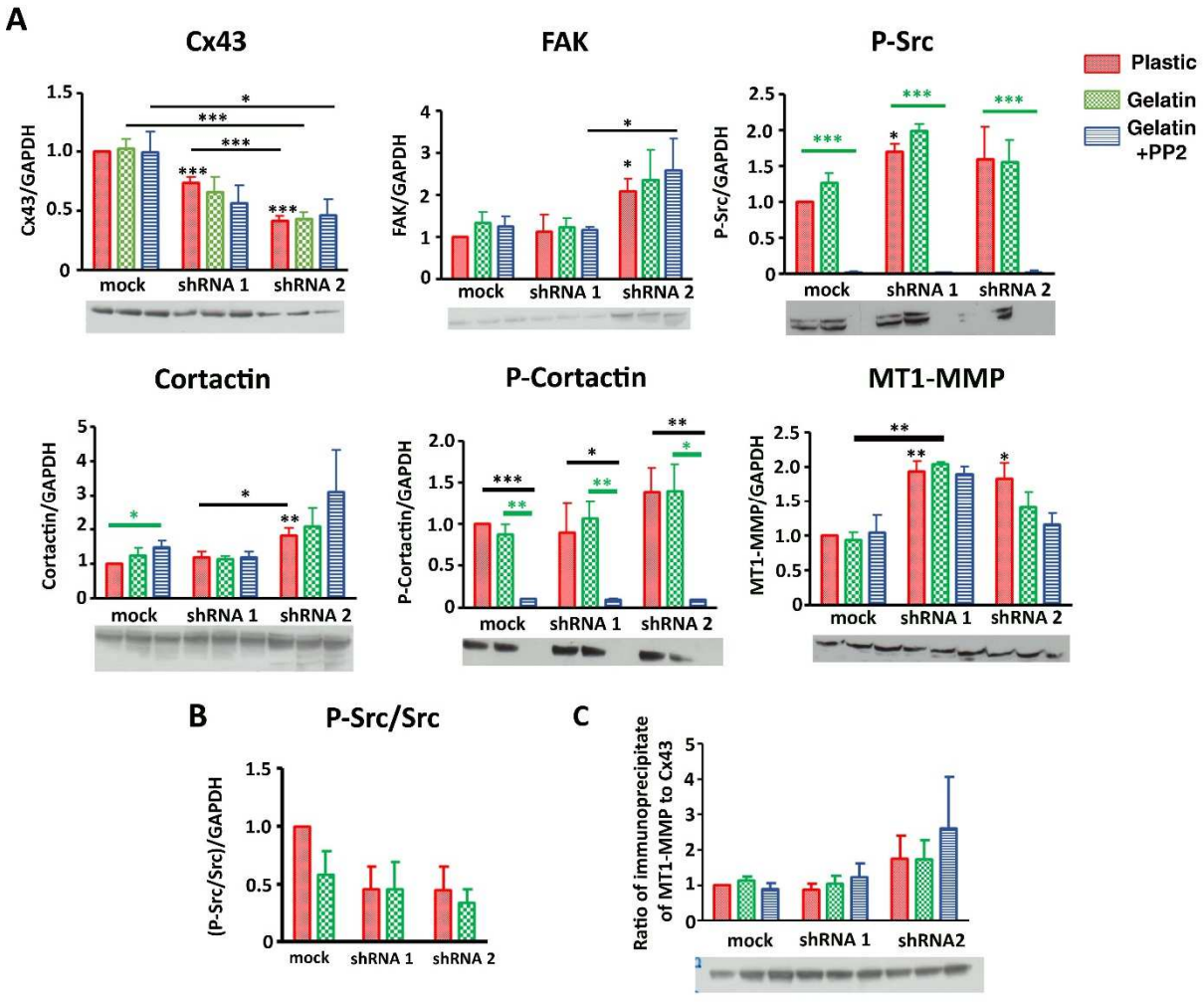


Table:

