Université de Poitiers :

UFR sciences fondamentales et appliquées

<u>Thèse</u>

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Poitiers

(diplôme national - arrêté du 7 août 2006)

Ecole doctorale d'Ingénierie chimique biologique et géologique (I.C.B.G.) secteur de recherche : Biologie, Médecine, Santé, spécialité Physiologie

présentée par

Sophie CRESPIN

Implications de Cx43 dans les tumeurs gliales humaines : Approches *in situ* et *in vitro*

sous la direction du Professeur Marc MESNIL

Soutenue publiquement le 2 Juillet 2008 devant la commission d'examen

<u>Jury</u>

Pr Jérôme Honnorat	Directeur de recherche, Rapporteur			
	INSERM			
Dr Christian Giaume	Directeur de recherche,	Rapporteur		
	Collège de France			
Dr Guy Raymond	Directeur de recherche,	Examinateur		
	CNRS			
Pr Christian Naus	Head of department,	Examinateur		
	University of British Columbia			
Pr Marc Mesnil	Professeur,	Examinateur		
	Université de Poitiers			

Implications de Cx43 dans les tumeurs gliales humaines : Approches *in situ* et *in vitro*

La communication intercellulaire par les jonctions *gap* (CIJG) a été proposée comme l'un des éléments impliqués dans la cancérogenèse très rapidement après sa mise en évidence, dans les années 1960. Ainsi l'induction de l'expression de connexines, motif structural de base de la CIJG, a été décrite comme étant capable de « normaliser » le phénotype de cellules cancéreuses.

Notre étude de la connexine 43 (Cx43), par *tissue micro array*, dans des tumeurs gliales humaines (59 échantillons) a montré une délocalisation et une perte de l'expression de la protéine. La situation s'avère complexe par l'hétérogénéité intratumorale; en effet, certaines cellules du tissu tumoral montrent un signal avec une localisation aberrante dans le cytoplasme ou dans le noyau.

Certains travaux ayant suggéré que Cx43 pourrait « normaliser » le phénotype tumoral par une action indépendante de la CIJG, Cx43 ou des formes tronquées de la protéine ont été exprimées par des vecteurs rétroviraux dans des lignées de tumeurs gliales humaines. Les résultats obtenus ont suggéré que l'expression de la protéine ne permettait pas de réduire le potentiel prolifératif des cellules tumorales lorsque celles-ci sont maintenues en monocouche. En revanche, la capacité des cellules à proliférer sans ancrage est réduite par l'expression de Cx43 mais aussi par des formes tronquées de la protéine ne permettant pas la CIJG. De plus, les cellules exprimant Cx43, entière ou tronquée, apparaissent douées d'une plus grande motilité.

En conclusion, Cx43 semble jouer un rôle complexe dans la progression des tumeurs gliales humaines, celle-ci apparaissant avec des localisations aberrantes dont l'effet demeure inconnu. L'expression de la Cx43 ne constituerait pas nécessairement un facteur de bon pronostic, car si les cellules montrent une diminution de leur prolifération dans un environnement défavorable, elles semblent, en revanche, plus aptes à migrer, ce qui permettrait l'invasion du tissu environnant.

Mots-clés :

Jonctions communicantes, connexines, tumeurs-classification, tumeurs-migration, gliome

Involvement of Cx43 in human gliomas: in situ and in vitro approaches

The possible involvement of Gap-Junctional Intercellular Communication (GJIC) in carcinogenesis has been hypothesized in the 1960s. Later, the expression of connexins, the molecular basis of GJIC, has been shown to "normalize" the phenotype of various tumor cells.

Our study, using the tissue micro array approach, was focused on connexin 43 (Cx43) expression in human gliomas (59 tumor samples). We showed that the expression of Cx43 protein was altered and, in several cases, especially in grade-IV gliomas, Cx43 was lost. Nonetheless, due to tumor heterogeneity, a complex pattern of expression was revealed: Cx43 exhibited aberrant staining, that means a translocation into the cytoplasm possibly in the nucleus.

Several works suggested that Cx43 could « normalize » tumor cells by a GJICindependent mechanism. We investigated the role played by Cx43 and different truncated forms of the protein, unable to restore GJIC, in human glioma cell lines. Our data showed that Cx43 expression did not induce any change on cell proliferation when cell lines were maintained in monolayer cultures. On the contrary, the cells trandusced by Cx43 constructs (full-length or truncated) grew less in soft agar assay. In parallel, it appeared that all the Cx43 constructs increased motility.

To conclude, Cx43 seems to play a complex role in human glioma progression. Its expression and localization are altered, but the underlying mechanisms remain unknown. Even if Cx43 seems to be altered in gliomas, a maintained expression of the protein could not be correlated with a good prognosis since their motility is increased by Cx43 expression.

Key-words:

gap junctions, connexins, tumor classification, tumor migration, gliomas.

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Unité Mixte de Recherche du CNRS et de l'Université de Poitiers. Je remercie ses deux directeurs successifs, le Docteur Guy Raymond et le Professeur Frédéric Becq, de m'avoir accueillie. Je remercie également le Docteur Guy Raymond d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Professeur Marc Mesnil, responsable de l'équipe Interaction et Communication Cellulaires (nouvellement nommée Physiopathologies de la Communication et de la Différenciation Cellulaires) d'avoir dirigé ce travail de recherche. Je vous remercie pour le soutien que vous m'avez apporté, avant même le commencement de cette thèse, dans la recherche de financements et pour mon inscription en thèse. Je vous remercie également d'avoir su trouver des créneaux dans votre emploi du temps très chargé pour développer ce sujet de thèse et discuter de ses orientations. Je vous suis reconnaissante de m'avoir laissé l'opportunité de développer une partie de ma thématique de recherche à Vancouver, au Canada.

Je remercie les membres des services de Neurochirurgie et d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers. Plus particulièrement, j'adresse mes sincères remerciements au Docteur Michel Wager, neurochirurgien, et aux Professeurs Gaëlle Fromont et Pierre-Marie Levillain, anatomo-pathologistes, pour avoir partagé avec moi une partie de leurs connaissances sur ces tumeurs si complexes que sont les tumeurs gliales.

I would like to thank Professor Christian Naus for allowing me to work in the Life Sciences Institute (University of British Columbia, Vancouver, Canada). This time spend in your laboratory was shared between experiments, numerous high-level conferences, lab meetings and journal clubs. I thank you for giving me this great opportunity to discover how the research works in Canada, in one of its more famous universities.

Je remercie le Docteur Christian Giaume et le Professeur Jérôme Honnorat d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux institutions et associations qui, à un moment ou un autre, ont financé ce travail de thèse, à savoir : l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (merci encore au professeur Honnorat d'avoir présenté mon projet auprès de l'association); l'Université de Colombie Britannique ; la Ligue contre le Cancer ; l'Université de Poitiers ; le Centre National de la Recherche Scientifique ; le Cancéropôle Grand-Ouest ; la Région Poitou-Charentes et le fonds Boehringer Ingelheim.

Sommaire

Introduction : cancer et connexines	
	améantagia tiggulaira
Contrôle de la croissance : Perte de la communication jo connexines dans les cellules cancéreuses	onctionnelle assurée par le
Quelques exemples de cancers où les connexines pourr	aient jouer un rôle
Les tumeurs gliales	
Généralités	
Caractérisation des tumeurs gliales	
A l'origine des tumeurs gliales	
Les connexines et la communication intercellulaire jon	ctionnelle
Les connexines, membres d'une famille multigénique	
Les connexines, éléments structurels des jonctions com	municantes
Distribution tissulaire des connexines	
Connexines et système nerveux central	
Pannexines et système nerveux central	
Objectifs de l'étude	
-	
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	
Etude <i>in situ</i>	
Sélection des échantillons et traitement initial	
Tissue micro-array	
Préparation des échantillons	
Immunchistophimia	
Immunohistochimie Observation des échantillons en microscopie	
Immunohistochimie Observation des échantillons en microscopie Western blot à partir d'échantillons congelés	
Immunohistochimie Observation des échantillons en microscopie Western blot à partir d'échantillons congelés Etude <i>in vitro</i>	

Chapitre 3: La connexine 43 présente une localisation a	aberrante
dans les tumeurs gliales humaines	112
Problématique	113

La connexine 43 présente des niveaux d'expression variables selon le grade	
tumoral mais aussi au sein d'un même grade	114
La connexine 43 présente une localisation nucléaire aberrante	118
Discussion	126

Chapitre 4: Mise en culture de tumeurs gliales humaines :	
Caractérisation pour Cx4313	30
Problématique	131
Expression de la Cx43 dans des tissus provenant de tumeurs gliales et dans les cultures cellulaires obtenues à partir de celles-ci	132
Discussion	136

Chapitre 5: Expression de formes tronquées de Cx43 dans des

lignées de gliomes humains 13	37
Problématique	138
Les différentes constructions de connexine 43	139
Caractérisation des lignées de tumeurs gliales étudiées	140
Caractérisation des lignées obtenues après expression de différentes constructions de Cx43	142
Lignée LN18	.142
Lignée U87 Lignée U251	.145 .145
L'expression de Cx43 ou de différentes formes tronquées de la protéine n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire	148
L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine conduit à une diminution de la capacité des cellules à proliférer sans ancrage	148
L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine induit une augmentation de la capacité à migrer des cellules LN18 et U87	150
Discussion	154
Chapitre 6: Discussion générale, perspectives et conclusions 15	57
Références bibliographiques16	51

Annexe	181
Annexe	18

Abréviations

ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AKT	Oncogène analogue viral de v-akt du thymome murin
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATP	Adénosine TriPhosphate
CBTRUS	Registre central des tumeurs du cerveau des Etats-Unis (Central Brain Tumor
	Registry of the United States)
cdc25A	cell division cycle 25 homolog A
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2
CDK4	Cycline-Dependent Kinase 4
CIP	Protéine interagissant avec Cx43 (Cx43 Interacting Protein)
Col I	Collagène de type I
c-src	c-sarcoma
Cx	Connexine
Cx43P3	forme hyperphosphorylée de la Cx43
CxRE	Elément de réponse aux connexines (Connexin response element)
сусВ	Cycline B
cycE	Cycline E
Cyr61/CCN1	Cystine rich protein
Dlgh1	discs large homolog 1
DMBT1	Delated in Malignant Brain Tumors 1
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFRvIII	Epithelial Growth Factor Receptor, type vIII
ERK	Extracellular Regulated MAP Kinase
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
GBM	Glioblastome multiforme
GBMO	Glioblastome multiforme avec contingent oligodendrocytaire
GFP	green fluorescent protein
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
HEK293	Human Epithelial Kidney 293
Her-2	Human Epidermal Growth factor Receptor 2
HSV-tk	Herpès Simplex Virus-thimidine kinase
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IGFRBP-4	Insulin-like Growth Receptor Binding Protein 4
IP3	Inisitol tri-Phosphate
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LOH	Perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity)

MAP kinase	Mitogen-Activated Protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEK	MAP kinase kinase
MFG-E8	Milk Fat Globule EGF factor 8
MMP	MétalloProtéase Matricielle / Matrix MetalloProtease
NAD ⁺	Nicotidamide Adénosine dinucléotide
NO	Oxyde nitrique (Nitric oxide)
Nov/CCN3	Nephroblastoma overexpressed
ODDD	Dysplasie oculo-dento-digitale (OculoDentoDigital Displasia)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Panx	Pannexine
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phospho Inositide Kinase 3
PKC	Protéine Kinase C
PTEN/MMAC	Phosphatase and TENsine homology / Mutated in Multiple Advanced Cancers
RB	protéine du Rétinoblastome
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results program
Shh	Sonic Hedgehog
skp2	S-phase Kinase-associated protein 2
SNC	Système Nerveux Central
TGFα	Transforming Growth factor α
Tr-Cx43	Truncated Connexin 43
Ub	Ubiquitination
UTR	Untranslated region
<i>Z</i> 0	Zonula occludens

Chapitre 1

Etat de l'art

Introduction : cancer et connexines	11
Rôle essentiel de la communication ionctionnelle dans l'homéostasie tissulaire	11
Contrôle de la croissance : Perte de la communication jonctionnelle assurée par les cor	nexines
dans les cellules cancéreuses	11
Quelques exemples de cancers où les connexines pourraient jouer un rôle	15
Les tumeurs gliales	17
Généralités	
Diagnostic	20
Epidémiologie. incidence. pronostic	20
Caractérisation des tumeurs gliales	
Classification des tumeurs gliales	24
Topographie	
A l'origine des tumeurs gliales	
Théorie de la dédifférenciation cellulaire	
Théorie des cellules souches cancéreuses	
Les connexines et la communication intercellulaire ionctionnelle	
Les connexines, membres d'une famille multigénique	
Historique et nomenclature	
Les membres de la famille	
Les nouveaux membres de la famille	
Les connexines, éléments structurels des jonctions communicantes	
Connexines, pannexines et canaux jonctionnels	
Structure de la plaque jonctionnelle	
Perméabilité sélective des canaux intercellulaires	
Les hémicanaux de connexines et de pannexines	
Régulation de l'état d'ouverture des canaux intercellulaires et des hémicanaux	
Trafficking et turn-over des connexines	
Regulation du trafficking et stabilite de la plaque jonctionnelle	
Distribution tissulaire des connexines	55
Fonctions des connexines	
Connexines, développement, différenciation et cicatrisation	
Connexines et cycle cellulaire	
Fonctions des connexines non associées à la formation d'un canal	
Connexines et système nerveux central	63
Distribution	
Fonctions physiologiques	
Alterations pathologiques	
Pannexines et systeme nerveux central	
Objectifs de l'étude	77

Introduction : cancer et connexines

Rôle essentiel de la communication jonctionnelle dans l'homéostasie tissulaire

Les premières pistes en faveur de l'existence d'une communication directe entre cellules en contact ont été proposées dans les années 1950-1960. En 1952, il est montré que certaines régions membranaires sont plus aptes que d'autres à propager des courants dans les fibres de Purkinje du cœur [Weidmann S, 1952]. Puis, la synapse électrique est identifiée dans le système nerveux [Furshpan EJ et Potter DD, 1959]. L'existence de *nexus* dans divers tissus excitables ou non est ensuite décrite, proposant que les cellules en contact soient capables d'échanger des signaux électriques et chimiques [Dewey MM et Barr L, 1964].

En 1966, Loewenstein définit la structure portant la communication jonctionnelle : « chaque unité jonctionnelle consiste en une paire d'éléments membranaires hautement perméables alignés au niveau de contacts cellulaires et d'un élément insulaire qui permet l'isolation vis-à-vis du milieu extracellulaire. L'agrégation de nombreuses unités jonctionnelles permet la communication intercellulaire. Les unités jonctionnelles ainsi formées laissent circuler des molécules hydrophiles directement entre l'intérieur de cellules en contact » [Loewenstein WR, 1966]. Cette hypothèse de structure est alors particulièrement originale car ne se basant pas sur le modèle d'un pont constitué par des éléments lipidiques de la membrane. La notion de canal membranaire constitué de protéines, confortant l'hypothèse de Loewenstein, ne sera proposé qu'en 1972 [Singer SJ et Nicholson GL, 1972].

La multiplication des modèles étudiés conduit à l'identification de jonctions communicantes dans la plupart des types cellulaires chez les Invertébrés comme chez les Vertébrés [Barbe MT *et al.*, 2006]. Il s'avère que ces structures permettent la propagation de potentiels d'action et l'échange de nombreuses molécules de poids moléculaire inférieur à 1000 Da directement entre les cellules en contact. Ces facteurs synchronisent des cellules couplées et transmettent des informations (probablement des molécules antimitotiques). Les connexines (Cx), support moléculaire de base de la communication jonctionnelle chez les Vertébrés, apparaissent ainsi comme l'un des éléments essentiels du maintien de l'homéostasie tissulaire [Loewenstein WR, 1979].