Figure 5	mock	shRNA 1	shRNA 2
Percentage of cells presenting gelatin degradation due to the presence of invadopodia (Fig. 5C)	28.32 ± 1.93%	19.28 ± 1.75%	9.45 ± 1.84%
Total number of invadopodia per cell (Fig. 5D)	14.5 ± 1.1	9.1 ± 0.7	8.7 ± 0.7
Number of long and medium invadopodia per cell (Fig. 5E)	Medium 3.5 ± 0.5 Long 3.6 ± 0.3	Medium 3.3 ± 0.3 Long 1.5 ± 0.2	Medium 2.0 ± 0.2 Long 1.6 ± 0.3
Figure 4/6/S5	mock	shRNA 1	shRNA 2
Western-blot			
Cx43 (Fig. 4A,6A ; N=9), plastic	1	0.74 ± 0.06	0.43 ±0.04
Cx43 (Fig. 4A,6A ; N=9), gelatin	1.03 ± 0.09	0.69 ± 0.14	0.45 ± 0.06
Cx43 (Fig. 4A,6A ; N=9), gelatin+PP2	1.01 ± 0.09	0.61 ± 0.16	0.47 ± 0.14
FAK (Fig. 4A,S5A; N=4), plastic	1	1.13 ± 0.39	2.08 ± 0.3
FAK (Fig. 4A,S5A; N=4), gelatin	1.33 ± 0.24	1.22 ± 0.22	2.36 ± 0.71
P-FAK (Fig. 4A,6A; N=4), plastic	1	0.93 ± 0.23	1.86 ± 0.32
P-FAK (Fig. 4A,6A; N=4), gelatin	1.78 ± 0.16	1.02 ± 0.3	1.87 ± 0.66
Src (Fig. 4B,6B ; N=5), plastic	1	1.37 ± 0.35	2 ± 0.27
Src (Fig. 4B,6B; N=5), gelatin	1.45 ± 0.16	1.74 ± 0.42	2.32 ± 0.55
Src (Fig. 4B,6B ; N=5), gelatin+PP2	2.97 ± 0.4	3.2 ± 0.41	4.96 ± 1.1
P-Src (Fig. 4B,S5A ; N=3), plastic	1	1.7 ± 0.1	1.59 ± 0.45
P-Src (Fig. 4B,S5A; N=3), gelatin	1.26 ± 0.13	1.99 ± 0.09	1.55 ± 0.31
P-Src (Fig. 4B,S5A ; N=3), gelatin+PP2	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.001	0.03 ± 0.01
Immunoprecipitation			
Src (Fig. 4B,6C ; N=3), plastic	0.15 ± 0.05	0.47 ± 0.03	0.69 ± 0.05
Src (Fig. 4B,6C ; N=3), gelatin	0.74 ± 0.09	0.61 ± 0.08	0.69 ± 0.02
Western-blot			
Cortactin (Fig. 4C,S5A ; N=4), plastic	1	1.19 ± 0.15	1.83 ± 0.21

Cortactin (Fig. 4C,S5A ; N=4), gelatin	1.26 ± 0.21	1.13 ± 0.08	2.10 ± 0.50
P-Cortactin (Fig. 4C,S5A; N=3), plastic	1	0.89 ± 0.34	1.39 ±0.28
P-Cortactin (Fig. 4C,S5A; N=3), gelatin	0.87 ± 0.12	1.06 ± 0.19	1.39 ± 0.32
P-Cortactin (Fig. 4C,S5A; N=3), gelatin+PP2	0.1 ± 0.09	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.09
TKS5 (Fig. 4D,6A; N=4), plastic	1	1.33 ± 0.53	1.91 ± 0.25
TKS5 (Fig. 4D,6A; N=4), gelatin	1.35 ± 0.03	1.61 ± 0.29	1.63 ± 0.43
MT1-MMP (Fig. 4D,S5A ; N=3), plastic	1	1.94 ± 0.15	1.84 ± 0.22
MT1-MMP (Fig. 4D,S5A ; N=3), gelatin	0.94 ± 0.11	2.04 ± 0.02	1.42 ± 0.22
Immunoprecipitation			
Cortactin (Fig. 4C,6C ; N=5), plastic	1	1.43 ± 0.45	3.02 ± 0.49
Cortactin (Fig. 4C,6C ; N=5), gelatin	1.95 ± 0.42	1.66 ± 0.62	2.57 ± 0.44
MT1-MMP (Fig. 4D,S5C ; N=4), plastic	1	0.86 ±0.17	1.74 ±0.65
MT1-MMP (Fig. 4D,S5C ; N=4), gelatin	1.13 ± 0.10	1.04 ± 0.23	1.73 ± 0.52
Figure 7	mock	shRNA 1	shRNA 2
Quantification LY uptake rate on coverslips			
Ctr (Fig. 7A ; N=5)	72 ± 12.76	133.6 ± 20.06	156 ± 8.67
+FFA (Fig. 7A ; N=5)	6 ± 5	21.5 ± 4.5	22.5 ± 7.5
WesternBlot Panx1			
Panx1 (Fig. 7B; N=3), plastic	1	0.8 ± 0.16	0.82 ±0.1
Panx1 (Fig. 7B; N=3), gelatin	1.05 ± 0.11	0.85 ± 0.17	0.77 ± 0.24
Panx1 (Fig. 7B; N=3), gelatin+PP2	0.93 ± 0.19	0.75 ± 0.09	0.67 ± 0.27
Quantification LY uptake rate on insert			
Ctr (Fig. 7C ; N=5)	46.38 ± 12.63	101.3 ± 19.52	75.38 ±12.97
+FFA (Fig. 7C ; N=5)	4.5 ±0.65	7.25 ± 0.85	2 ± 0.41
Quantification of invadopodia per cell			
Length II	4.63 ± 0.80	5.06 ± 0.86	2.50 ± 0.31
Length II + FFA	-	6.73 ± 0.97	6.06 ± 0.86

Références bibliographiques

A

Situation règlementaire du bisphénol A et des matériaux et objets contenant du bisphénol A dans l'Union Européenne et en France [WWW Document], n.d.URLhttp://www.contactalimentaire.com/index.php?id=104&type=98&tx_ttnews[tt_news]=737&cHash=71490036dd (accessed 11.21.18).

10 Santé et environnement - Définitions, n.d. . Cah. DD - Outil Complet. URL http://les.cahiers-developpement-durable.be/vivre/10-sante-et-environnement-definitions/ (accessed 9.21.18).

Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D., Laird, D.W., 2016. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. Nat. Rev. Cancer 16, 775–788. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.105

Acconcia, F., Pallottini, V., Marino, M., 2015. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-Response 13. https://doi.org/10.1177/1559325815610582

Aftab, Q., Sin, W.-C., Naus, C.C., 2015. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. Oncotarget 6, 11447–11464. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3407

Ahir, B.K., Pratten, M.K., 2015. Structure and function of gap junction proteins: role of gap junction proteins in embryonic heart development. Int. J. Dev. Biol. 58, 649–662. https://doi.org/10.1387/ijdb.140188dp

Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., von Deimling, A., 2015. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol. (Berl.) 129, 829–848. https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., García-Arévalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I., Nadal, Á., 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. Mol. Cell. Endocrinol., Health Impacts Of Endocrine Disrupters 355, 201–207. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.012

Athersuch, T.J., 2012. The role of metabolomics in characterizing the human exposome. Bioanalysis 4, 2207–2212. https://doi.org/10.4155/bio.12.211

B

Bacle, A., Thevenot, S., Grignon, C., Belmouaz, M., Bauwens, M., Venisse, N., Migeot, V., Dupuis, A., 2016. Exposition au bisphénol A et à ses dérivés chlorés chez les patients traités par hémodiafiltration en ligne. Néphrologie Thérapeutique, Premier congrès de la Société francophone de néphrologie dialyse et transplantation (SFNDT) 12, 326. https://doi.org/10.1016/j.nephro.2016.07.093

Bates, D.C., Sin, W.C., Aftab, Q., Naus, C.C., 2007. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. Glia 55, 1554–1564. https://doi.org/10.1002/glia.20569

Beaty, B.T., Condeelis, J., 2014. Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. Eur. J. Cell Biol., Cell Migration and Invasion in Physiology and Pathology. 93, 438–444. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.003

Belousov, A.B., Fontes, J.D., Freitas-Andrade, M., Naus, C.C., 2017. Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. BMC Cell Biol. 18, 4. https://doi.org/10.1186/s12860-016-0120-x

Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K., Harris, A.L., 1998. Isoform Composition of Connexin Channels Determines Selectivity among Second Messengers and Uncharged Molecules. J. Biol. Chem. 273, 2808–2816. https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2808

Bisphénol A : l'Anses confirme les risques pour la santé [WWW Document], n.d. . Sci. Avenir. URL https://www.sciencesetavenir.fr/sante/bisphenol-a-l-anses-confirme-les-risques-pour-la-sante_19318 (accessed 2.8.19).

Bisphénol A: l'Anses met en évidence des risques potentiels pour la santé et confirme la nécessité de réduire les expositions | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document], n.d. URL https://www.anses.fr/fr/content/bisph%C3%A9nol-l%E2%80%99anses-met-en-%C3%A9vidence-des-risques-potentiels-pour-la-sant%C3%A9-et-confirme-la (accessed 11.19.18).

Bonavia, R., Inda, M.-M., Cavenee, W., Furnari, F., 2011. Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: a social network. Cancer Res. 71, 4055–4060. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0153

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., Pouysségur, J., 2007. Hypoxia and cancer. J. Mol. Med. 85, 1301–1307. https://doi.org/10.1007/s00109-007-0281-3

Busse, R., World Health Organization, European Observatory on Health Systems and Policies (Eds.), 2010. Tackling chronic disease in Europe: strategies, interventions and challenges, Observatory studies series. World Health Organization on behalf of the European Observatory on Health Systems and Policies, Copenhagen.

C

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., Gilbertson, R.J., 2007. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. Cancer Cell 11, 69–82. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020

Cancer [WWW Document], n.d. . World Health Organ. URL http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed 9.24.18).

Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R., Kettenmann, H., 2011. The brain tumor microenvironment. Glia 59, 1169–1180. https://doi.org/10.1002/glia.21136

Chen, Z., Hambardzumyan, D., 2018. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. Front. Immunol. 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004

Chepied A, Daoud-Omar Z, Meunier-Balandre AC, Laird DW, Mesnil M, Defamie N. The gap junction protein, connexin43, is involved in formation and function of invadopodia in human glioblastoma cells.. Submitted.

Coleman, N., Ameratunga, M., Lopez, J., 2018. Development of Molecularly Targeted Agents and Immunotherapies in Glioblastoma: A Personalized Approach. Clin. Med. Insights Oncol. 12, 1179554918759079. https://doi.org/10.1177/1179554918759079

Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, 2008. . Nature 455, 1061–1068. https://doi.org/10.1038/nature07385

Cukierman, E., Bassi, D.E., 2010. Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. Semin. Cancer Biol. 20, 139–145. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.04.004

Czene, K., Lichtenstein, P., Hemminki, K., 2002. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database. Int. J. Cancer 99, 260–266. https://doi.org/10.1002/ijc.10332

D

De Pascalis, I., Morgante, L., Pacioni, S., D'Alessandris, Q.G., Giannetti, S., Martini, M., Ricci-Vitiani, L., Malinverno, M., Dejana, E., Larocca, L.M., Pallini, R., 2018. Endothelial trans-differentiation in glioblastoma recurring after radiotherapy. Mod. Pathol. 31, 1361–1366. https://doi.org/10.1038/s41379-018-0046-2

De Vleeschouwer, S., Bergers, G., 2017. Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment?, in: De Vleeschouwer, S. (Ed.), Glioblastoma. Codon Publications, Brisbane (AU).

Définition cancer [WWW Document], n.d. URL http://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/C/cancer (accessed 9.24.18).

Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavaillès, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. Nat. Commun. 6, 8089. https://doi.org/10.1038/ncomms9089

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocr. Rev. 30, 293–342. https://doi.org/10.1210/er.2009-0002

Dupont, C., Vermandel, M., Reyns, N., Mordon, S., 2018. La thérapie photodynamique - Application au traitement chirurgical des glioblastomes. médecine/sciences 34, 901–903. https://doi.org/10.1051/medsci/2018225

Dutour, A., Rigaud, M., 2005. Tumor Endothelial Cells are Targets for Selective Therapies: In Vitro and In Vivo Models to Evaluate Antiangiogenic Strategies. ANTICANCER Res. 9.

E

Eghbali, B., Kessler, J.A., Reid, L.M., Roy, C., Spray, D.C., 1991. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 10701–10705.

Ek-Vitorín, J.F., Calero, G., Morley, G.E., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., 1996. PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. Biophys. J. 71, 1273–1284. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79328-1

Elzarrad, M.K., Haroon, A., Willecke, K., Dobrowolski, R., Gillespie, M.N., Al-Mehdi, A.-B., 2008. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. BMC Med. 6, 20. https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-20

Erler, C., Novak, J., 2010. Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. J. Pediatr. Nurs. 25, 400–407. https://doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006

Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H.H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J.M., Sloane, B.F., Johnson, J., Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2013. Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. Cancer Res. 73, 1524–1535. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2796

Evans, W.H., Martin, P.E.M., 2002. Gap junctions: structure and function (Review). Mol. Membr. Biol. 19, 121–136. https://doi.org/10.1080/09687680210139839

F

Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., Bouvier, C., 2008. Classification histologique et moléculaire des gliomes. Rev. Neurol. (Paris) 164, 505–515. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2008.03.011

Figarella-Branger, D., Colin, C., Tchoghandjian, A., Baeza, N., Bouvier, C., 2010. Glioblastomes : oncogenèse et bases biologiques. Neurochirurgie, SNCLF - Journées annuelles, Marne-la-Vallée (Paris), 5-8 décembre 2010 56, 441–448. https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.010

Friedl, P., Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat. Rev. Cancer 3, 362–374. https://doi.org/10.1038/nrc1075

Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., Terao, Y., 2001. Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. Chemosphere 44, 973–979. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00507-5

Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 21, 2683–2710. https://doi.org/10.1101/gad.1596707

Furshpan, E.J., Potter, D.D., 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. J. Physiol. 145, 289–325.

G

Ghosh, A., Chaudhuri, S., 2010. Microglial action in glioma: A boon turns bane. Immunol. Lett. 131, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.03.003

Giepmans, B.N., Moolenaar, W.H., 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. Curr. Biol. CB 8, 931–934.

Giepmans, B.N.G., 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovasc. Res. 62, 233–245. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.009

Giepmans, B.N.G., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., Moolenaar, W.H., 2001. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. Curr. Biol. 11, 1364–1368. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00424-9

Glioblastome, tout savoir, origine, causes, diagnostic, pronostic, traitements, vaccins [WWW Document], n.d. URL https://glioblastome.fr/maladie/glioblastome.html (accessed 10.1.18).

Goldberg, G.S., Moreno, A.P., Lampe, P.D., 2002. Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP. J. Biol. Chem. 277, 36725–36730. https://doi.org/10.1074/jbc.M109797200

Grek, C.L., Sheng, Z., Naus, C.C., Sin, W.C., Gourdie, R.G., Ghatnekar, G.G., 2018. Novel approach to temozolomide resistance in malignant glioma: connexin43-directed therapeutics. Curr. Opin. Pharmacol. 41, 79–88. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.002

H

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. Cell 100, 57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Hardee, M.E., Zagzag, D., 2012. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. Am. J. Pathol. 181, 1126–1141. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.030

Heddleston, J.M., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype. Cell Cycle Georget. Tex 8, 3274–3284.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Godard, S., Dietrich, P.-Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Melle, G.V., Tribolet, N. de, Stupp, R., 2004. Clinical Trial Substantiates the Predictive Value of O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide. Clin. Cancer Res. 10, 1871–1874. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0384

Hertzberg, E.L., Van Eldik, L.J., 1987. [36] Interaction of calmodulin and other calcium-modulated proteins with gap junctions, in: Methods in Enzymology, Cellular Regulators Part A: Calcium- and Calmodulin-Binding Proteins. Academic Press, pp. 445–454. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)39105-0

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. Science 284, 1994–1998. https://doi.org/10.1126/science.284.5422.1994

Huang, G.Y., Cooper, E.S., Waldo, K., Kirby, M.L., Gilula, N.B., Lo, C.W., 1998. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. J. Cell Biol. 143, 1725–1734.

Huang, R.P., Hossain, M.Z., Sehgal, A., Boynton, A.L., 1999. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. J. Surg. Oncol. 70, 21–24.

Huang, Y., Tong, L., Yi, L., Zhang, C., Hai, L., Li, T., Yu, S., Wang, W., Tao, Z., Ma, H., Liu, P., Xie, Y., Yang, X., 2018. Three-dimensional hydrogel is suitable for targeted investigation of amoeboid migration of glioma cells. Mol. Med. Rep. 17, 250. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7888

I

INCa : Le rapport 2017 “Les cancers en France” est disponible – ONCORIF, n.d. URL https://www.oncorif.fr/2018/07/inca-le-rapport-2017-les-cancers-en-france-est-disponible/ (accessed 2.7.19).