Figure 1 : Hypothèse de l'implication des jonctions communicantes dans le contrôle de la réplication cellulaire

L'hypothèse émise par W.R. Loewenstein suggère que la multiplication cellulaire serait contrôlée par la concentration intracellulaire d'un facteur de croissance cytoplasmique (cercle vert). **A**, **B**. La diffusion, par l'intermédiaire des jonctions communicantes, de ce facteur depuis la cellule émettrice rouge «R» vers les cellules voisines l'empêcherait d'atteindre, dans chacune des cellules, la concentration seuil nécessaire à l'induction de leur réplication : le nombre de cellules est ainsi identique en **A** et en **B**. De même, une cellule «R» (cellule rouge) serait capable de proliférer tant que le facteur de croissance qu'elle produit atteint une concentration seuil donnée dans le cytoplasme. Malgré la diffusion du facteur depuis la cellule mère «R» vers les cellules filles (cellules blanches), ces cellules seraient capables de proliférer tant que cette concentration demeure élevée. Le nombre de cellules passerait ainsi d'un stade **C** à un stade **D** pour atteindre un stade stationnaire **E** pour lequel la concentration intracellulaire du facteur de croissance est insuffisante, par effet de dilution, pour stimuler la prolifération de ce groupe de cellules.

D'après Mesnil M, 2004.

Contrôle de la croissance : Perte de la communication jonctionnelle assurée par les connexines dans les cellules cancéreuses

Alors même que Loewenstein décrit une structure hypothétique des jonctions communicantes, il propose déjà que celles-ci pourraient jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et par conséquent dans son dérèglement. Dans un modèle simplifié émis à partir de l'hypothèse de Loewenstein, les jonctions communicantes auraient la capacité de délimiter des territoires au sein desguels des signaux de régulation de la prolifération cellulaire pourraient diffuser à partir d'une cellule. La dilution de ces signaux empêcherait la réplication cellulaire, la concentration-seuil n'étant pas atteinte (Figure 1). Au contraire, les cellules tumorales auraient perdu cette capacité de communiquer ou ne pourraient communiquer qu'entre elles et ce dérèglement de l'homéostasie mènerait à une désynchronisation du comportement cellulaire et à une prolifération anarchique. Les preuves d'une absence de communication jonctionnelle dans les cellules tumorales ont été apportées par différentes études portant sur des échantillons tumoraux, des cultures primaires ou des lignées cellulaires. Ainsi, l'utilisation de traceurs fluorescents et la mesure de courant dans des tumeurs solides provenant de patients ou induites chez l'animal traduisaient une absence de communication jonctionnelle [Loewenstein WR et Kanno Y, 1966 ; Loewenstein WR et Kanno Y, 1967]. Dans des cultures primaires ou dans des lignées, les résultats étaient similaires [Borek C et al., 1972]. De plus, les lignées isolées sur des critères d'absence de communication jonctionnelle étaient celles identifiées comme étant cancéreuses [Azarnia R et al., 1974]. Il faut néanmoins noter que ces résultats expérimentaux étaient parfois contredits par d'autres, certaines lignées non cancéreuses étant parfois dénuées de communication jonctionnelle [Gilula NB et al., 1972], ce qui laissait présager que l'implication de la communication jonctionnelle dans le développement tumoral était plus complexe que le modèle décrit par Loewenstein.

Les études menées dans les décennies suivantes ont apporté des nouvelles informations relatives à la structure des jonctions communicantes, référençant ainsi vingt et une connexines différentes chez l'Homme. Il est également apparu que les canaux formés présentaient une perméabilité sélective en fonction de la nature des connexines les constituant et pouvaient être régulés par des partenaires protéiques, différents états de phosphorylation, ou certains ions. En outre, plus récemment, de nouvelles protéines constitutives, les pannexines, ont été identifiées chez les Vertébrés. Enfin, il s'est avéré que les connexines pourraient également jouer un rôle, indépendamment de la formation de canaux intercellulaires et de leur fonction de couplage [pour revue, Laird DW, 2006].



Figure 2 : Immunodétection de la Cx32 La Cx32 est détectée dans du foie normal (**A**), chez un patient atteint d'une hépatite (**B**) et dans un carcinome hépatique (**C et D**). La protéine, détectée au niveau de la membrane plasmique (**A**), est délocalisée (**D**) ou absente (**C**) dans le tissu cancéreux. D'après Nakashima Y et al., 2004.

Certains éléments ont parfois permis de mieux cerner des points restés inexplicables pour Loewenstein, alors que d'autres sont venus contredire sa théorie.

Quelques exemples de cancers où les connexines pourraient jouer un rôle

Afin de mieux comprendre le lien qui pouvait exister entre la communication jonctionnelle, l'expression des connexines et la progression tumorale, de nombreuses études ont été réalisées *in vitro*, sur des modèles animaux ou sur du tissu tumoral provenant de patients [*Tableau I*].

La perte de la communication jonctionnelle pourrait être un évènement précoce dans le développement tumoral. Ainsi, des régions hyperplasiques de l'endomètre présentent une diminution de l'expression des connexines 26 et 32 par rapport au tissu adjacent sain [Saito T et al., 1997; Saito T et al., 2001]. Un autre argument consiste en l'hyperméthylation des ilots CpG dans le promoteur de la Cx32 dans le tissu tumoral mais aussi dans le tissu apparaissant comme sain du rein de patient atteint de carcinomes rénaux. L'altération de l'expression de la Cx32 serait ainsi un pré-requis au développement tumoral [Yano T et al., 2004]. Il apparait que, lors de la progression tumorale, certaines connexines normalement exprimées par le tissu présentent des localisations aberrantes ou une perte d'expression. C'est le cas pour la Cx26 dont l'expression est perdue ou de la Cx32 devenue cytoplasmique dans les carcinomes hépatiques [Figure 2 ; Krutovskikh V et al., 1994]. Ce type d'observations va dans le sens d'un rôle potentiel de suppresseur de tumeur joué par les connexines. Mais un autre phénomène observé consiste en l'expression de nouvelles connexines normalement absentes dans le tissu non pathologique. Ainsi, la Cx43, non exprimée dans le foie dans des conditions normales, apparait dans certains cancers hépatiques [Wilgenbus KK et al., 1992; Oyamada M et al., 1990]. Cette nouvelle expression et sa localisation cytoplasmique ne coïncideraient pas pour autant avec une capacité à communiquer des cellules tumorales. C'est également le cas de la Cx26 dans certains cancers du sein. Celle-ci présenterait une expression augmentée mais délocalisée dans le cytoplasme pour 50% des cas, ne permettant donc pas la communication jonctionnelle [Jamieson S et al., 1998]. Une nouvelle question soulevée consiste alors à se demander dans quelle mesure la communication intercellulaire serait capable de contrôler la prolifération cellulaire. Dans ce contexte, l'expression de connexines spécifiques, leur localisation et leur rôle indépendamment de la communication jonctionnelle sont autant d'éléments à prendre en considération.

Dans le cadre de ce travail de thèse, notre attention s'est portée sur l'expression de la Cx43 dans des tumeurs gliales humaines. Les travaux réalisés jusqu'à présent ont essentiellement porté sur le niveau d'expression de la protéine, une perte de la Cx43 étant associée à des tumeurs malignes [Huang RP *et al.*, 1999 ; Soroceanu L *et al.*, 2001 ; Pu P *et al.*, 2004].

Organe/	Pathologie	Etude	CJ	Expression des Cx	Réf.
tissu				détectée en IHC ou ICC sauf mention contraire (entre parenthèse)	
Vessie	Cellules normales	LC	+ ^a	Cx26 et Cx43 (Northern)	[1]
				$Cx26 \uparrow dans les cultures confluentes (Northern)$	
	Tumeurs invasives	Tissu	NT	Cx26 diffuse : 22%	
		Tissu	NT	Cx26 hétérogène : 41%	
		Tissu	NT	Cx26 importante : 27%	
	Urothélium normal	Tissu	NT	Cx26 au niveau de la membrane basale	[2]
	Cancer	LC	-	Cx26 ↓ (ARNm)	
	Tumeurs non invasives	Tissu	NT	Expression diffuse de Cx26 : 28%	
		Tissu	NT	Perte hétérogène de l'expression de Cx26 : 44%	
		Tissu	NT	Perte importante de l'expression de Cx26 : 28%	
Cerveau	Epilepsie	СР	Forte ^b	Cx43 (intense)	[3]
	Astrocytomes de bas grade	СР	Modérée ^b	Cx43 (modérée)	
	Glioblastome multiforme	CP	Faible ^b	Cx43 \downarrow (faible expression)	
	Gliomes de bas grade (I et II)	Tissu	NT	Cx43 intense	[4][5]
	Gliomes de haut grade (III)	Tissu	NT	Cx43 faible	
	Gliomes de haut grade (IV)	Tissu	NT	Cx43 quasi-indétectable	
Sein	Normal	Tissu	NT	Cx26 (-)	[6]
				Cx43 dans les cellules myoépithéliales	
	Lésions bénignes	Tissu	NT	Cx43 dans les cellules myoépithéliales	
	Carcinomes ductales	Tissu	NT	Cx43 dans les cellules myoépithéliales	
	Carcinomes lobulaires	Tissu	NT	Cx26(-) Cx43(-)	
	Carcinomes mucoïdes	Tissu	NT	Cx43	
	Carcinomes invasifs	Tissu	NT	Cx26个(cytoplasmique hétérogène 56%)	
				Cx43 (dans les cellules stromales 100% ; expression	
				hétérogène et localisation intracellulaire dans les cellules	
				tumorales 52%)	[7]
	Normai	Tissu	NI	Cx43 (+)	[/]
	Carcinomes ductales infiltres	lissu	NI	Cx43 (-)	
	Carsinamos infiltrós ou non	Ticcu	NT	C_{1}	
	Carcinomes	lissu		Cx43 (-)	
Colutórin	Normal	Ticcu	NT		[9]
coruterin		Tissu	NT		[0]
Endomàtro	Normal	Tissu		Cx26 at Cx22	[0][10]
Lindometre	Hyperplasie	Tissu	NT	Cv26 et Cv22 faible ou négatif dans 72 à 80% des cas :	[9][10]
	пурегріазіе	TISSU	IN I	expression cytoplasmique dans 20 à 27% des cas : Cx43	
				faible	
	Cancer	Tissu	NT	Cx26 et Cx32 faible ou négatif dans 76 à 79% des cas,	
				diffus dans 15 à 18% des cas, normal dans 6% des cas ;	
				Cx43 faible	
Tête et	Carcinomes à cellules	CP	NT	Cx31.1↓ (microarray)	[11]
cou	squameuses				
Larynx	Normal	Tissu	NT	Cx26, Cx30, Cx43	[12]
	Carcinomes à cellules	Tissu	NT	Cx26, Cx32, Cx43 expression hétérogène	
	squameuses		c		[40]
Fole	Normal	lissu	+	Cx32(+) Cx26(+) Cx43(-)	[13]
	Carcinome hépatocellulaire	Tissu	\downarrow	Cx32 cytoplasmique, Cx26 \downarrow , Cx43 \uparrow cytoplasmique	[13][14]
Boumon	Normal	Ticcu	NT	$(\gamma \lambda 2 (1) (\gamma 2 2 (1) (\gamma 2 6 (1)))$	[13]
Poumon		Tissu		$C_{x43}(+) C_{x23}(-) C_{x20}(-)$	[14]
	Normal	CD	, d		[16]
	Carcinome		.L.d		[10]
		Ticcu	NT NT	(x+3)	[25]
	cellules	lissu	INT	Cx43\(Cx52(-)	[33]
		CP	Absente		
		10	Absente		
Œsophage	Normal	Tissu	NT	Cx26 Cx43	[14][18]
					[19]
	Carcinome à cellules	Tissu	NT	Cx26↓ Cx43↓	[14]
	squameuses				
Ovaire	Normal	СР	Forted	Cx43 (Cx26, Cx32, Cx37 et Cx40 non détectées)	[20]
		Tissu	NT	Cx43 cytoplasmique et ponctiforme	[20][21]
				Cx26 (-) Cx32 (-)	
	Adénocarcinomes	LC	Absente ou	Cx43 absente	[21]
			faible ^d	Cx43 (Northern et western, ICC 59%)	
	Adénocarcinomes ovariens	Tissu	NT	ARNm Cx43个	[22]
	endometrioides	T :-	N:	0.42 1 (400([20][21]
	Cystadenocarcinomes sereux	TISSU	NI	$Cx43 \sqrt{19\%}$ positif) $Cx32(-)$ $Cx26(-)$	[20][21]
Prostate	Normai	lissu	IN I	LX20(-) LX32(-) LX43(+)	[14]

	Tumeurs bénignes	Tissu	NT	Cx26(NT) Cx32(NT) Cx43(+)	[22]
	Cancer	Tissu	NT	Cx26(NT) Cx32(NT) Cx43↓	[23]
	Normal	Tissu	NT	Cx32 aux contacts intercellulaires	[24]
	Tumeurs	Tissu	NT	Cx32 et Cx43 aux contacts intercellulaires (tumeurs différenciées), cytoplasmique et perte d'expression (tumeurs indifférenciées)	
	Normal	Tissu	NT	Cx43 pole basal ; Cx32 pole apical	[25][26]
	Hyperplasie prostatique bénigne	Tissu		Cx32↑ Cx43↑	
	Cancer	Tissu	NT	Cx43(-) 65% ; Cx32(-) 38% ; Cx43(-) Cx32(-) 28%	
	Tumeurs peu différenciées			Cx43(-) 90% ; Cx32(-) 60%	
	Normal	LC	+ ^d	ARNm pour Cx32 et Cx40	[27]
	Tumeurs malignes	LC	_ a,b	Cx43	
	Non-tumorigéniques	LC	_a,b	Cx43	[28]
	Tumeurs malignes	LC	_d	Cx43	
	Normal	СР	+ ^d	Cx43	[29]
	Tumeurs	LC	+ ^d	Cx43↓ (modification post-traductionnelle)	
Peau	Normal	Tissu	NT	Cx43	[30]
	Carcinome des cellules basales	Tissu	NT	Cx43↓(microscopie électronique)	
	Carcinome à cellules squameuses				
	Carcinome des cellules basales	Tissu	NT	Cx43↓ Cx26↑ à la périphérie de la tumeur	
Testicule		Tissu	NT	Cx43 Cx26(-)	[31]
	Infiltré par un carcinome	Tissu	NT	Cx43(-)	
	Infiltré par un séminome	Tissu	NT	Cx26 cytoplasmique	
Thyroïde	Normale	Tissu	NT	JG (freeze-fracture)	[32]
	Adénome oncocytique	Tissu	NT	Pas de JG	
	Carcinome oncocytique	Tissu	NT	Pas de JG	
	Carcinome papillaire	Tissu	NT	JG (freeze-fracture)	

Tableau I : Expression et fonction des connexines dans des échantillons humains sains ou tumoraux

^aCJ testée en scrape loading. ; ^bCJ testée en FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ; ^cTest de communication réalisé avec du Jaune de Lucifer sur des exérèses chirurgicales ; ^dMicroinjection de Jaune de Lucifer ; ^eEstimation de la CJ par électroporation.

CJ = Communication Jonctionnelle ; NT = non testé ; IHC = Immunohistochimie ; ICC = Immunocytochimie ; LC = Lignées cellulaires ; CP = Cultures Primaires.

[1] Grossman HB et al. (1994); [2] Gee J et al. (2003); [3] Soroceanu L et al. (2001); [4] Huang RP et al. (1999); [5] Pu P et al. (2004); [6] Jamieson S et al. (1998); [7] Laird DW et al. (1999); [8] King TJ et al. (2000); [9] Saito T et al. (2004); [10] Saito T et al. (2001); [11] Al Moustafa AE et al. (2002); [12] Schneider B et al. (2002); [13] Krutovskikh V et al. (1994); [14] Wilgenbus KK et al. (1992); [15] Oyamada M et al. (1990); [16] Cesen-Cummings K et al. (1998); [17] Tomai E et al. (1999); [18] Loncarek J et al. (2003); [19] Oyamada Y et al. (1994); [20] Hanna EA et al. (1999); [21] Umhauer S et al. (2000); [22] Zhai Y et al. (2002); [23] Tsai H et al. (1996); [24] Mehta PP et al. (1999); [25] Habermann H et al. (2001); [26] Habermann H et al. (2002); [27] Mehta PP et al. (2002); [32] Cochand-Priollet B et al. (1998). Modifié d'après Mesnil et al., 2005.