J

Jacquemet, G., Hamidi, H., Ivaska, J., 2015. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. Curr. Opin. Cell Biol., Cell adhesion and migration 36, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.007

Jalal, N., Surendranath, A.R., Pathak, J.L., Yu, S., Chung, C.Y., 2017. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. Toxicol. Rep. 5, 76–84. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.013

Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navea, N., Navalón, A., Fernández, M.F., Olea, N., Vílchez, J.L., 2010. Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 878, 3363–3369. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.021

K

Kameritsch, P., Kiemer, F., Beck, H., Pohl, U., Pogoda, K., 2015. Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. Biochim. Biophys. Acta 1853, 2907–2917. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.004

Kamibayashi, Y., Oyamada, Y., Mori, M., Oyamada, M., 1995. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. Carcinogenesis 16, 1287–1297.

Kamrin, M.A., 2004. Bisphenol A: A Scientific Evaluation. Medscape Gen. Med. 6.

Kang, J.-H., Kondo, F., Katayama, Y., 2006. Human exposure to bisphenol A. Toxicology 226, 79–89. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.009

Kanno, Y., Loewenstein, W.R., 1964. INTERCELLULAR DIFFUSION. Science 143, 959–960. https://doi.org/10.1126/science.143.3609.959

Kar, R., Batra, N., Riquelme, M.A., Jiang, J.X., 2012. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. Arch. Biochem. Biophys. 524, 2–15. https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.03.008

Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010a. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell 141, 52–67. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015

Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010b. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell 141, 52–67. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015

Kirichenko, E.Y., Savchenko, A.F., Kozachenko, D.V., Akimenko, M.A., Filippova, S.Y., Matsionis, A.E., Povilaitite, P.E., 2017. [Connexin 43 expression in human brain glial tumors]. Arkh. Patol. 79, 3–9. https://doi.org/10.17116/patol20177923-9

Koppenol, W.H., Bounds, P.L., Dang, C.V., 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nat. Rev. Cancer 11, 325–337. https://doi.org/10.1038/nrc3038

Kotini, M., Mayor, R., 2015. Connexins in migration during development and cancer. Dev. Biol., Cell Adhesion in Development 401, 143–151. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.023

L

Laird, D.W., 2006. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem. J. 394, 527–543. https://doi.org/10.1042/BJ20051922

Lampe, P.D., Lau, A.F., 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1171–1186. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00264-4

Lapato, A.S., Tiwari-Woodruff, S.K., 2018. Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. J. Neurosci. Res. 96, 31–44. https://doi.org/10.1002/jnr.24088

Lapierre, E., n.d. Chemical mixtures: Challenges for research and risk assessment 6.

Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C., Falk, M.M., 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 10446–10451. https://doi.org/10.1073/pnas.162055899

Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F., 1996. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. Cell 84, 359–369. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5

Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [WWW Document], n.d. URL /le-cancer-en-chiffres (accessed 9.24.18).

Le, D.M., Besson, A., Fogg, D.K., Choi, K.-S., Waisman, D.M., Goodyer, C.G., Rewcastle, B., Yong, V.W., 2003. Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness: A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-Type Plasminogen Activator–Plasmin Cascade. J. Neurosci. 23, 4034–4043. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04034.2003

Lecordier, D., 2016. Réinterroger le concept de « maladie chronique » : entre conception de la personne et norme sociale. Rech. Soins Infirm. 125, 5–5. https://doi.org/10.3917/rsi.125.0005

Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., Lee, K., 2003. Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. Toxicol. Sci. 75, 40–46. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg150

Les maladies chroniques [WWW Document], n.d. URL https://compare.aphp.fr/l-etude/liste-maladies.html (accessed 4.24.19).

Li, G., Qin, Z., Chen, Z., Xie, L., Wang, R., Zhao, H., 2017. Tumor Microenvironment in Treatment of Glioma. Open Med. 12, 247–251. https://doi.org/10.1515/med-2017-0035

Li, H., Liu, T.F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G.S., Lampe, P.D., Johnson, R.G., 1996. Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. J. Cell Biol. 134, 1019–1030.

Liao, C., Kannan, K., 2012. Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Environ. Sci. Technol. 46, 5003–5009. https://doi.org/10.1021/es300115a

Liebelt, B.D., Shingu, T., Zhou, X., Ren, J., Shin, S.A., Hu, J., 2016. Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy [WWW Document]. Stem Cells Int. https://doi.org/10.1155/2016/7849890

Lin, J.H.-C., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., Haubrich, S., Willecke, K., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2002. Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells. J. Neurosci. 22, 4302–4311. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04302.2002

Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M.M., Huang, G., Liu, J., Song, S., Jiang, Y., Xia, Q., Swinnen, J.V., Bormans, G., Himmelreich, U., Oyen, R., Ni, Y., 2015. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. Quant. Imaging Med. Surg. 5, 708–729. https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01

Loewenstein, W.R., 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev. 61, 829–913. https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.829

Loewenstein, W.R., Kanno, Y., 1966. Intercellular Communication and the Control of Tissue Growth: Lack of Communication between Cancer Cells. Nature 209, 1248. https://doi.org/10.1038/2091248a0

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. (Berl.) 114, 97–109. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. (Berl.) 131, 803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1

M

MacGrath, S.M., Koleske, A.J., 2012. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. J. Cell Sci. 125, 1621–1626. https://doi.org/10.1242/jcs.093781

Maladies non transmissibles [WWW Document], n.d. . World Health Organ. URL http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases (accessed 9.20.18).

Martin, T.A., Ye, L., Sanders, A.J., Lane, J., Jiang, W.G., 2013. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. Landes Bioscience.

Masui, K., Cloughesy, T.F., Mischel, P.S., 2012. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 38, 271–291. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01238.x

Mayorquin, L.C., Rodriguez, A.V., Sutachan, J.-J., Albarracín, S.L., 2018. Connexin-Mediated Functional and Metabolic Coupling Between Astrocytes and Neurons. Front. Mol. Neurosci. 11. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00118

Menard, J.A., Christianson, H.C., Kucharzewska, P., Bourseau-Guilmain, E., Svensson, K.J., Lindqvist, E., Chandran, V.I., Kjellén, L., Welinder, C., Bengzon, J., Johansson, M.C., Belting, M., 2016. Metastasis Stimulation by Hypoxia and Acidosis-Induced Extracellular Lipid Uptake Is Mediated by Proteoglycan-Dependent Endocytosis. Cancer Res. 76, 4828–4840. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2831

Meşe, G., Richard, G., White, T.W., 2007. Gap junctions: basic structure and function. J. Invest. Dermatol. 127, 2516–2524. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770

Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Elfgang, C., Traub, O., Willecke, K., Yamasaki, H., 1995. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. Cancer Res. 55, 629–639.

Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.P., Johnson, R.G., 1992. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. J. Cell Biol. 119, 179–189.

Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environ. Toxicol. Pharmacol. 37, 738–758. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003

Migeot, V., Dupuis, A., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Pierre, F., Rabouan, S., 2013. Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives in Human Colostrum. Environ. Sci. Technol. 47, 13791–13797. https://doi.org/10.1021/es403071a

Miller, G.W., Jones, D.P., 2014. The Nature of Nurture: Refining the Definition of the Exposome. Toxicol. Sci. 137, 1–2. https://doi.org/10.1093/toxsci/kft251

Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., McDonald, D.M., 2002. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. Am. J. Pathol. 160, 985–1000.

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 5185–5190. https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209

Morley, G.E., Taffet, S.M., Delmar, M., 1996. Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. Biophys. J. 70, 1294–1302. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79686-8

Mott, J.D., Werb, Z., 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 558–564. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.010

Multigner, L., Kadhel, P., 2008. Perturbateurs endocriniens, concepts et réalité. Arch. Mal. Prof. Environ. 69, 710–717. https://doi.org/10.1016/j.admp.2008.09.004

Murphy, D.A., Courtneidge, S.A., 2011. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 413–426. https://doi.org/10.1038/nrm3141

Musil, L.S., Goodenough, D.A., 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. Cell 74, 1065–1077.

Musil, L.S., Le, A.-C.N., VanSlyke, J.K., Roberts, L.M., 2000. Regulation of Connexin Degradation as a Mechanism to Increase Gap Junction Assembly and Function. J. Biol. Chem. 275, 25207–25215. https://doi.org/10.1074/jbc.275.33.25207

N

Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., Hynes, R.O., 2012. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. Mol. Cell. Proteomics MCP 11. https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647

Nappi, F., Barrea, L., Di Somma, C., Savanelli, M.C., Muscogiuri, G., Orio, F., Savastano, S., 2016. Endocrine Aspects of Environmental "Obesogen" Pollutants. Int. J. Environ. Res. Public. Health 13. https://doi.org/10.3390/ijerph13080765

Naus, C.C., Elisevich, K., Zhu, D., Belliveau, D.J., Del Maestro, R.F., 1992. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. Cancer Res. 52, 4208–4213.

Nelson, C.M., Bissell, M.J., 2006. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22, 287–309. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315

Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N.-H., 2012. Gap Junctions. Compr. Physiol. 2. https://doi.org/10.1002/cphy.c110051

O

O'Brien, E.R., Howarth, C., Sibson, N.R., 2013. The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches. Front. Cell. Neurosci. 7. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00040

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lütolf, U.M., Kleihues, P., 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res. 64, 6892–6899. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337

Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A., Shimohigashi, Y., 2008. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor-γ. Environ. Health Perspect. 116, 32–38. https://doi.org/10.1289/ehp.10587

Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L.F., Lopes, C., 2007. Chemical carcinogenesis. An. Acad. Bras. Ciênc. 79, 593–616. https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004

Oliveira, R., Christov, C., Guillamo, J.S., de Boüard, S., Palfi, S., Venance, L., Tardy, M., Peschanski, M., 2005. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. BMC Cell Biol. 6, 7. https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-7

OMS | Maladies chroniques [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/topics/chronic_diseases/fr/ (accessed 8.30.18).

Omuro, A., 2013. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. JAMA 310, 1842. https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319

Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., Condeelis, J., 2009. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. J. Cell Biol. 186, 571–587. https://doi.org/10.1083/jcb.200812176

Oyamada, M., Oyamada, Y., Takamatsu, T., 2005. Regulation of connexin expression. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., The Connexins Part III 1719, 6–23. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.002

P

Paget, S., 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev. 8, 98–101.