Figure 3 : Approche multidisciplinaire conduisant au diagnostic d'une tumeur cérébrale Certains signes cliniques caractéristiques, associés à des données d'imagerie (1, IRM), peuvent conduire à une

Certains signes cliniques caractéristiques, associés à des données d'imagerie (1, IRM), peuvent conduire à une intervention chirurgicale pour biopsie ou exérèse. L'analyse des tissus prélevés consiste en une approche histologique (2) et en l'utilisation de certains marqueurs cellulaires (3, GFAP).

Images pour un oligodendrogliome de grade III provenant de Daumas-Duport et al., 1997.

Les tumeurs gliales

Généralités

Par leur localisation et les complications qu'elles engendrent, les tumeurs du système nerveux central et tout particulièrement les tumeurs cérébrales sont souvent d'issue fatale.

Parmi celles-ci, les tumeurs gliales, ou gliomes, sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Ce sont des tumeurs issues du parenchyme cérébral, contrairement à d'autres types tumoraux qui se développent en dehors du parenchyme pour ensuite l'envahir.

Diagnostic

L'établissement d'un diagnostic pour une tumeur cérébrale fait appel à une approche multidisciplinaire (*Figure 3*). Les signes cliniques laissant supposer l'existence d'une tumeur cérébrale sont le plus souvent des crises d'épilepsie, une augmentation de la pression intracrânienne, des déficits neurologiques ou des troubles cognitifs [Behin A *et al.*, 2003]. Ces symptômes sont souvent la résultante du développement d'une masse tumorale qui compriment les structures avoisinantes ou d'une infiltration du tissu sain par les cellules tumorales. Néanmoins, ces signes cliniques ne sont pas suffisants pour établir un diagnostic précis. Aussi, le recours à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est très largement répandu. Cette approche permet de mieux cerner le site de la tumeur potentielle et de distinguer les lésions néoplasiques. Si l'hypothèse d'une tumeur est retenue, un examen anatomopathologique est réalisé sous la forme d'une biopsie et/ou d'une exérèse chirurgicale. Cette approche histologique viendra alors en complément des données de l'imagerie pour tenter d'établir un pronostic et une piste thérapeutique.

Epidémiologie, incidence, pronostic

Les études les plus étendues portant sur les tumeurs du système nerveux central ont été réalisées à différentes périodes aux Etats-Unis par la Clinique Mayo, la *American Society of Cancer*, [DeAngelis LM, 2001] et le *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS). La première étude consistait en une approche rétrospective des cas de tumeurs cérébrales entre 1950 et 1989. Les travaux du CBTRUS font la synthèse des résultats collectés à travers dix-neuf états américains entre 1998 et 2002. D'après ces

Age	Tumeur la plus répandue	Deuxième type de tumeur le plus répandu
0-4	Médulloblastome	Astrocytome pilocytique
5-14	Astrocytome pilocytique	Médulloblastome
15-19	Astrocytome pilocytique	Tumeur de l'hypophyse
35-44	Méningiome	Tumeur de la gaine nerveuse
45-85+	Méningiome	Glioblastome

 Tableau II : Tumeurs du système nerveux central les plus répandues aux Etats-Unis, selon

 les classes d'âge, CBTRUS 1998-2002

 Modifié d'après <u>www.cbtrus.org/reports</u>.



Figure 4 : Incidence des tumeurs du système nerveux central selon les classes d'âge aux Etats-Unis, CBTRUS 1998-2002 Modifié d'après <u>www.cbtrus.org/reports</u>.

données, l'incidence¹ des tumeurs du système nerveux central a ainsi été estimée à 14,8 pour 100 000 par an avec une répartition égale entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes [CBTRUS : *Primary Brain tumors in the United States, statistical report, 2005-2006*]. L'incidence des tumeurs primitives malignes du cerveau (en excluant les lymphomes, les leucémies, les tumeurs de la glande pinéale et du bulbe olfactif) est de l'ordre de 6,4 pour 100 000 par an d'après les données récoltées par le *Surveillance, Epidemiology, and End Results program* (SEER). La prévalence² des tumeurs du système nerveux central est estimée à 130,8 pour 100 000 pour les tumeurs bénignes ayant une prévalence de 97,5 pour 100000 contre 29,5 pour 100 000 pour les tumeurs malignes et 3,8 pour 100 000 pour les tumeurs d'évolution incertaine.

Les tumeurs malignes du système nerveux central ont été la cause de 12 760 décès aux Etats-Unis en 2005. La survie, cinq ans après le diagnostic, est variable en fonction de l'âge auquel est fait le diagnostic. Ainsi, le *SEER program* a déterminé pour l'ensemble des tumeurs du système nerveux central un pourcentage de survie à cinq ans de 64,8% pour les 0-19 ans, 47,9% pour les 20-44 ans, 23,1% pour les 45-54 ans, ce pourcentage descendant rapidement en-dessous de 10% pour les patients de 55 ans et plus. Ce pronostic pourrait être associé aux types de tumeurs développées selon les différentes classes d'âge (*Tableau II* et *Figure 4*].

En France, il n'existe pas encore de registre équivalent au CBTRUS. Une étude publiée en 2007, et portant sur des données recueillies entre 2004 et 2006, constitue les prémices de l'établissement d'un registre français [Bauchet L *et al.*, 2007]. L'incidence des tumeurs du cerveau en France serait ainsi de 14,3 pour 100 000, ce qui rejoint les données américaines.

¹ Incidence : nombre de nouveaux cas diagnostiqués.

² Prévalence : nombre de cas répertoriés de la maladie à un moment donné et sur une période de temps définie.

Tumeur du tissu neuroépithélial				
Tumeurs astrocytaires				
Astrocytome diffus				
Astrocytome fibrillaire				
Astrocytome protoplasmique				
Astrocytome gémistocytique				
Astrocytome anaplasique				
Glioblastome				
Glioblastome à cellules géantes				
Gliosarcome				
Astrocytome pilocytique				
Xanthoastrocytome pléomorphique				
Astrocytome subépendymaire à cellules				
géantes				
Tumeurs oligodendrogliales				
Oligodendrogliome				
Oligodendrogliome anaplasique				
Gliomes mixtes				
Oligoastrocytome				
Oligoastrocytome anaplasique				
Tumeurs épendymaires				
Ependymome				
Ependymome anaplasique				
Ependymome mixopapillaire				
Subépendymome				
Tumeurs des plexus choroïdes				
Papillome des plexus choroïdes				
Carcinome des plexus choroïdes				
Tumeurs gliales d'origine incertaine				
Astroblastome				
Gliomatesis cerebri				
Gliome choroïde du Ill ^{ème} ventricule				
Tumeurs neuronales et neurogliales				
Gangliocytome				
Gangliocytome dysplasique du cervelet				
Astrocytome/gangliogliome desmoplasique				
infantile				
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique				
Gangliogliome anaplasique				
Neurocytome central				
Liponeurocytome cérébelleux				
Paragangliome				

Tumeurs neuroblastiques Neuroblastome olfactif Neuroépithéliome olfactif Tumeurs du parenchyme pinéal Pinéocytome Pinéoblastome Tumeurs embryonnaires Médulloépithéliome Ependymoblastome Médulloblastome Tumeur neuroectodermique supratentorielle primitive Neuroblastome Ganglioneuroblastome

Tumeurs des nerfs périphériques Schwannomes Périneuriomes Tumeurs malignes de la gaine nerveuse périphérique

Tumeurs des méninges

Tumeurs des cellules méningiothéliales ou méningiomes Tumeurs mésenchymateuses non méningothéliales Lésions mélanocytiques primaires Tumeurs d'histogenèse incertaine

Lymphomes et néoplasmes hématopoïétiques

Tumeurs des cellules germinales

Germinome Carcinome embryonnaire Choriosarcome Tératome

Tumeur de la région sellaire

Crâniopharyngiome Tumeurs des cellules granulaires

Métastases

 Tableau III : Classification des tumeurs cérébrales, Organisation Mondiale de la Santé

 2000

 2000

Simplifiée d'après Kleihues P et Cavanee WK, 2000.

Caractérisation des tumeurs gliales

La caractérisation des tumeurs cérébrales repose, à la fois, sur des critères histologiques et sur leur topographie [Philippon J, 2004].

Classification des tumeurs gliales

En 1926, Cushing et Bailey publient la première classification des tumeurs cérébrales. Celle-ci repose sur la théorie des restes embryonnaires : les tumeurs auraient pour origine des cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement [Bailey P et Cushing H, 1926]. Cette première classification introduit le concept d'histopronostic, où l'état plus différencié des tumeurs est associé à une meilleure survie des patients.

En 1949, Kernohan est à l'origine de la théorie de l'anaplasie des tumeurs cérébrales [Kernohan JW *et al.*, 1949]. La tumeur proviendrait alors de la dédifférenciation de cellules normales du cerveau. Il divise ainsi les tumeurs en différents grades (notion de *grading*) représentatif de la malignité tumorale. Ce *grading* repose sur l'observation de critères tels que le nombre de mitoses, le pourcentage de cellules indifférenciées, l'étendue de la nécrose, l'importance de la prolifération vasculaire et le degré de polymorphisme.

Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé

Bien que contradictoires, ces deux théories ont servi de base à l'établissement de la classification des tumeurs cérébrales par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ainsi, la première classification de l'OMS, en 1979, hérite de la valeur histopronostique conférée à chaque type histologique (Cushing et Bailey) et de celle associée à l'anaplasie (Kernohan). Les classifications suivantes de l'OMS (1993, 2000 et 2007) ont permis une actualisation et parfois la définition de nouveaux types tumoraux. La classification qui a été utilisée au cours de ce travail de thèse est la classification publiée en 2000 [*Tableau III*, Kleihues P et Cavanee WK, 2000]. D'après cette classification, on distingue les tumeurs des tissus neuroépithéliaux, les tumeurs des nerfs périphériques, les tumeurs des méninges, les lymphomes et néoplasmes hématopoïétiques, les tumeurs des cellules germinales, les tumeurs de la région sellaire et les métastases.

Parmi les tumeurs des tissus neuroépithéliaux, tumeurs les plus fréquentes (*Figure 5*), on distingue différents types de tumeurs en fonction du type cellulaire d'origine supposé. Les tumeurs neuronales dériveraient des neurones, les tumeurs



Figure 5 : Répartition des tumeurs du système nerveux central en fonction du diagnostic histologique aux Etats-Unis, CBTRUS 1998-2002 Modifié d'après www.cbtrus.org/reports.

Astrocytomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes diffus de grade II : - Fibrillaires - Gémistocytiques - Protoplasmiques (rare)	Haut degré de différenciation	Modérée	Occasionnelles	Absente ou 1 mitose	Absente	Absente
Astrocytomes anaplasiques de grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée diffusément ou focalement	Présentes	Présente	Absente	Absente
Glioblastome de grade IV	Faible	Elevée	Marquées	Marquée	Présente	Présente

Tableau IV : Astrocytomes diffus, classification de l'OMS D'après Kleihues P et Cavanee WK, 2000.

Oligodendrogliome s et gliomes	Différenciatio n	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifératio n vasculaire
Oligodendrogliomes de grade II	Bien différencié	Modérée	Possiblement marquées	Absente ou occasionnelle	Absente ou peu conséquent e	Non proéminente
Oligo-astrocytomes de grade II	Bien différencié	Faible ou modérée	?	Absente ou faible	Absente	Absente
Oligodendrogliomes anaplasique de grade III	Anaplasie focale ou diffuse	Eventuellemen t augmentée	Eventuellemen t marquées	Eventuellemen t forte	Possible	Possible
Oligo-astrocytomes anaplasique de grade III	?	Eventuellemen t forte	Eventuellemen t présentes	Eventuellemen t forte	Possible	Possible

Tableau V : Oligodendrogliomes et gliomes mixtes, classification de l'OMSD'après Kleihues P et Cavanee WK, 2000.

neuroblastiques d'un précurseur neuronal, et les tumeurs gliales dériveraient d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. Les tumeurs mixtes présentent plusieurs composantes tumorales qui pourraient provenir à la fois d'un contingent astrocytaire et oligodendrocytaire (oligoastrocytome) ou d'un contingent neuronal et glial (gangliogliome).

Dans le cadre de ce travail, l'étude s'est bornée aux tumeurs gliales définies selon les critères histologiques de l'OMS. En effet, il est connu que cette classification est peu reproductible du fait de la difficulté de distinguer la nature des cellules tumorales par absence de marqueur fiable et qu'elle ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale [Figarella-Branger D et Bouvier C, 2005]. Néanmoins, la classification de l'OMS est la seule référence internationale permettant de comparer les résultats obtenus entre différents centres de recherche.

Les tumeurs gliales sont classées en quatre grades d'après la classification de l'OMS (*Tableau IV* et *Tableau V*). Le grade I correspond à l'astrocytome pilocytique. Il s'agit d'une tumeur pédiatrique relativement bien circonscrite localisée dans 85% des cas dans le cervelet. Le grade II correspond aux tumeurs astrocytaires diffuses, aux oligodendrogliomes et aux oligoastrocytomes sans prolifération anaplasique. Le grade III est associé aux tumeurs astrocytaires diffuses, aux oligoastrocytomes avec prolifération anaplasique. Le grade IV est caractéristique du glioblastome.

Classification de l'hôpital Sainte-Anne

La classification de l'hôpital Sainte-Anne découle pour l'essentiel de l'études de biopsies étagées stéréotaxiques corrélées à l'imagerie. Ces travaux ont permis de définir la structure spatiale des gliomes (infiltrants purs, solides purs ou mixtes), de préciser le mode de croissance des gliomes et de redéfinir les critères diagnostiques des oligodendrogliomes. Par ailleurs, la corrélation entre histologie et imagerie permet d'apprécier la représentativité des prélèvements [Daumas-Duport C *et al.*, 1997a,b].

La classification de l'hôpital Sainte-Anne distingue trois catégories parmi les gliomes infiltrants : les oligo-dendrogliomes ou oligo-astrocytomes de grade A ou B et les glioblastomes. Les oligodendrogliomes peuvent être purement infiltrants ou de structure mixte. Dans le cas de forme infiltrante pure, le diagnostic peut s'avérer difficile pour les tumeurs localisées au niveau de la substance blanche du fait de l'induction d'une gliose astrocytaire. Pour cette raison, selon les critères de l'OMS, ces tumeurs sont alors considérées comme des astrocytomes.



Figure 6 : Repères anatomiques permettant la détermination de la localisation des tumeurs cérébrales

La faux du cerveau est une cloison médio-sagittale séparant les deux hémisphères cérébraux. Elle est située dans la scissure interhémisphérique. La tente du cervelet est une cloison transversale séparant le volume intracrânien en deux étages supra-tentoriel et sous-tentoriel. D'après www-c.inria.fr.





Modifié d'après www.cbtrus.org/reports.

Le grading des oligodendrogliomes selon l'hôpital Sainte-Anne est mixte puisqu'il combine histologie et neuroradiologie. Il repose sur deux critères : l'hyperplasie des cellules endothéliales et la prise de contraste en imagerie. Le grade A est caractérisé par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste. La survie médiane est alors estimée à 11 ans. Le grade B comporte une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste. La survie médiane est alors de 3,5 ans.

Les problèmes posés par la classification de l'hôpital Sainte-Anne relèvent principalement de son incompatibilité avec la classification de l'OMS pour certaines tumeurs et de sa non-reconnaissance par la communauté scientifique internationale. Ainsi, lors de l'étude en parallèle du *CBTRUS report* et de l'étude de Bauchet *et al.*, une différence notable est observée quant à l'incidence des oligodendrogliomes (4% d'après le registre américain contre 21,2% pour l'étude française) du fait de l'utilisation plus répandue de la classification de l'hôpital Sainte-Anne par les anatomopathologistes français.

Topographie

La prise en compte de la localisation des tumeurs cérébrales s'avère elle aussi importante pour l'établissement du diagnostic et du pronostic [Philippon J, 2004]. On distingue principalement les tumeurs supra-tentorielles des tumeurs infra-tentorielles (*Figure 6*). Les tumeurs supra-tentorielles, situées au-dessus de la tente du cervelet, correspondent aux tumeurs des lobes cérébraux, aux tumeurs hémisphériques profondes (tumeurs du centre ovale, des noyaux gris centraux ou des ventricules latéraux) au aux tumeurs hémisphériques médianes (tumeurs du corps calleux, de la région sellaire, du III^{ème} ventricule et de la région pinéale). Les tumeurs infra-tentorielles sont des tumeurs de la ligne médiane (tumeur du vermis ou du IV^{ème} ventricule), des lobes cérébelleux, du tronc cérébral et des tumeurs extra-axiales antérieures ou latérales.

Certaines tumeurs se situent en-dehors des régions supra-tentorielle et infratentorielle. Il s'agit des tumeurs du foramen ovale, à cheval entre l'étage supra-tentoriel et la fosse postérieure et des tumeurs du trou-occipital qui siègent entre la fosse postérieure et le canal rachidien. Il convient également de distinguer les tumeurs intraparenchymateuses, qui se développent au sein du névraxe, des tumeurs extraparenchymateuses qui se développent à partir de régions particulières (organes intracrâniens, méninges). Il existe ainsi une corrélation étroite entre le siège de développement de la tumeur et l'histologie qui y est associée. Pour exemple, les



Figure 8 : Les six étapes fondamentales de la cancérogenèse selon Hanahan et Weinberg Modifié d'après Hanahan D et Weinberg RA, 2000.

tumeurs gliales se développeront principalement dans la région supra-tentorielle, au niveau du lobe frontal ou du lobe temporal dans 44% des cas (*Figure 7*).

A l'origine des tumeurs gliales

Le développement des tumeurs gliales devrait pouvoir s'inscrire dans le développement d'autres types tumoraux tel que décrit par Hanahan et Weinberg [*Figure 8*, Hanahan D et Weinberg RA, 2000]. Ainsi, la carcinogenèse résulterait de l'acquisition par des cellules normales de six propriétés fondamentales : (1) l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, (2) l'insensibilité aux signaux inhibant la prolifération cellulaire, (3) la capacité de s'affranchir de l'apoptose, (4) un potentiel réplicatif illimité, (5) la capacité de stimuler l'angiogenèse, (6) la capacité d'envahir le tissu environnant et de métastaser. Il est toutefois notable, que si les tumeurs cérébrales sont généralement très invasives, elles présentent cette caractéristique particulière de ne pas ou peu métastaser au niveau somatique [Saad AG *et al.*, 2007].

Une fois ces considérations posées, le type cellulaire d'origine des tumeurs gliales reste encore controversé. En effet, si l'hypothèse dominante au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle était celle de la dédifférenciation de cellules normales (théorie de l'anaplasie défendue par Kernohan), de nouvelles études viennent rappeler la théorie des restes embryonnaires chère à Cushing et Bailey.

Théorie de la dédifférenciation cellulaire

D'après le modèle de la tumorigenèse décrit par Hanahan et Weinberg, le type cellulaire d'origine serait les cellules du tissu où se développe la tumeur. Les arguments plaidant en cette faveur ont été donnés par des analyses d'anatomopathologistes selon lesquelles, au sein d'un même organe où proliférait une tumeur, des phénotypes intermédiaires étaient visibles entre le phénotype normal des cellules du tissu et le phénotype tumoral. En outre, l'analyse du génome de cellules tumorales a montré différentes étapes de mutations. Dans le cadre des tumeurs gliales, une succession d'altérations génétiques statistiquement associées à leur progression vers des phénotypes malins a été proposé sans pour autant que la cause en soit identifiée [*Figure 9*, Kleihues P et Cavanee WK, 2000 ; Behin A *et al.*, 2003].

Dans les astrocytomes de bas grade, les altérations précoces concernent la surexpression de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et de son récepteur (PDGFR), ce qui conduit à une boucle autocrine de stimulation et à l'inactivation du



Figure 9 : Altérations génétiques impliquées dans la progression des gliomes

LOH = perte d'hétérozygotie ; GBM = Glioblastome multiforme ; GBMO = Glioblastome multiforme avec contingent oligodendrocytaire. En orange, les altérations génétiques du contrôle du cycle cellulaire. TP53 (p53) = mutation ; RB = mutation ; P16/CDKN2A = délétion homozygote ; CDK4 = amplification. En vert, les altérations génétiques affectant les voies de signalisation. EGFR = amplification ; PDGFR = surexpression ; PTEN = mutation. En bleu, les pertes d'hétérozygotie sur les chromosomes 1p/19q et 10q. D'après Behin A et al, 2003. gène codant p53. PDGFR est un récepteur tyrosine kinase dont l'activation conduit à l'induction de la prolifération cellulaire et probablement à la migration des gliomes. Dans la mesure où p53 a pour fonction d'arrêter le cycle cellulaire (en G1/S ou en G2/M), de réparer l'ADN, ou d'induire l'apoptose dans des circonstances définies, son inactivation risque de promouvoir des divisions anormales des cellules et faciliter ainsi la transformation anaplasique. Les astrocytomes malins secondaires sont le plus souvent observés chez des patients jeunes. En plus de mutations de p53, les cellules tumorales peuvent accumuler d'autres altérations génétiques en particulier de la voie de Rb (protéine du Rétinoblastome), comme des délétions de p16 ou l'amplification de CDK4 (*Cycline-Dependent Kinase 4*) conduisant ainsi à une absence de contrôle du passage G1/S.

Les astrocytomes malins primaires apparaissent généralement chez le patient âgé. Dans ces tumeurs, une amplification (40% des cas) et une surexpression (>50% des cas) du récepteur à l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) sont observées. De plus, le récepteur à l'EGF subit souvent des réarrangements conduisant à un récepteur constitutivement actif, EGFRvIII. Au contraire, les mutations de p53 sont rares. Il semble également que les glioblastomes multiformes soient capables d'une production endogène d'EGF et de TGF α (*Transforming Growth factor a*), favorisant ainsi une boucle autocrine de stimulation de la prolifération et de l'invasion.

Des pertes d'hétérozygotie touchant le bras long du chromosome 10 sont constatées dans 80 à 90% des glioblastomes. Plusieurs gènes candidats ont été identifiés dans cette région dont PTEN/MMAC (*Phosphatase and TENsine homology / Mutated in Multiple Advanced Cancers*) qui se retrouve muté dans 20 à 30% des tumeurs malignes et DMBT1 (*Delated in Malignant Brain Tumors 1*).

Dans les oligodendrogliomes, l'altération la plus souvent rencontrée est la perte des chromosomes 1p et 19q. Aucun gène n'a pour l'instant été associé à cette altération. Les tumeurs gliales mixtes peuvent présenter des altérations caractéristiques des tumeurs astrocytaires ou des tumeurs oligodendrocytaires, ce qui traduit la présence d'au moins deux contingents tumoraux différents.

Les mutations observées dans les tumeurs gliales ne sont pas caractéristiques de ce type de cancer, et jusqu'à présent aucun de ces éléments n'a permis l'établissement d'une classification moléculaire permettant de compléter les classifications basées sur l'histologie combinée ou non avec les données de l'imagerie.



Figure 10 : Théorie des cellules souches cancéreuses comme origine des tumeurs gliales Le schéma ci-dessus présente un parallèle entre le comportement normal des cellules souches neurales et celui des cellules souches cancéreuses. CSN = cellule souche neurale ; CSNT = cellule souche neurale tumorale.

Modifié d'après Singh SK et al., 2004.

Théorie des cellules souches cancéreuses

Chez le rat, l'origine subépendymaire des tumeurs gliales obtenues par injection transplacentaire de N-éthyl-N-nitrosourée avait été proposée dans les années 1970. Des populations de cellules « souches » pauvrement différenciées dans les zones de tumorigenèse et les lésions pré-malignes avaient également été décrites [Lantos PL et Pilkington GJ, 1979; Pilkington GJ et Lantos PL, 1979]. Depuis 2003, la perspective de l'identification du type cellulaire d'origine des tumeurs gliales chez l'Homme a focalisé l'attention sur les cellules souches dites cancéreuses [Singh SK, 2003]. D'autres publications ont rapidement suivi, relayant l'hypothèse que les tumeurs gliales pourraient émerger d'une population cellulaire peu différenciée telle que les cellules souches neurales ou certains précurseurs exprimant un margueur membranaire CD133 [Hemmati HD et al., 2003; Galli R et al., 2004; Singh SK et al., 2004b; Bao S et al., 2006, Pilkington GJ, 2005]. Ces cellules souches cancéreuses correspondraient à des cellules présentes dans la tumeur qui seraient douées d'auto-renouvellement et capables de produire l'ensemble des cellules constituant la masse tumorale [Figure 10, Clarke MF et al., 2006]. Plusieurs marqueurs de cellules souches ont été mis en évidence dans des tumeurs cérébrales pédiatriques [Hemmati HD et al., 2003]: CD133, Musashi-1, Sox2 (facteur de transcription précoce des cellules souches neurales) et Bmi-1 (gène impliqué dans l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches). Les voies de signalisation qui régulent l'auto-renouvellement des cellules souches pourraient être altérées dans les cellules souches cancéreuses. Il en résulterait alors une expansion continue de la population de cellules souches cancéreuses auto-renouvelées et la formation de tumeurs. Même si l'origine des tumeurs cérébrales reste à déterminer, certaines voies de signalisation sont communes aux tumeurs du système nerveux central et aux cellules souches neurales (Wnt et Shh dans les médullobastomes et les gliomes, PTEN dans les gliomes et peutêtre Notch [Reya T et al., 2001 ; Pardal R et al., 2003]. Les marqueurs antigéniques des cellules souches identifiés jusqu'à présents sont : (1) La nestine est exprimée dans les cellules indifférenciées du cerveau en développement. Après la naissance, il n'est présent qu'au niveau de la zone sous ventriculaire et de l'endothélium vasculaire. Il peut être retrouvé dans des cellules indifférenciées ou en prolifération dans les modèles de gliome induits par l'éthylnitrosourée [Jang T et al., 2008] et dans des tumeurs cérébrales pédiatriques [Almqvist PM et al., 2002]. (2) CD44 est exprimé par les astrocytes normaux, néoplasiques ou de la glie réactionnelle et surexprimée dans les tumeurs du système nerveux central. Une expression de CD44 corrélée à un niveau faible ou absent de CD24 constituerait un moyen de tri en cytométrie des cellules



Figure 11 : Modèle de la cancérogenèse (initiation, promotion et progression) appliquée aux cellules souches et implication des jonctions communicantes *Cx* = *Connexine* ; *CJ* = *Communication Jonctionnelle via les jonctions gap.*

Modifié d'après Trosko JE, 2007.

souches cancéreuses [Al-Hajj M et Clarke MF, 2004]. (3) CD133, initialement décrit comme margueur des cellules souches hématopoïétiques [Miraglia S et al., 1997]. Il s'agit également d'un marqueur des cellules souches neurales [Uchida N et al., 2000]. Des cellules CD133-positives, exprimant aussi la nestine, sont capables de générer des neurosphères en culture et de se différencier en cellules ayant le même phénotype que les cellules tumorales du patient. In vivo, des xénogreffes de cent cellules CD133positives induisent des tumeurs chez des souris immunodéprimées contrairement aux cellules CD133-négatives [Singh SK et al., 2003; Singh SK et al., 2004a]. Dans le développement du cancer exposé par Hanahan et Weinberg en 2000, les cellules souches n'apparaissaient pas comme étant une origine possible des cellules cancéreuses. Face aux six propriétés fondamentales qu'ils avaient décrites (indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, absence d'apoptose, potentiel réplicatif illimité, stimulation de l'angiogenèse, envahissement du tissu environnant et métastases), Trosko a repris la théorie des cellules souches [Market CL et al., 1968 ; Pierce GB et al., 1974 ; Potter VR et al., 1978] et a proposé un pré-requis aux mécanismes de la cancérogenèse décrite par Hanahan et Weinberg. En partant du fait que les cellules à l'origine du cancer pouvaient être des cellules souches pluripotentes ou leurs progéniteurs précoces, il considère que l'immortalité, la stimulation de l'angiogenèse et la capacité à migrer sont des propriétés intrinsèques des cellules souches et que, par conséquent, ce sont des propriétés qui n'auront pas besoin d'être acquises par la cellule cancéreuse initiale [Trosko JE, 2003]. Ainsi, les premières étapes du cancer consisteraient en l'échappement des cellules souches aux processus normal de différenciation. Les phases classiques d'initiation, de promotion et de progression sont respectées [Pitot HC et Dragan YP, 1991]. L'initiation serait alors une perte de la capacité des cellules à se diviser de façon asymétrique pour suivre des divisions symétriques. Lorsque, suite à des mécanismes épigénétiques, cette cellule souche capable de se diviser symétriquement ne percevrait plus les signaux inhibiteurs de la prolifération libérés par son environnement, la phase de promotion serait alors amorcée. Enfin, l'acquisition de mutations supplémentaires permettrait la progression tumorale. Un autre point commun entre les cellules souches et certaines cellules cancéreuses semble être l'absence de communication jonctionnelle. Ainsi, des cellules souches qui se seraient affranchies des facteurs extracellulaires inhibant la prolifération cellulaire seraient également insensibles à d'éventuels facteurs pouvant passer par la communication jonctionnelle [Trosko JE, 2007]. Selon cette hypothèse, les cellules cancéreuses exprimant des connexines pourraient provenir d'un processus de cancérisation survenu sur des progéniteurs ayant encore la capacité de proliférer (Figure 11).
Homme		Souris	
Protéine	Gène	Protéine	Gène
Cx43	GJA1	Cx43	Gjal
Cx46	GJA3	Cx43	Ğja3
Cx37	GJA4	Cx37	Ğja4
Cx40	GJA5	Cx40	Ğja5
	GJA6P	Cx33	Ğja6
Cx50	GJA8	Cx50	Ğja8
Cx59	GJA9 (GJA10)		U
Cx62	GJA10	Cx57	Gja10
Cx32	GJB1	Cx32	Gjb1
Cx26	GJB2	Cx26	Gjb2
Cx31	GJB3	Cx31	Gjb3
Cx30.3	GJB4	Cx30.3	Gjb4
Cx31.1	GJB5	Cx31.1	Gjb5
Cx30	GJB6	Cx30	Gjb6
Cx25	GJB7		
Cx45	GJC1 (GJA7)	Cx45	Gjc1 (Gja7)
Cx47	GJC2 (GJA12)	Cx47	Gjc2 (Gja12)
Cx30.2	GJC3 (GJE1)	Cx29	Gjc3 (Gje1)
	GJC3P1		
Cx36	GJD2 (GJA9)	Cx36	Gjd2 (Gja9)
Cx31.9	GJD3 (GJC1)	Cx30.2	Gjd3 (Gjc1)
Cx40.1	GJD4	Cx39	Gjd4
Cx23	GJE1	Cx23	Gje1

Tableau VI : Membres de la famille des connexines humaines et orthologues chez la souris

D'après la nouvelle classification proposée par le « Working Group on Connexin Gene Nomenclature », (coordonné par GM Kidder). Lorsqu'un changement est proposé par rapport à l'ancienne nomenclature, l'ancien nom du gène apparait entre parenthèses.

Les connexines et la communication intercellulaire jonctionnelle

La communication intercellulaire directe entre les cytoplasmes de cellules adjacentes est assurée par les jonctions communicantes. Ces structures, formées par l'agrégation de canaux transmembranaires, constituent la plaque jonctionnelle. Le motif de base structural des canaux est une protéine membranaire dont on distingue plusieurs types : les connexines [Laird DW, 2006].

Les connexines, membres d'une famille multigénique

Historique et nomenclature

La première séquence codante de connexine a été identifiée en 1986. Il s'agit alors de la séquence d'une connexine responsable de la communication jonctionnelle dans le foie murin [Kumar NM et Gilula NB, 1986] et humain [Paul DL *et al.*, 1986]. Rapidement, une autre connexine est isolée dans le cœur de rongeur [Beyer EC *et al.*, 1987] et une autre, différente de celle décrite antérieurement dans le foie [Zhang JT et Nicholson BJ; 1989]. Afin de distinguer ces différentes connexines, une nomenclature est proposée. Elle repose sur le poids moléculaire estimé de ces protéines. La première connexine identifiée dans le foie est alors nommée Connexine 32 (Cx32, 32kD) alors que la seconde est la Cx26 (26 kD). Quant à celle découverte dans le cœur, elle prend le nom de Cx43 (43 kD).