Paw, I., Carpenter, R.C., Watabe, K., Debinski, W., Lo, H.-W., 2015. Mechanisms Regulating Glioma Invasion. Cancer Lett. 362, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.015

Peracchia, C., Wang, X., Li, L., Peracchia, L.L., 1996. Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling inXenopus oocytes. Pflüg. Arch. 431, 379–387. https://doi.org/10.1007/BF02207275

Perturbateurs endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel - Article de revue - INRS [WWW Document], n.d. URL http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC%20156 (accessed 9.17.18).

Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution [WWW Document], n.d. URL https://www.senat.fr/rap/r10-765/r10-765.html (accessed 9.17.18).

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., Aldape, K., 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell 9, 157–173. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019

Pjanic, M., 2017. The role of polycarbonate monomer bisphenol-A in insulin resistance. PeerJ 5. https://doi.org/10.7717/peerj.3809

Placone, A.L., Quiñones-Hinojosa, A., Searson, P.C., 2016. The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment. Tumor Biol. 37, 61–69. https://doi.org/10.1007/s13277-015-4242-0

Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017 / 2018 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [WWW Document], n.d. URL http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2018/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-en-2017 (accessed 2.7.19).

R

Rao, J.S., 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nat. Rev. Cancer 3, 489–501. https://doi.org/10.1038/nrc1121

Rappaport, S.M., 2011. Implications of the exposome for exposure science. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 21, 5–9. https://doi.org/10.1038/jes.2010.50

Rapport "Effets sanitaires du bisphénol A (BPA)" et "Connaissances relatives aux usages du bisphénol A" | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document], n.d. URL https://www.anses.fr/fr/content/rapport-effets-sanitaires-du-bisph%C3%A9nol-bpa-et-connaissances-relatives-aux-usages-du (accessed 11.19.18).

Réduire les risques de cancer - Comprendre, prévenir, dépister [WWW Document], n.d. URL https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer (accessed 2.8.19).

Reiss, Y., Machein, M.R., Plate, K.H., 2005. The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas. Brain Pathol. Zurich Switz. 15, 311–317.

Revel, J.P., Karnovsky, M.J., 1967. HEXAGONAL ARRAY OF SUBUNITS IN INTERCELLULAR JUNCTIONS OF THE MOUSE HEART AND LIVER. J. Cell Biol. 33, C7-12.

Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Mornagui, B., 2014. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. Environ. Int. 64, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.007

Ribeiro, A.L., Okamoto, O.K., 2015. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. Stem Cells Int. 2015. https://doi.org/10.1155/2015/868475

Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., Perdu, E., Zalko, D., Bourguet, W., Balaguer, P., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. Environ. Health Perspect. 119, 1227–1232. https://doi.org/10.1289/ehp.1003328

Rose, B., Mehta, P.P., Loewenstein, W.R., 1993. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. Carcinogenesis 14, 1073–1075. https://doi.org/10.1093/carcin/14.5.1073

Rouillon, S., Grignon, C., Venisse, N., Nadeau, C., Albouy-Llaty, M., Migeot, V., Dupuis, A., Brunet, B., 2015. Exposition hydrique au bisphénol A et à ses dérivés chlorés et liens avec le cancer du sein : étude de faisabilité BREDI I (Breast and Endocrine Disrupter Investigation Part 1). Rev. Sci. L'eau J. Water Sci. 28, 215–220. https://doi.org/10.7202/1034010ar

Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., Endocrine Disruptors 127, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002

Ryszawy, D., Sarna, M., Rak, M., Szpak, K., Kędracka-Krok, S., Michalik, M., Siedlar, M., Zuba-Surma, E., Burda, K., Korohoda, W., Madeja, Z., Czyż, J., 2014. Functional links between Snail-1 and Cx43 account for the recruitment of Cx43-positive cells into the invasive

front of prostate cancer. Carcinogenesis 35, 1920–1930. https://doi.org/10.1093/carcin/bgu033

S

Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Brañes, M.C., Martínez, A.D., Beyer, E.C., 2003. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. Physiol. Rev. 83, 1359–1400. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2003

Schubert, A.-L., Schubert, W., Spray, D.C., Lisanti, M.P., 2002. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. Biochemistry 41, 5754–5764.

Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., Heindel, J.J., 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 127, 204–215. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007

Schulze, A., Harris, A.L., 2012. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. Nature 491, 364–373. https://doi.org/10.1038/nature11706

Seachrist, D.D., Bonk, K.W., Ho, S.-M., Prins, G.S., Soto, A.M., Keri, R.A., 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. Reprod. Toxicol. Elmsford N 59, 167–182. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.006

Segretain, D., Falk, M.M., 2004. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., The Connexins 1662, 3–21. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.007

Shao, Q., Wang, H., McLachlan, E., Veitch, G.I.L., Laird, D.W., 2005. Down-regulation of Cx43 by Retroviral Delivery of Small Interfering RNA Promotes an Aggressive Breast Cancer Cell Phenotype. Cancer Res. 65, 2705–2711. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2367

Siebzehnrubl, F.A., Reynolds, B.A., Vescovi, A., Steindler, D.A., Deleyrolle, L.P., 2011. The origins of glioma: E Pluribus Unum? Glia 59, 1135–1147. https://doi.org/10.1002/glia.21143

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 432, 396–401. https://doi.org/10.1038/nature03128

Sinyuk, M., Mulkearns-Hubert, E.E., Reizes, O., Lathia, J., 2018a. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. Front. Oncol. 8. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00646

Sinyuk, M., Mulkearns-Hubert, E.E., Reizes, O., Lathia, J., 2018b. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. Front. Oncol. 8. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00646

Söhl, G., Willecke, K., 2004. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc. Res. 62, 228–232. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.013

Soroceanu, L., Manning, T.J., Sontheimer, H., 2001. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. Glia 33, 107–117.