Une autre nomenclature, moins utilisée, est basée sur les homologies de séquence et d'organisation des gènes de connexines. Elle permet de distinguer trois groupes : α , β , δ et deux sous-groupes dont l'un constituerait une nouvelle classe [Eastman SD *et al.*, 2005]. La nouvelle version de cette nomenclature proposée par le *Working Group on Connexin Gene Nomenclature* tient compte de ces cinq groupes en distinguant les gènes GJ A, B, C, D et E (*Tableau VI*).

Les membres de la famille

La famille des connexines identifiées chez l'Homme est aujourd'hui constituée de vingt et un membres. Il semblerait que le nombre de connexines fonctionnelles chez les vertébrés soit de dix- neuf à vingt et un selon les espèces. L'identification de tous les génes orthologues³ agrandit considérablement la famille avec trois cent trois membres retrouvés dans des espèces aussi diverses que le chimpanzé, l'éléphant, l'opossum, le chien, le poulet, le xénope ou le poisson-zèbre [Cruciani V et Mikalsen SO, 2006].

³ Les orthologues sont des gènes considérés comme identiques mais retrouvés dans différentes espèces. Ils sont à distinguer des paralogues qui sont des gènes différents issues d'une famille de gènes dans une même espèce.



Figure 12 : Splicing alternatif de cinq gènes de connexines chez la souris Les structures présentées ont été obtenues en cartographiant les clones 5' du génome de souris par « Genomic BLAST ». Les exons sont représentés par des rectangles avec un numéro correspondant à l'exon 1, 2 ou 3 selon les gènes de connexine. Les séquences codantes apparaissent en gris foncé alors que les séquences non codantes sont en gris clair.

D'après Anderson CL, 2005.



Figure 13 : Analyse comparée de la topologie des connexines, des pannexines et des innexines

Exemple de la connexine 43 (Cx43) et la pannexine 1 (Panx1) identifiées chez le rat et de l'innexine 3 (INX3) chez C. elegans. Les résidus cystéine (cys) sont représentés en jaune. Modifié d'après Barbe MT et al., 2006.

Structure des gènes de connexine et régulation transcriptionnelle

La structure des gènes de connexines a été présentée comme relativement simple dans la mesure où un gène code pour une protéine (*Figure 12*). Le premier modèle proposé était celui d'une région 5'- UTR non traduite sur l'exon 1 et d'une séquence codante et de la région 3'UTR portées sur l'exon 2. Néanmoins, des données récentes semblent suggérer que cette structure pourrait être plus complexe avec une région 5'UTR pouvant subir un *splicing* alternatif et d'autres (Cx31.3, Cx36) dont la séquence codante est portée par deux exons [Oyamada M, 2005 ; Sohl G et Willecke K, 2003].

L'expression de certains gènes de connexines pourrait être régulée par la méthylation des ilots CpG de leur promoteur. Ainsi, la méthylation du promoteur de la Cx26 dans des lignées de cancers pulmonaires humains pourrait expliquer la perte d'expression de la Cx26 [Chen Y, 2005] ou celle de la Cx32 dans des carcinomes rénaux [Yano T *et al.*, 2004].

Dans un modèle artificiel, une région (-158pb à +209pb) a été identifiée dans le promoteur de la Cx43 comme un élément de réponse aux caroténoïdes [Bertram JS, 2004; Bertram JS et Vine AL, 2005]. La fixation sur cette séquence induit une augmentation de la synthèse de Cx43 et de la formation de plaques de communication intercellulaire.

Topologie des connexines

Les connexines auraient toutes une structure similaire avec quatre domaines transmembranaires. Elles présentent deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire, les segments amino- et carboxy-terminaux étant cytoplasmiques. L'une des propriétés d'appartenance à la famille des connexines est la présence de trois résidus cystéines sur chacune des boucles extracellulaires (*Figure 13*). Les connexines les plus étudiées pour leurs structures sont la Cx43, la Cx32 et la Cx26 [Milks LC, 1988 ; Zhang JT et Nicholson BJ, 1994], la structure des autres connexines ayant été extrapolées par analogie avec la structure primaire des connexines plus amplement étudiées.



Figure 14 : Assemblage des connexines dans les plaques jonctionnelles

Les connexines 43 et 45 sont ici utilisées comme exemples de la famille des connexines. Elles présentent les quatre domaines transmembranaires caractéristiques, deux boucles extracellulaires (E1 et E2) et trois segments intracellulaires (extrémité Amino-Terminale, boucle Intracellulaire et extrémité Carboxy-Terminale). L'assemblage de six connexines forme un hémicanal, le connexon. Au niveau de la plaque jonctionnelle, les connexons de deux cellules en contact forme un canal intercellulaire fonctionnelle. Chaque connexon peut être formé de plusieurs connexines, ce qui donne quatorze possibilités d'assemblage dans l'exemple ci-dessus. On distingue ainsi des connexons homomériques ou hérétomériques. Chaque canal peut être formé de deux connexons identiques ou différents, ce qui conduit à des canaux homotypiques ou hétérotypiques.

Modifiés d'après Laird DW, 2006.

Les nouveaux membres de la famille

Les innexines

Les innexines ont été identifiées chez les Invertébrés comme des structures ayant un rôle équivalent à celui joué par les connexines chez les Vertébrés. Elles assurent la communication directe entre cellules en contact. Leur séquence codante ne présente pas d'analogie avec les connexines, mais leur topologie est identique avec quatre domaines transmembranaires et la présence de deux résidus cystéines sur chacune des boucles extracellulaires [*Figure 13*, Phelan P, 2005].

Les pannexines

L'utilisation en PCR d'amorces dégénérées obtenues à partir des séquences d'innexines a abouti à l'identification des pannexines, protéines constituant des canaux transmembranaires ressemblant aux innexines et aux connexines [*Figure 13*, Panchin Y *et al.*, 2000]. Leur nom (« pan ») provient du fait que des orthologues sont retrouvés aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés. Chez l'Homme comme chez la souris, trois séquences présentant des analogies avec les innexines ont été identifiées, les pannexines 1, 2 et 3 (Panx1, Panx2, Panx3). L'ARNm de la Panx1 est retrouvé dans tout l'organisme, mais apparaitrait plus fortement dans le cœur, les gonades et le muscle squelettiques chez l'Homme, ainsi que dans le système nerveux en développement. L'ARNm de la Panx2 n'est détecté qu'au niveau du système nerveux. La Panx3 ne serait présente que faiblement dans le système nerveux, le cartillage et la peau chez la souris, alors que chez l'Homme seule une expression fœtale est envisagée par des approches *in silico* [Baranova A *et al.*, 2004; Bruzzone R *et al.*, 2003 ; Litvin O *et al.*, 2006].

Les connexines, éléments structurels des jonctions communicantes

Connexines, pannexines et canaux jonctionnels

Les connexines sont le motif de base des jonctions communicantes. Elles s'assemblent en hexamères pour former un canal transmembranaire, le connexon. L'apposition de deux connexons provenant de cellules adjacentes forme un canal intercellulaire fonctionnel (*Figure 14*). Les connexons peuvent être composés d'un seul type de connexine ou de plusieurs en fonction des différents types exprimés dans la cellule. On distingue donc des connexons homomériques ou des connexons hétéromériques. Des connexons hétéromériques constitués de Cx26 et de Cx32 ont ainsi été décrits dans le foie de rat et de souris [Sosinsky G, 1995]. De plus, les



Figure 15 : Structure de la plaque jonctionnelle dans un cœur de rat en microscopie électronique

A : Structure pentalaminaire caractéristique de la plaque jonctionnelle. L'espace intercellulaire normal (**ics**) est réduit à un « gap » de 20 Å (**g**) au niveau de la zone jonctionnelle (x 250 000). **B** : Sections tangentielle (**j**) et quasi-tangentielle (**j**') de la plaque jonctionnelle. Au niveau de la section tangentielle, l'imprégnation au lanthane permet la délimitation de structures hexagonales. Chaque sous-unité présente un cœur opaque et une périphérie de 30 à 40 Å. La distance entre le cœur de deux structures adjacentes est de l'ordre de 90 Å (x 210 000 ; encart : x 420 000).

D'après Revel JP et Karnovsky MJ, 1967.

connexons des cellules en contact peuvent être constitués des mêmes connexines ou de différents types, ce qui conduit à des canaux homotypiques ou hétérotypiques.

Si, en théorie, de très nombreuses configurations sont possibles, il s'avère néanmoins que toutes les possibilités ne sont pas retrouvées. Par exemple, dans un modèle *in vitro* où la Cx43 et la Cx26 sont co-exprimées, il apparait que chacune des connexines peut former des canaux fonctionnels, mais l'oligomérisation de la Cx43 et de la Cx26 n'est pas possible [Gemel J *et al.*, 2004 ; Cottrell GT et Burt JM, 2005].

Depuis quelques années, il a été proposé que des canaux intercellulaires jonctionnels pourraient également être formés de pannexines [Bruzzone R *et al.*, 2003 ; Baranova A *et al.*, 2004 ; Barbe MT *et al.*, 2006]. Ainsi, la pannexine 1 (Panx1) peut former des canaux homotypiques quand elle est exprimée dans des ovocytes de xénope [Bruzzone R *et al.*, 2003] ou dans une lignée cellulaire de mammifère [Vanden Abeele F *et al.*, 2006]. Les pannexines 2 et 3, en revanche, ne semblent pas capables de former des canaux homotypiques fonctionnels, mais l'association de la Panx1 et de la Panx2 dans des structures hétéromériques permet l'établissement d'un couplage. Si l'expression des pannexines a été démontrée dans de nombreux tissus [Litvin O *et al.*, 2006], il n'est pas apparu, jusqu'à présent, que ces canaux soient fonctionnels dans des modèles où ces protéines sont constitutivement présentes [Dahl G et Locovei S, 2006 ; Huang Y *et al.*, 2007].

Structure de la plaque jonctionnelle

En 1967, Revel et Karnovsky avaient observé la plaque jonctionnelle en microscopie électronique dans le cœur de rat. Ils la nomment alors *gap junction* et la décrivent comme une structure pentalaminaire, ce qui la distingue des *tight junctions* (*Figure 15*). Sur des coupes tangentielles, elle apparait comme l'agrégation de structures hexagonales. Quelques années plus tard, d'autres travaux proposent que ces structures hexagonales correspondent à l'association de six protéines, les connexines, formant un canal, le connexon [Goodenough DA, 1974; Goodenough DA, 1975; Caspar DL *et al.*, 1977; Makowski L *et al.*, 1977]. Le cœur opaque observé en microscopie électronique correspond au pore du canal.

Perméabilité sélective des canaux intercellulaires

Outre la capacité à propager des signaux électriques comme, par exemple, dans les myocytes cardiaques [Delmar M, 2003], les jonctions communicantes autorisent le passage de nombreuses molécules cytoplasmiques. Les premières



Figure 16 : Illustration de la sélectivité transjonctionnelle des canaux constitués de connexines

Les canaux jonctionnels peuvent être perméables à de petites molécules (**A**), à des molécules de taille supérieure mais présentant une configuration permettant néanmoins leur passage (**B**) ou à une combinaison des deux cas précédents (**C**). Il reste important de noter que la charge des molécules considérées peut être un élément modifiant la perméabilité des canaux jonctionnels vis-à-vis de ces molécules et que les molécules dont le poids moléculaire excède 1000 Da ne peuvent généralement pas transiter.

D'après Laird DW, 2006.

approches mettant en évidence la diffusion de molécules directement de cytoplasme à cytoplasme utilisaient des marqueurs fluorescents ou radioactifs associés à des résidus peptidiques [Lowenstein WR, 1979]. Le pore du canal a un diamètre estimé à 12Å, ce qui permet le passage de molécules de poids moléculaire inférieur à 1000 Da (*Figure 16*). Depuis les premières études, différentes connexines ont été identifiées et la sélectivité des canaux semble dépendre à la fois des connexines les constituant et de l'environnement (moléculaire et ionique) de la plaque jonctionnelle.

La sélectivité des canaux constitués de Cx26, Cx32, Cx43 et Cx26 et Cx32 en association a été la plus largement étudiée. En ce qui concerne les autres connexines, les données sont sporadiques. Parmi les molécules pouvant circuler par les canaux jonctionnels, le calcium a été l'un des premiers identifiés. Cette perméabilité est maintenant reconsidérer du fait de l'identification d'autres types de canaux constitués de pannexines, structure inconnue au moment de la réalisation de ces études [Harris AL, 2007]. La fonctionnalité d'hémicanaux pourrait en outre être responsable d'un influx de calcium provenant du milieu extracellulaire et non de la cellule couplée, considérée initialement comme étant la source de calcium. D'autres molécules, capables de diffuser à travers les canaux jonctionnels, ont été identifiées telles que l'IP3, l'ATP, l'ADP, l'AMP, l'AMPc, le GMPc, l'adénosine, le NAD+, certains acides aminés (aspartate, glutamate), des peptides de taille inférieure à dix résidus, la prostaglandine E2 et le glucose. Les canaux constitués de Cx43 présenteraient une perméabilité plus grande à l'AMPc et au GMPc que ceux constitués de Cx26 ou de Cx40 [Kanaporis G et al., 2008]. Des ARN, bien que présentant a priori un poids moléculaire plus élevé, ont récemment été ajoutés à la listes des molécules pouvant transiter via les canaux jonctionnels [Valiunas V et al., 2005].

Les hémicanaux de connexines et de pannexines

Parce que les connexons ménagent un large pore relativement peu sélectif, le concept même d'hémicanal laissait supposer de dangereuses conséquences pour la survie cellulaire si ceux-ci permettaient un échange direct entre les milieux intra- et extracellulaires. Des hémicanaux fonctionnels ont pourtant été décrits par des études électrophysiologiques sur les cellules horizontales de la rétine de poisson-chat dès 1992 [Devries SH et Schwartz EA, 1992].

D'autres études ont ensuite suivi, montrant que si l'ouverture de ces canaux était suffisamment brève et contrôlée, alors leur existence pouvait être envisagée. Leur mise en évidence a ainsi été réalisée grâce à des études immunocytochimiques et par la capture de colorants à partir du milieu extracellulaire [Hofer A et Dermietzel R, 1998].



Figure 17 : Partenaires protéiques potentiels de la Cx43 jouant un rôle dans la régulation de la communication jonctionnelle et dans la stabilité de la plaque Modifié d'après Laird DW, 2006.

Les hémicanaux constitués de Cx43 permettraient la libération de glutamate, d'ATP [Stout CE *et al.*, 2002] et de glutathion [Rana S et Dringen R, 2007] à partir des astrocytes. Il apparait que ces canaux pourraient être activés dans certaines conditions non physiologiques. Dans un modèle d'ovocyte de xénope, l'expression de la Cx46 peut conduire à la formation d'hémicanaux qui, s'ils ne sont pas fermés par de fortes concentrations de calcium, aboutissent à la mort cellulaire [Paul DL *et al.*, 1991]. L'expression de la Cx30 présentant une mutation associée au syndrome de Clouston dans des cellules HeLa conduit à la formation d'ATP [Essenfelder GM *et al.*, 2004]. Des hémicanaux de Cx43 pourraient également être impliqués lors de l'ischémie. Leur ouverture prolongée dans des cultures d'astrocytes contribuerait à la mort cellulaire [Contreras JE *et al.*, 2002].

La Panx1 forme des hémicanaux dans l'ovocyte de xénope [Bruzzone R *et al.*, 2003]. Du fait de l'expression de pannexines dans le système nerveux central, la possibilité d'hémicanaux constitués de pannexines chez les mammifères est maintenant proposée [Spray DC *et al.*, 2006]. Des canaux de large conductance ont été décrits comme étant activés lors de la mort cellulaire induite par la voie de signalisation associée au récepteur purinergique P2X7. La co-expression des récepteurs P2X7 et de la Panx1 dans des ovocytes de xénope a permis de reproduire le phénomène de mort cellulaire associé à une forte libération d'ATP décrit dans des cellules de mammifère. Ceci suggère que des hémicanaux constitués de Panx1 pourrait être le support moléculaire de cette conductance [Pelegrin P et Surprenant A, 2006; Locovei S *et al.*, 2007].

Régulation de l'état d'ouverture des canaux intercellulaires et des hémicanaux

L'état d'ouverture des canaux jonctionnels est régulé grâce à différents mécanismes tels que des phosphorylations de l'extrémité carboxyle des connexines (*Figure 17*), le pH intracellulaire, le taux intracellulaire de calcium, certaines hormones ou l'environnement lipidique.

La phosphorylation de la Cx43 par la *casein kinase 1* permet ainsi le maintien de la Cx43 à la membrane. En présence d'inhibiteur, la Cx43 est majoritairement exprimée dans le cytoplasme [Cooper CD et Lampe PD, 2002]. L'augmentation de la communication jonctionnelle induite par les canaux potassiques passerait également par un phénomène de phosphorylation par la voie de la calmoduline kinase dans les astrocytes de la moelle épinière [De Pina-Benadou MH *et al.*, 2001].



Figure 18 : Cycle de vie des connexines

Les ARNm de connexines sont traduits dans le réticulum endoplasmique. Dans le cas d'altérations de la protéine, elles sont prises en charge par la voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique. Autrement, la plupart d'entre elles poursuivent leur cheminement vers le compartiment intermédiaire où elles sont oligomérisées, puis atteignent le compartiment distal de l'appareil de Golgi. Des vésicules pléomorphes ou des intermédiaires de transport emmènent les connexons jusqu' à la membrane plasmique avec l'aide des microtubules. Les connexons pourraient assurer un échange avec l'environnement extracellulaire sous la forme de canaux fonctionnels ou migrent à proximité de plagues jonctionnelles pour établir des canaux intercellulaires avec d'autres connexons des cellules en contact. En conjonction avec des molécules d'adhérence, les cadhérines, les connexons s'agrègent en plaques, s'ouvrent et permettent l'échange de molécules cytoplasmiques. De nombreuses protéines partenaires des connexines ont été identifiées et joueraient un rôle dans la stabilisation de la plaque et dans la régulation des canaux. Les plaques jonctionnelles ou des fragments de celles-ci sont internalisés sous la forme de double membrane (jonctions annulaires ou connexosome). D'autres voies d'internalisation pourraient exister où les connexons d'un même canal seraient séparés puis dégradés par les voies classiques de l'endocytose. Les jonctions communicantes internalisées sont alors traitées par les lysosomes ou par le protéasome.

Modifié d'après Laird DW, 2006.

Les jonctions communicantes sont régulées par le pH intracellulaire, l'augmentation de la concentration en protons conduisant à une diminution de la conductance jonctionnelle [Spray D *et al.*, 2006]. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium conduit également à une fermeture des canaux [Rose B *et al.*, 1977]. La régulation de la communication jonctionnelle par le calcium serait médiée par une interaction de la calmoduline avec les premiers acides aminés de l'extrémité carboxyle au moins pour la Cx36 murine [Burr GS *et al.*, 2005]. La communication jonctionnelle pourrait aussi être régulée par des hormones dont l'oestradiol [Chung TH *et al.*, 2004].

En plus de ces voies de signalisation intracellulaires, la communication jonctionnelle pourrait être régulée par la présence de cholestérol à proximité des canaux. Certaines connexines (Cx43, Cx36) sont ainsi retrouvées de façon privilégiée dans les *lipid rafts* contenant la cavéoline, protéine pouvant interagir avec les connexines. Dans la mesure où ces zones spécialisées de la membrane sont la localisation privilégiée de certaines kinases (dont c-src), il semble que l'environnement lipidique soit important dans la régulation fonctionnelle des jonctions communicantes [Cascio M, 2005 ; Champeil-Potakar G, 2006]. Les lipopolysaccharides en association avec le bFGF inhiberaient la communication jonctionnelle mais activeraient la libération d'ATP par les hémicanaux de connexines dans un modèle de gliome murin où l'expression de la Cx43 est forcée [de Vuyst E *et al.*, 2007].

Parmi les autres facteurs pouvant activer les hémicanaux constitués de connexines, on notera une concentration extracellulaire faible en calcium [Cotrina ML *et al.*, 1998 ; Hofer A et Dermietzel R, 1998] ou la présence de radicaux libres lors de l'ischémie [Contreras JE *et al.*, 2003; Retamal MA *et al.*, 2006]. On notera également que les hémicanaux de pannexines semblent insensibles au calcium extracellulaire [Bruzzone R *et al.*, 2005].

Trafficking et turn-over des connexines

Les connexines sont synthétisées à partir des ribosomes, insérées dans la membrane du reticulum, puis adressées à la membrane plasmique sous forme de connexons à partir du réticulum endoplasmique en suivant la voie de sécrétion classique (*Figure 18*). Des approches sur cellules isolées ont montré que les différentes connexines sont assemblées en connexons, probablement à partir de structures dimériques ou trimériques [Ahmad S *et al.*, 1999]. Il semble que l'oligomérisation des connexines en connexon soit dépendante de la calmoduline [Ahmad S *et al.*, 2001]. Lors de leur adressage vers la membrane plasmique, les connexons sont fermés afin

Partenaires protéiques de la Cx43 murine	Méthodes	Acides aminés impliqués
ZO-1	WB, DH, PD, IP, IF	379–382
v-Src	PD, IP, P	247, 265
		265
		274–283
c-Src	PD, IP, P	265
		265
Protéine Kinase A	Р	364, 365, 368, 369, 373
Protéine Kinase C	P, IP, IF	368, 372
Protéine Kinase G	Р	257 (rat)
MAP Kinase	Р	255, 279, 282
Cdc2	Р	255
CK1	P, IP	325, 328, 330
RΡΤΡμ	IP	265
β-Caténine	IP	
α-Caténine	ME	
Cadhérine	ME	
p120	IF	
NOV/CNN	IF	
Cavéoline	PD, IP, IF, CS	
α/β -tubuline, microtubules	PD, IF, ME, CS	234–262

Tableau VII : partenaires protéiques identifiés pour la Cx43 murine CS = Co-Sédimentation ; DH = Double-Hybride ; IP = Immuno-Précipitation; IF = Immuno-Fluorescence; *ME* = *Immunodétection en Microscopie Electronique*; *P* = *état de Phosphorylation*; *PD* = *GST Pull-Down*; WB = Western Blot.

Modifié d'après Giepmans B, 2004.

d'assurer le maintien des concentrations ioniques entre le cytoplasme et les différents organites de la voie d'adressage.

Afin de mieux déterminer comment s'établit l'adressage des connexines et comment la plaque jonctionnelle se forme, des protéines « taggées » ont été utilisées : aequorine chémiluminescente, protéines autofluorescentes GFP (green fluorescent protein) et ses variants, insertion de résidus tétracystéine [Martin PE et al., 1998 : Jordan K et al., 1999; Martin PE et al., 2001; Gaietta G et al., 2002]. Des techniques de microscopie sur cellules vivantes ont ainsi permis de suivre les déplacements des connexines tout au long de la voie d'adressage et une fois insérées dans la membrane plasmique. Les connexons parviennent à la membrane via des vésicules de sécrétion. L'insertion des connexons dans la membrane plasmique se fait sur des zones relativement vastes puis ils se déplacent vers la plaque jonctionnelle. Elle est ainsi renouvelée à partir de sa périphérie et c'est à partir du centre de la plaque que les connexons les plus anciens sont internalisés pour recyclage ou dégradation par les voies lysosomiales ou du protéasome [Gaietta G et al., 2002]. Ces phénomènes dynamiques sont relativement rapides dans la mesure où la demi-vie d'une connexine est estimée d'une heure à un jour selon les modèles [Fallon RF et Goodenough DA. 1981 ; Laird DW et al., 1991 ; Laird DW, 1996 ; Saffitz JE et al., 2008 ; Jiang JX et al., 1993].

Régulation du trafficking et stabilité de la plaque jonctionnelle

Les connexines sont associées à de nombreuses protéines du cytosquelette favorisant le *trafficking* des connexines et la stabilité de la plaque jonctionnelle (*Figure 17, Tableau VII*).

L'interaction avec les tubulines α et β des microtubules permettrait l'adressage à la membrane [Giepsman BN *et al.*, 2001]. La drébrine, décrite comme partenaire protéique de la Cx43 dans le cerveau assurerait un lien avec les microfilaments d'actine et serait nécessaire à la stabilisation de la plaque jonctionnelle [Butkevich E *et al.*, 2004]. ZO-1 et ZO-2 sont des protéines initialement décrites comme constitutives des *tight junctions*. Il est apparu que ZO-1 interagissait également avec plusieurs connexines et que ZO-2 interagit au moins avec la Cx43; ZO-1 est préférentiellement associé à la Cx43 lorsque les cellules sont quiescentes, ce qui suggère un rôle dans la stabilisation de la plaque jonctionnelle [Singh D *et al.*, 2005]. ZO-1 pourrait également intervenir dans l'adressage de la Cx43 à la membrane plasmique, ZO-1 semblant être associé à la Cx43 à la périphérie de la plaque jonctionnelle [Hunter AW *et al.*, 2005]. De plus, lorsque la Cx43 n'est plus associée à ZO-1, sa localisation serait privilégiée dans



Figure 19 : Nouveau modèle de nexus associant jonctions communicantes, jonctions adhérentes et « tight junctions »

Ces trois types de jonctions sont retrouvés à proximité les unes des autres dans les cellules épithéliales ce qui suggèrent une activité coordonnée. Modifié d'après Laird DW, 2006.

les *lipid rafts*, où elle pourrait être associée à la cavéoline et hyperphosphorylée, ce qui conduirait à son internalisation [Laing JG *et al.*, 2005 ; Schubert AL *et al.*, 2005]. De plus en plus de protéines associées à d'autres jonctions intercellulaires le sont également avec les connexines. C'est ainsi le cas de l'occludine ou de la claudine, protéines appartenant aux *tight junctions*, qui peuvent être co-immunoprécipitées avec la Cx32 [Kojima T *et al.*, 1999 ; Kojima T *et al.*, 2001]. Ces différentes structures pourraient ainsi se stabiliser entre elles (*Figure 19*).

Certaines protéines ont également été identifiées du fait de leur interaction avec la Cx43. C'est ainsi le cas de CIP150 et de CIP85 (*Cx43 interacting protein 150 et 85*). En l'absence de ces protéines, la Cx43 serait internalisée [Lan Z *et al.*, 2005 ; Akiyama M *et al.*, 2005]. Certains membres de la famille des sémaphorines ont également été proposés comme régulateurs de la Cx43. Ainsi, lorsque SEMA3F est inhibée par siRNA, la Cx43 est plus faiblement exprimée à la membrane de cellules d'une lignée épithéliale de foie de rat (IAR20) et une interaction a été montrée entre les deux protéines par la technique de double-hybride [Kawasaki Y *et al.*, 2007]. De plus, SEMA3A pourrait moduler la migration des cellules cardiaques issues de la crête neurale par un mécanisme impliquant des protéines du cytosquelette et passant par la Cx43 [Xu X *et al.*, 2006].

Connexine	Distribution tissulaire
Cx43	Blastocytes, cornée, peau, os, reins, glandes mammaires, cœur, poumons, kératinocytes, hypophyse antérieure, parathyroïdes, thyroïde, pancréas, surrénales, testicules, ovaires, myomètre, endothélium, cristallin, cerveau, macrophages, tissu conjonctif.
Cx46	Cristallin, coeur, gaine nerveuse.
Cx37	Certaines cellules épithéliales, kératinocytes, cœur, testicules, ovaires, neuroblastes corticaux, reins, poumons.
Cx40	Endothélium, blastocytes, système de conduction cardiaque, ovaires, neuroblastes corticaux, reins, poumons.
Cx50	Cristallin, cornée.
Cx32	Foie, cerveau, gaine nerveuse, thyroïde, reins, intestins, poumons, rate, testicules, glande mammaires, pancréas, glandes salivaires.
Cx26	Foie, pancréas, kératinocytes, intestin, glande pinéale, cochlée, hypophyse antérieure, parathyroïdes, thyroïde, reins, poumons, rate, estomac, testicules, cerveau, glandes mammaires, utérus, glandes salivaires.
Cx31	Kératinocytes, blastocytes, reins, testicules, yeux.
Cx30.3	Blastocytes, kératinocytes, reins.
Cx31.1	Kératinocytes, épithéliums stratifiés, testicules.
Cx30	Poumons, estomac, cerveau, utérus, peau, cristallin.
Cx45	Cœur, blastocytes, poumons, kératinocytes, peau, cerveau.
Cx36	Rétine, cerveau.

Tableau VIII : Distribution tissulaire des connexines humaines

Tissu	Type cellulaire	Tissu	Type cellulaire
Cœur	Cardiomyocytes	Oviducte	Cellules épithéliales
	Cellules musculaires lisses		Cellules musculaires lisses
Cavité buccale	Kératinocytes	Glande	Cellules épithéliales
		mammaire	
Pulpe dentaire	Odontoblastes	Poumon	Cellules épithéliales alvéolaires
	Cellules pulpeuses		
	Fibroblastes péridontaires		
Glande salivaire	Cellules myoépithéliales	Trachée	Cellules musculaires lisses
Œsophage	Cellules épithéliales	Os	Ostéoblastes
			Ostéoclastes
			Ostéocytes
Duodénum	Cellules musculaires lisses	Cartilage	Chondrocytes
Intestin grêle	Cellules musculaires lisses	Rein	Cellules vasculaires
	Cellules de Cajal		Cellules glomérulaires
Colon	Cellules musculaires lisses	Vessie	Cellules musculaires lisses
		- 4 -	Cellules interstitielles suburothéliales
Pancréas	Cellules β du pancréas endocrine	Rétine	Cellules gliales
Hypophyse	Cellules de l'hypophyse antérieure et postérieure	Thymus	Cellules épithéliales
Glande		Moelle osseuse	Cellules stromales
parathyroïde			
Glande thyroïde	Cellules épithéliales	Ganglions	Cellules dendritiques folliculaires
		lymphatiques	
Glande surrénale		Rate	Cellules dendritiques folliculaires
Peau	Kératinocytes	Amygdale	Cellules épithéliales
	Fibroblastes		
Muscle	Myoblastes	Ovaire	Cellules de la granulosa
Cerveau	Astrocytes	Testicule	Cellules de Sertoli
	Cellules des leptoméninges		Cellules de Leydig
	Cellules épendymaires		
		Utérus	Cellules du myomètre

Tableau IX : Distribution de la Cx43 D'après Laird DW, 2006.

Distribution tissulaire des connexines

Les connexines ont été décrites dans la plupart des types cellulaires de l'organisme à l'exception des hématies, des plaquettes, des spermatozoïdes et des cellules musculaires squelettiques matures (*Tableau VIII*).

Dans un même type cellulaire, il n'est pas rare de retrouver au moins deux connexines différentes. D'après des études *in vitro*, celles-ci peuvent se retrouver dans la même plaque jonctionnelle (avec des connexons homomériques ou hétéromériques) ou au contraire former des plaques jonctionnelles où n'est présent qu'un seul type de connexines [Falk MM, 2000]. La Cx43 est la plus ubiquitaire des connexines. Elle est ainsi retrouvée dans trente cinq types cellulaires différents [*Tableau IX*, Laird DW, 2006]. D'autres connexines en revanche ne sont exprimées que dans un nombre restreint de types cellulaires, ce qui suggère un rôle spécifique à chacune d'entre elles. La déficience d'une connexine ne pourrait donc pas toujours être palliée, dans ce cas, par une autre connexine exprimée dans le même type cellulaire.

Fonctions des connexines

Connexines, développement, différenciation et cicatrisation

Par leur capacité à conduire des signaux intracellulaires directement entre les cellules en contact, les jonctions communicantes ont rapidement été proposées comme étant une structure importante dans le développement et la différenciation cellulaire.