Stewart, L.A., 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. Lancet Lond. Engl. 359, 1011–1018.

Strale, P.-O., Clarhaut, J., Lamiche, C., Cronier, L., Mesnil, M., Defamie, N., 2012. Down-regulation of Connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion. Mol. Carcinog. 51, 845–860. https://doi.org/10.1002/mc.20853

Stummer, W., Reulen, H.-J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J.-C., Rohde, V., Oppel, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T., ALA-Glioma Study Group, 2008. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. Neurosurgery 62, 564–576; discussion 564-576. https://doi.org/10.1227/01.neu.0000317304.31579.17

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 2009a. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 10, 459–466. https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70025-7

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2009b. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma [WWW Document]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043330. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330

T

Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B.T., Shimoi, K., 2005. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. Toxicology 207, 215–221. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.09.015

Taliana, L., Benezra, M., Greenberg, R.S., Masur, S.K., Bernstein, A.M., 2005. ZO-1: lamellipodial localization in a corneal fibroblast wound model. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46, 96–103. https://doi.org/10.1167/iovs.04-0145

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S., Villano, J.L., 2014. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. 23, 1985–1996. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., 1998. Direct Association of the Gap Junction Protein Connexin-43 with ZO-1 in Cardiac Myocytes. J. Biol. Chem. 273, 12725–12731. https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12725

Trosko, J.E., 2001. Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? Mol. Carcinog. 30, 131–137.

U

Uzu, M., Sin, W., Shimizu, A., Sato, H., 2018. Conflicting Roles of Connexin43 in Tumor Invasion and Growth in the Central Nervous System. Int. J. Mol. Sci. 19, 1159. https://doi.org/10.3390/ijms19041159

V

Vaiserman, A., 2014. Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? Aging Dis. 5, 419–429. https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500419

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., Olson, J.J., 2010. Exciting New Advances in Neuro-Oncology. CA. Cancer J. Clin. 60, 166–193. https://doi.org/10.3322/caac.20069

Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. Endocr. Rev. 33, 378–455. https://doi.org/10.1210/er.2011-1050

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M., 2009. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. Endocr. Rev. 30, 75–95. https://doi.org/10.1210/er.2008-0021

Veiseh, O., Kievit, F., Ellenbogen, R.G., Zhang, M., 2011. Cancer Cell Invasion: Treatment and Monitoring Opportunities in Nanomedicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 63, 582–596. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.010

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabrie, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N., 2010. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. Cancer Cell 17, 98. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., Dekant, W., 2002. Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. Chem. Res. Toxicol. 15, 1281–1287. https://doi.org/10.1021/tx025548t

W

Wang, D., Anderson, J.C., Gladson, C.L., 2005. The Role of the Extracellular Matrix in Angiogenesis in Malignant Glioma Tumors. Brain Pathol. 15, 318–326. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00117.x

Wei, C.-J., Xu, X., Lo, C.W., 2004a. CONNEXINS AND CELL SIGNALING IN DEVELOPMENT AND DISEASE. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 811–838. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144309

Wei, C.-J., Xu, X., Lo, C.W., 2004b. CONNEXINS AND CELL SIGNALING IN DEVELOPMENT AND DISEASE. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 811–838. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144309

Weidmann, S., 1952. The electrical constants of Purkinje fibres. J. Physiol. 118, 348–360. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004799

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reprod. Toxicol. 24, 178–198. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010

White, T.W., Bruzzone, R., Paul, D.L., 1995. The connexin family of intercellular channel forming proteins. Kidney Int. 48, 1148–1157.

White, T.W., Paul, D.L., 1999. GENETIC DISEASES AND GENE KNOCKOUTS REVEAL DIVERSE CONNEXIN FUNCTIONS. Annu. Rev. Physiol. 61, 283–310. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.283

Wild, C.P., 2012. The exposome: from concept to utility. Int. J. Epidemiol. 41, 24–32. https://doi.org/10.1093/ije/dyr236

Wild, C.P., 2005. Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14, 1847–1850. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G., 2002. Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. Biol. Chem. 383. https://doi.org/10.1515/bc.2002.076

Wu, J.-C., Tsai, R.-Y., Chung, T.-H., 2003. Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. J. Cell. Biochem. 88, 823–835. https://doi.org/10.1002/jcb.10390

Wu, J.-I., Wang, L.-H., 2019. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. J. Biomed. Sci. 26, 8. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0497-x

Y

Yamasaki, H., 1991. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 93, 191–197.

Yeager, M., Nicholson, B.J., 1996. Structure of gap junction intercellular channels. Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 183–192.

Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2012. Cancer Stem Cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 2144–2151. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022

Z

Zhang, Q., Wu, S., Liu, L., Hou, X., Jiang, J., Wei, X., Hao, W., 2019. Effects of bisphenol A on gap junctions in HaCaT cells as mediated by the estrogen receptor pathway. J. Appl. Toxicol. 39, 271–281. https://doi.org/10.1002/jat.3717

Zhang, Y.W., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K.W., Murota, S., 2001. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. Oncogene 20, 4138–4149. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204563