Ainsi, lors du développement embryonnaire, les jonctions communicantes permettraient de délimiter des sous-divisions fonctionnelles dans des régions ou des organes en devenir faisant circuler des signaux morphogènes entre certaines cellules (*Figure 20*). La communication jonctionnelle via la Cx43 semble être impliquée dans la mise en place de la symétrie axiale du corps chez le xénope ou le poulet [Levin M et Mercola M, 1999 ; Wei CJ *et al.*, 2004]. En revanche, ce modèle ne semble pas être retrouvé chez les mammifères. Dans les modèles murins, bien qu'il n'y ait pas d'hétérotaxie notable, l'absence de Cx43 ou sa surexpression conduisent à des anomalies morphologiques [Reaume AG *et al.*, 1995 ; Ewart JL *et al.*, 1997].

Un rôle de la Cx43 a été mis en évidence dans le développement de la crête neurale et des cellules donnant naissance à l'épicarde [Huang GY *et al.*, 1998a,b ; Li WE *et al.*, 2002 ; Wei CJ *et al.*, 2004] ainsi que dans la folliculogenèse ovarienne [Kidder GM et Mhawi AA, 2002]. D'autres connexines ont également été identifiées comme indispensables au développement et à la maturation de certains types



Figure 20 : Compartimentation du mésoderme dans un embryon de poulet

Suite à l'injection de Jaune de Lucifer dans une cellule du mésoderme (ms), celui-ci diffuse, via les jonctions communicantes dans les cellules du mésoderme mais pas dans les cellules épithéliales (Ep) adjacentes. Les triangles indiquent la limite entre épithélium et mésoderme. Barre d'échelle : 100 µm. D'après Serras F et al., 1993.



Figure 21 : Cx43 et différenciation cardiaque

Une immunodétection est réalisée sur des coupes de tissu cardiaque chez l'embryon de souris à E14,5 (1) et chez un adulte de douze mois (2). La distribution au niveau des disques intercalaires est particulièrement visible à l'âge adulte. Barre d'échelle : 25 µm. D'après King TJ et Lampe PD, 2005.



Figure 22 : Rôle de la Cx43 dans la cicatrisation

Une immunodétection de la Cx43 est réalisée sur des coupes sériées de peau humaine avant et après lésion.

1 et 2. La Cx43 est détectée au niveau de l'épiderme dans le tissu non lésé sous toutes ses formes de phosphorylation (1) ou uniquement sous sa forme phosphorylée sur la sérine 368 (2).

3 et 4. Vingt quatre heures après une lésion, la Cx43 n'est plus détectée à sa proximité. La Cx43 sous toutes ses formes de phosphorylation semble plus faiblement exprimée dans l'épiderme (3). Au contraire, la Cx43 phosphorylée sur la sérine 368 présente une expression spécifique des cellules de l'épiderme au contact de la lame basale (4). Le site de blessure est représenté par le triangle noir.

Flèche : lame basale. C = couche cornée ; E = épiderme ; D = derme. Barre d'échelle : 50 μ m. Modifié d'après King TJ et Lampe PD, 2005.

cellulaires. Ainsi, les souris invalidées pour la Cx45 meurent in utero d'une déficience cardiaque [Kumai M et al., 2000], les souris invalidées pour la Cx37 présentent des défauts de la maturation des ovocytes [Kidder GM et Mhawi AA, 2002] et, dans un autre modèle murin, les connexines 43 et 45 s'avèrent indispensables pendant la différenciation du muscle squelettique et la Cx43 est exprimée lors de la régénération musculaire chez l'adulte [Araya R et al., 2005]. La différenciation terminale conduisant à des organes fonctionnels fait apparaître une organisation des connexines. Ainsi, dans le cœur adulte, la Cx43 ne sera présente qu'au niveau du disque intercalaire afin d'orienter la propagation de la dépolarisation membranaire [Figure 21, King TJ et Lampe PD, 2005]. Chez l'Homme, des modifications du profil d'expression de la Cx43 sont observées chez l'adulte lors, par exemple, de la différenciation du trophoblaste [Cronier L et al., 1999] ou lors de la cicatrisation après une lésion de la peau [Figure 22, King TJ et Lampe PD, 2005]. Lors de la mise en place du néocortex chez le rongeur, les synapses électriques, majoritaires par rapport aux synapses chimiques, délimiteraient quatre compartiments: (1) zone sous-ventriculaire, cellules en migrations et glie radiaire; (2) cellules gliales; (3) cellules pyramidales pendant les deux premières semaines post-natales; (4) interneurones inhibiteurs du néocortex mature [Sutor B et Hagerty T, 2005]. Le premier et le troisième compartiments disparaissent à l'âge adulte. Cette compartimentation serait associée avec l'expression de certaines connexines et l'absence de celles-ci aboutirait, entre autres évènements, à des modifications dans la mise en place des couches corticales [Fushiki S et al., 2003 ; Elias LA et al., 2007].

Des anomalies du développement ou de la différenciation conduisant à des pathologies humaines ont été associées à des mutations de connexines. Parmi cellesci, on notera la dysplasie oculo-dento-digitale (ODDD pour *OculoDentoDigital Displasia*) pour laquelle des mutations peuvent être observées dans la séquence de la Cx43 [Paznekas WA *et al.*, 2003]. Des mutations de la Cx46 et de la Cx50 sont associées à certaines formes de cataractes [Jiang H *et al.*, 2003 ; Berthoud VM *et al.*, 2003], des mutations de la Cx40 à la tétralogie de Fallot dans un modèle murin [Gu H *et al.*, 2003], des mutations de la Cx32 avec certaines formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth liée à l'X [Bergoffen J *et al.*, 1993] et des mutations des connexines 26, 30 et 31 à des surdités et à des pathologies de la peau telles que le syndrome de Vohwinkel ou l'érythrodermie [Marziano NK *et al.*, 2003 ; Maestrini E *et al.*, 1999 ; Richard G *et al.*, 1998 ; Arita K *et al.*, 2002]. Ces corrélations entre niveau d'expression ou mutations de connexines et effet sur la différenciation sont parfois spéculatives et ne permettent pas,



Figure 23 : Connexines et cycle cellulaire

Dans cette cellule hypothétique, sont représentés quelques évènements moléculaires associés aux connexines dans la progression du cycle cellulaire. Les phases du cycle cellulaire sont notées de G1 à M. • = Sites de phosphorylation de la portion carboxy-terminale de la Cx43. AMPc = Adénosine MonoPhosphate cyclique, cdc25A = cell division cycle 25 homolog A; Cdk1 = Cyclin-dependent kinase 1; Cdk2 = Cyclin-dependent kinase 2; Cx32 = Connexine 32; Cx43 = Connexine 43; Cx43P3 = forme hyperphosphorylée de la Cx43 ; cycB = Cycline B; cycE = Cycline E; Her-2 = Human Epidermal Growth factor Receptor-2; p21 = cyclin-dependent kinase inhibitor p21; p27 = cyclin-dependent kinase inhibitor p27; PKC = Protéine kinase C; skp2 = S-phase kinase-associated protein 2; TCF = T-Cell Factor ; Tr-Cx43 = forme tronquée de la Cx43; Ub = Ubiquitination de p27. D'après Crespin S et al., 2007. pour l'instant, de préciser quels sont les facteurs responsables dont le transfert intercellulaire est régulé par les connexines.

Connexines et cycle cellulaire

Il est généralement admis que la communication jonctionnelle est réduite pendant la prolifération cellulaire. Deux hypothèses sous-tendent ce phénomène. La première suppose que cette régulation serait un effet indirect de l'activation des MAP kinase et de la voie PI3/Akt qui inhibent la communication jonctionnelle [Kojima T et al., 2003 ; Kojima T et al., 2004]. La seconde, plus largement répandue, semble impliquer directement les jonctions communicantes. Selon cette dernière hypothèse, les jonctions communicantes réguleraient la progression du cycle cellulaire en contrôlant l'échange de métabolites entre les cellules en division [Vinken M et al., 2006]. Plusieurs processus moléculaires seraient à l'origine de cette modulation. Ainsi, dans un modèle de foie de rat, la communication jonctionnelle est augmentée durant la phase G1 du cycle cellulaire puis diminuée pendant la phase S. Cette diminution résulte de la réduction de la stabilité de l'ARNm des deux principales connexines du foie, la Cx26 et la Cx32 [Kren BT et al., 1993]. Mais d'autres modes de contrôle peuvent être impliqués. C'est le cas de l'état de phosphorylation de la Cx43 par la protéine kinase C qui conduit à la dissociation des plaques jonctionnelles lors du passage de la phase G0 à la phase S [Lampe PD et Lau AF, 2004 ; Figure 23]. Dans des cellules épithéliales de rein de rat, la Cx43 est phosphorylée pendant la phase S et lors de la transition G2/M [Solan JL et al., 2003]. Cet état de phosphorylation est associé avec la translocation de la Cx43 dans le cytoplasme. Une forme hyperphosphorylée de la Cx43 (Cx43P3) semble apparaître spécifiquement lors de la transition G2/M [Xie H et al., 1997 ; Kanemitsu MY et al., 1998 ; Lampe PD et al., 1998]. De plus, il a été proposé que la phosphatase Cdc25A régule l'état de phosphorylation de la Cx43 ainsi que la communication jonctionnelle pendant la transition G/S [Melchheier I et al., 2005].

De nombreuses études ont montré que l'expression des connexines activerait l'expression d'inhibiteurs de la prolifération cellulaire et inhiber l'expression d'activateurs [Zhang YW *et al.*, 2001 ; Zhang YW *et al.*, 2003a,b; Koffler L *et al.*, 2000 ; Bradshaw SL *et al.*, 1993 ; Qin H *et al.*, 2002 ; Goldberg GS *et al.*, 2000 ; Flachon V *et al.*, 2001 ; Fujimoto E *et al.*, 2004 ; Gupta N *et al.*, 2001]. Dans la majorité des cas, les voie de signalisation impliquées n'ont pas été identifiées (*Figure 24*). Néanmoins, certains éléments suggèrent que les connexines pourraient jouer un rôle direct sur l'expression des gènes. Ainsi, dans un modèle d'ostéoblastes, une région riche en CT (CxRE, *connexin responsive element*) a été identifiée dans le promoteur des gènes de



Figure 24 : Connexines et régulation de l'expression de gènes

Dans cette cellule hypothétique sont représentées des voies de signalisation qui pourraient associer les connexines à la régulation de l'expression de certains gènes. • = sites de phosphorylation. AKT, oncogène analogue viral de v-akt du thymome murin; Col I = Collagène I alpha-1; Cx32 = Connexine 32; Cx43 = Connexine 43; CxRE = Connexin-responsive element; Cyr61 = inducteur de l'angiogenèse riche en cystéine 61; ERK = Extracellular regulated MAP kinase; FGFR3 = Fibroblast growth factor receptor 3; Her-2 = Human Epidermal Growth factor Receptor-2; IGF-1 = insulin-like growth factor 1; IGFRBP-4 = insulin-like growth factor binding protein 4; MEK = MAP kinase-ERK kinase; MFG-E8 = Milk fat globule-EGF factor 8 ; nov = nephroblastoma overexpressed gene ; p21 = cyclin-dependent kinase inhibitor p27; PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase; Sp1 = facteur de transcription Sp1; Sp3 = facteur de transcription Sp3; Tr-Cx43, forme tronquée de la Cx43. D'après Crespin S et al., 2007.

l'ostéocalcine et du collagène de type I [Stains JP et Civitelli R, 2005]. Dans ce modèle, une stimulation extracellulaire de la croissance cellulaire induit une synthèse de seconds messagers capables de diffuser par les jonctions communicantes pour activer les voies de signalisation ERK et PI3/Akt. La translocation de ERK dans le noyau active des facteurs de transcription qui reconnaissent CxRE et induisent l'expression de l'ostéocalcine et du collagène de type I. D'autres exemples, dans des cellules HEK293, montrent que les effets de l'expression sur l'inhibiton de la prolifération cellulaire de la N-cadherine et de p21 sont augmentés lorsqu'ils sont co-exprimés avec la Cx43 [Kamei J *et al.*, 2003]. La perte de l'expression de la Cx32 a également été associée à la délocalisation de Dlgh1 (discs large homolog 1) de la zone sous-membranaire, où elle interagit normalement avec la Cx32, vers le noyau. Or, Dlgh1 est connu comme gène suppresseur de tumeur. Cette délocalisation dans le noyau pourrait aboutir à un dérèglement du cycle cellulaire [Duffy H *et al.*, 2007].

Fonctions des connexines non associées à la formation d'un canal

Des études récentes confèrent également aux connexines des rôles indépendants de la communication jonctionnelle. Ces rôles pourraient être associés à des voies de signalisation menant au noyau mais aussi à des interactions avec des protéines de la matrice extracellulaire.

Ainsi, dans des cellules d'ostéosarcome humain pour lesquelles l'expression de la Cx43 est forcée, la prolifération cellulaire est réduite sans aucune restauration de la communication jonctonnelle. Dans ce modèle, la Cx43 augmente l'expression de p27 en favorisant la dégradation de Skp2, protéine responsable de l'ubiquitination de p27 [Zhang YW et al., 2001; Zhang YW et al., 2003a,b]. La Cx43 interagit aussi avec la βcaténine, ce qui pourrait suggérer un lien avec la voie Wnt [Ai Z et al., 2000]. D'autres protéines, potentiellement impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, seraient capables d'interagir avec la Cx43. La perte d'expression de la Cx43 conduirait ainsi à une délocalisation de CCN3/Nov (Nephroblastoma Overexpressed) dans des cellules de gliome de rat, ce qui augmenterait la motilité cellulaire [Gupta N et al., 2001 ; Fu C et al., 2003]. La Cx43 serait également impliquée dans la motilité cellulaire en interagissant avec la N-cadhérine et p120 [Wei CJ et al., 2005]. Lors de la mise en place des neurones corticaux dans un modèle de rat, la Cx43 permettrait également la migration des neurones le long de la glie radiaire sans que la communication intercellulaire n'interviennent (Elias LA et al., 2007]. De plus, il est intéressant de noter que la Cx43, ou au moins une portion de celle-ci, a été localisée dans le noyau par des

études d'immunohistochimie dans différents modèles [de Feijter AW *et al.*, 1996 ; Moorby C et Patel M, 2001 ; Dang X *et al.*, 2003 ; Joshi-Mukherjee R *et al.*, 2007].

Tous ces éléments vont dans le sens d'une implication des connexines dans la régulation de la prolifération cellulaire par deux voies possibles. La première est associée à la capacité de communication des cellules par les jonctions communicantes, alors que la seconde dépendrait de l'expression des connexines sans rétablissement de la communication. Ainsi, lors de la cancérogenèse, l'altération de la communication jonctionnelle, la localisation aberrante des connexines ou leur perte d'expression peuvent être des éléments de la dérégulation du cycle cellulaire conduisant à une prolifération incontrôlée. Le fait que les connexines ne jouent plus leur rôle de régulateurs potentiels de la prolifération cellulaire dans les cellules cancéreuses sans pour autant que ce phénomène soit associé à des mutations des gènes de connexines explique pourquoi les connexines sont proposées comme étant des suppresseurs de tumeur de classe II [Bookstein R et Lee WH, 1991].

Connexines et système nerveux central

Il a été précédemment montré que les connexines présentaient un profil d'expression assez spécifique d'un tissu, et qu'au sein même de ce tissu, chaque type cellulaire pouvait présenter des associations particulières de connexines. Les études du système nerveux central se sont donc attachées depuis quelques années à identifier les connexines spécifiquement exprimées dans les neurones et les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales. Il a ainsi été mis en évidence des jonctions homocellulaires (entre cellules de même type) et des jonctions hétérocellulaires (entre cellules de types différents).

Distribution

Jusqu'à présent, six connexines ont été associées à des types cellulaires distincts du système nerveux central. Il s'agit de la Cx36 pour les neurones, des connexines 43, 30 et 26 pour les astrocytes et des connexines 29 et 32 pour les oligodendrocytes. D'autres connexines (Cx30.2, Cx31, Cx37, Cx45, Cx47 et Cx57) ont également été décrites dans le tissu nerveux avec une répartition limitée à certaines structures [Sutor B et Hagerty T, 2005]. Parmi les types de neurones, des différences de profil d'expression des connexines sont notables. Ainsi, si la Cx36 est la connexine majoritairement exprimée dans les neurones, la Cx45, largement exprimée pendant le développement, serait encore retrouvée dans des neurones de la rétine, du thalamus, d'une région de l'hippocampe et du cervelet chez le rongeur adulte [Maxeiner S *et al.*,



Figure 25 : Exemple d'un profil d'expression complexe des connexines dans la rétine de souris

L'expression de la Cx36 par les cônes (**C**) permet le couplage jonctionnel entre ces cellules. Il semblerait que les cônes et les bâtonnets (**R**, « rod ») soient également couplés, mais la connexine exprimée par les bâtonnets n'est pas identifiée. Les dendrites des cellules bipolaires OFF (**OFF CB**) présentent également une expression de Cx36. Les cellules horizontales (**H**), quant à elles, exprimeraient la Cx57. Dans des conditions de faible intensité lumineuse, le réseau des cellules amacrines AII (**AII**), qui est interconnecté par des canaux de Cx36, assure la transmission de signaux entre les cônes et les bâtonnets. Entre les cellules amacrines et les cellules bipolaires ON (**ON CB**) des canaux hétérotypiques sont mis en place entre Cx36 et Cx45.

D'après Theis M et al., 2005.

2003]. L'exemple de l'expression de différentes connexines par les cellules de la rétine est présenté en *Figure 25*. La Cx30.2 serait, quant à elle, spécifique d'interneurones [Kreuzberg MM *et al.*, 2008] et la Cx57 serait retrouvée dans les cellules horizontale de la rétine [Kihara AH *et al.*, 2008].

Les cellules microgliales ne semblent pas exprimer de connexine dans des conditions physiologiques mais pourraient exprimer la Cx43 lors de leur activation par des traitements par l'interféron gamma ou le TNF α [Eugenin EA *et al.*, 2001]. De plus, il a été mentionné que les cellules microgliales pourraient établir une communication jonctionnelle basée sur la Cx36 avec les neurones [Dobrenis K *et al.*, 2005].

Les astrocytes pourraient être répartis en deux classes en fonction de leur capacité à communiquer via les jonctions communicantes. Ainsi, les astrocytes exprimant des transporteurs à glutamate seraient capables de former des jonctions communicantes, alors que ceux exprimant des récepteurs aux glutamate resteraient non couplés [Theis M *et al.*, 2005]. Les connexines 30 et 43 sont largement exprimées dans les astrocytes couplés, alors que la Cx26 serait plus particulièrement exprimée par les astrocytes en contact avec la pie-mère ou avec les cellules épendymaires [Mercier F et Hatton GI, 2001]. Les connexines 30 et 43 formeraient des canaux homomériques et homotypiques fonctionnels, alors que les canaux hétéromériques et hétérotypiques ne le seraient pas [Orthmann-Murphy JL *et al.*, 2007]. Le couplage d'une centaine d'astrocytes au sein de *cluster* constitue un réseau complexe (*Figure 26*).

Les oligodendrocytes non-myélinisants ne seraient pas doués de communication intercellulaire, contrairement aux oligodendrocytes constituant la gaine de myéline. Dans ces derniers, la Cx32 semble préférentiellement confinée au niveau de la gaine de myéline, alors que la Cx29 serait retrouvée dans les régions internodales et juxta-paranodales (Figure 27). La Cx47, quant à elle, serait exprimée par les oligodendrocytes dans des canaux hétérotypiques permettant la communication directe entre astrocytes et oligodendrocytes [Theis M et al., 2005]. La communication jonctionnelle entre oligodendrocytes se limiterait souvent à un nombre restreint de cellules (quatre), ce qui suggère que les oligodendrocytes pourraient communiquer entre eux sur de plus longues distances via le couplage hétérocellulaire mis en place avec les astrocytes [Figure 26; Nagy JI et al., 2003]. Ce couplage entre astrocytes et oligodendrocytes reposerait sur la formation d'un canal hétérotypique de la Cx43 (astrocyte) et de la Cx47 (oligodendrocyte) ou de la Cx30 (astrocyte) et de la Cx32



Figure 26 : Expression des connexines dans les cellules gliales formant un syncytium

L'apposition de connexines exprimées par les astrocytes (**A**) et les oligodendrocytes (**O**) suggère fortement l'existence d'un couplage hétérocellulaire fonctionnel. Les connexines 30 et 43 sont exprimées dans les astrocytes. Les connexines 32 et 47 sont exprimées dans les oligodendrocytes. Parmi les associations proposées ci-dessus, il semblerait que l'association Cx43/Cx30 ne forme pas de canal fonctionnel [Orthmann-Murphy JL et al., 2007]. La répartition de la Cx29 nécessite de plus amples études et la présence de la Cx26 sous forme protéique reste encore controversée. Modifiés d'après Theis M et al., 2005.



Figure 27 : Différents types de communication homocellulaire (astrocytes-astrocytes) et hétérocellulaires (astrocytes-oligodendrocytes) Modifié d'après Orthmann-Murphy JL et al., 2007.

(oligodendrocyte) ; les autres configurations ne permettent pas l'élaboration d'un canal fonctionnel [Orthmann-Murphy JL *et al.*, 2007].

Fonctions physiologiques

Les connexines sont impliquées dans le développement et l'organisation du cerveau de mammifère en assurant la communication par synapses électriques alors même que les synapses chimiques finiront de s'établir après la naissance [Sutor B et Hagerty T, 2005]. Les connexines participeraient à la neurogenèse chez la souris par un fort couplage des neuroblastes qui permettrait le passage intercellulaire de métabolites. L'expression de jonctions communicantes constituées de Cx43 est indispensable au maintien des progéniteurs neuronaux corticaux chez la souris [Cheng A et al., 2004]. De plus, des hémicanaux propageraient des vagues calciques et laisseraient passer de l'ATP lors de l'initiation de la neurogenèse. Puis lors de la neurogenèse tardive, l'apparition de jonctions communicantes favoriserait le passage de signaux induisant la différenciation terminale [Bruzzone R et Dermietzel R, 2006]. Lors de la mise en place des couches corticales, les connexines exprimées par la glie radiaire assureraient le guidage des neurones jusqu'à leur position définitive dans le cerveau adulte. Une étude récente semble montrer que le rôle joué par les connexines serait indépendant de la formation de canaux jonctionnel et qu'elles agiraient plus par leur propriétés d'adhérence [Elias LA et al., 2007].

La Cx43 est exprimée dans les neurosphères en culture issues de la zone sousventriculaire du cerveau de souris, et dans les astrocytes qui en proviennent. L'inhibition de la communication jonctionnelle par l'acide γ-glycyrrhétinique entraîne une diminution de la densité cellulaire dans les neurosphères et une morphologie cellulaire anormale, ce qui présage un rôle important de la communication jonctionnelle dans la différenciation des cellules du système nerveux central [Duval N *et al.*, 2002].

Les synapses électriques entre les neurones ne constituent pas un élément indispensable au fonctionnement neuronal chez l'adulte, les souris invalidées pour le gène de la Cx36 étant capables de se développer. Le passage de colorant entre neurones est peu important, même en présence de Cx36, ce qui suggère un faible couplage dans la situation normale [Söhl G *et al.*, 2005]. Cependant, ces synapses électriques présentent l'originalité d'une communication bidirectionnelle qui permettrait la synchronisation des réseaux neuronaux [Connors BW et Long MA, 2004]. Cette synchronisation s'avèrerait importante dans l'hippocampe puisque les souris invalidées pour le gène de la Cx36 présentent, malgré leur développement apparemment normal,



Figure 28 : Modèle hypothétique de propagation des vagues calciques faisant intervenir des hémicanaux de connexines Modifié d'après Stout C et al., 2004.

des difficultés dans la reconnaissance d'objet, traduisant un dysfonctionnement dans le processus d'apprentissage [Frisch C *et al.*, 2005].

Chez l'adulte, les connexines exprimées dans les astrocytes participent à l'homéostasie potassique, à la propagation de vagues calciques et à la neuroprotection.

Ainsi, lorsque la concentration extracellulaire en potassium augmente, lors de l'activité neuronale, le potassium en excès est capté par les astrocytes via des canaux potassiques voltage-dépendants, la pompe Na⁺-K⁺ et le co-transporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ [Kozoriz MG *et al.*, 2006]. Ceux-ci, via les jonctions communicantes, assurent alors la dilution du potassium au sein du syncytium formé par les astrocytes [Mobbs P *et al.*, 1988]. L'utilisation de coupes d'hippocampe délétées pour la Cx43 et la Cx30 a montré que, en absence de jonctions communicantes, le tamponnement du potassium était moins efficace. Cependant, il apparait que ce phénomène mettrait également en jeu d'autres mécanismes indépendants de la formation de canaux intercellulaires [Wallraff A *et al.*, 2006]. Les oligodendrocytes participeraient également à la capture du potassium extracellulaire par des canaux potassiques voltage-dépendants qui agiraient de concert avec les connexines 32 et 47 [Menichella DM *et al.*, 2006].

Les jonctions communicantes ont également été proposées comme un élément de propagation des vagues calciques observables dans les astrocytes lors de l'activation neuronale [Charles AC *et al.*, 1991]. Un élément allant dans ce sens consiste en l'apparition de vagues calciques dans des cellules de gliomes forcées à réexprimer la Cx43 [Charles *et al.*, 1992]. La propagation de ces vagues calciques pourrait aussi faire appel à une communication passant par le milieu extracellulaire, la propagation des vagues calciques étant également observable dans des cultures d'astrocytes où les cellules ne sont pas en contact direct [Hassinger TD *et al.*, 1996]. L'un des mécanismes proposés consiste en l'activation de récepteurs purinergiques P2Y par l'ATP qui augmente la synthèse d'IP3 et la libération des stocks internes de calcium. L'IP3 et les ions calcium diffuseraient par les canaux intercellulaires mais, en parallèle, ceci entraînerait l'ouverture d'hémicanaux qui laissent passer de l'ATP. Ce dernier stimule alors de proche en proche des récepteurs P2Y des cellules adjacentes [*Figure 28*, Stout C et Charles A, 2003].

Les astrocytes sont capables d'agir sur la survie neuronale par deux systèmes opposés. Ainsi, en libérant certains facteurs toxiques (radicaux libres, NO, glutamate), il peuvent conduire à la mort des neurones, alors qu'en assurant la capture ou la libération de facteurs extracellulaires, ils participent au bon fonctionnement des réseaux neuronaux [Rouach N *et al.*, 2002]. L'expression de la Cx43 par les astrocytes a été

associée aux deux mécanismes. Ainsi, dans des modèles de co-cultures neuronesastrocytes, il semble que l'expression de la Cx43 dans les astrocytes soit un facteur favorable à la survie neuronale en cas d'exposition à des doses toxiques de glutamate [Ozog MA *et al.*, 2002]. Mais, dans un modèle de coupes d'hippocampe maintenues en culture, l'inhibition des canaux intercellulaires (mais aussi des hémicanaux) par le carbénoxolone préserve l'induction de la caspase 3 et la mort neuronale [de Pina-Benabou MH *et al.*, 2005].

Altérations pathologiques

Atteintes neurodégénératives

La Cx43, normalement exprimée par les astrocytes ou la microglie activée, présente une altération de son expression dans la maladie d'Alzheimer [Loring JF *et al.*, 2001]. Par des mécanismes non identifiés, son expression serait augmentée au niveau des plaques β-amyloïdes caractéristiques de la maladie [Nagy JI *et al.*, 1996]. Cette augmentation d'expression a également été décrite dans le noyaux caudé de cerveaux de patients atteints de la maladie de Huntington [Vis JC *et al.*, 1998]. Dans un modèle animal de sclérose associant inflammation et démyélinisation, l'expression de la Cx43 est très fortement réduite au niveau de la substance blanche de la moelle épinière [Brand-Schieber E *et al.*, 2005].

Ischémie / Infarctus

La communication jonctionnelle et les hémicanaux pourraient propager des signaux importants de mort ou de survie dans les phénomènes de mort cellulaire induits par l'ischémie [Contreras JE *et al.*, 2004]. Par des mécanismes non encore identifiés, la fermeture des canaux intercellulaires pourrait préserver l'environnement cérébral en cloisonnant la zone cérébrale lésée [Nakase T *et al.*, 2003], alors que l'ouverture d'hémicanaux dans des conditions de stress cellulaire conduirait à la libération de facteurs neurotoxiques [Evans WH *et al.*, 2006].

<u>Epilepsie</u>

Le rôle de la communication jonctionnelle dans l'épilepsie est encore controversé. Le couplage électrique entre neurones pourrait jouer un rôle important dans la propagation des vagues épileptiformes. Dans des co-cultures de neurones et d'astrocytes, l'inhibition de la communication jonctionnelle entre astrocytes conduit à une diminution des oscillations calciques observables dans les neurones [Fujita K *et al.*, 1998]. Dans des modèles animaux épileptiques, la diminution de l'ARNm de la Cx36 a

été observée dans l'hippocampe [Söhl G *et al.*, 2000]. Des études chez des patients épileptiques indiquent que le taux d'ARNm de la Cx43 est augmenté [Naus CC *et al.*, 1991]. La même observation a également été réalisée chez des patients présentant des crises d'épilepsie suite au développement d'une tumeur cérébrale. La Cx43 est alors augmentée au niveau de la gliose réactionnelle, alors que la Cx32 ne semble pas altérée dans cette situation pathologique [Aronica E *et al.*, 2001].

<u>Tumeurs</u>

Les travaux portant sur l'expression des connexines dans les tumeurs gliales chez l'Homme ont été réalisées en se référant à la classification de l'OMS (voir page 24). Trois études indiquent que l'expression de la Cx43, connexine normalement retrouvée dans les astrocytes et non dans les oligodendrocytes, serait inversement corrélée au grade tumoral [Huang RP *et al.*, 1999 ; Soroceanu L *et al.*, 2001 ; Pu P *et al.*, 2004]. Ainsi, les tumeurs de bas grade exprimeraient encore la Cx43 alors que les tumeurs de haut grade ne l'exprimeraient pas ou peu. De plus, des expériences de FRAP réalisées sur des astrocytes issus des tumeurs montrent que le couplage jonctionnel est d'autant plus fort que le grade tumoral est faible [Soroceanu *et al.*, 2001]. L'expression de la Cx43 a également été étudiée dans des méningiomes [Sato K *et al.*, 1997]. La forme phosphorylée P2, souvent associée à une Cx43 fonctionnelle, n'est que rarement retrouvée dans les méningiomes atypiques ou anaplasiques associés à un mauvais pronostic.

Le rôle de la Cx43 comme suppresseur de tumeur a été largement étudié *in vitro* sur des lignées de gliomes d'origines murine ou humaine. La lignée C6 a été obtenue chez le rat par exposition au N,N'-nitroso-méthylurée [Benda P *et al.*, 1968]. Elle constitue un modèle de choix pour l'étude de la prolifération et de l'invasion des glioblastomes [Grobben B *et al.*, 2002]. Cette lignée n'exprime pas la Cx32 et peu la Cx43 [Bond SL *et al.*, 1994] et présente donc un très faible couplage jonctionnel. La transfection des cellules C6 par l'ADNc de la Cx43 conduit à une ré-expression de la protéine dans le cytoplasme ainsi qu'à la membrane plasmique, à un rétablissement de la communication jonctionnelle et à une diminution du taux de prolifération dépendante du niveau d'expression de la connexine [Zhu D *et al.*, 1991]. La co-culture de cellules C6 avec des cellules C6 exprimant la Cx43 conduirait à une diminution de la prolifération cellulaire dépendante du niveau d'expression de la Cx43 par les cellules C6 entraînerait des modifications dans l'expression de la Cx43 par les cellules C6 entraînerait des modifications dans l'expression de la Cx43 par les cellules C6 entraînerait des modifications dans l'expression de certains gènes dont des facteurs sécrétés tels que Cyr61/CCN1, l'ostéopontine [Naus CC *et al.*, 2000], Nov/CCN3 [Gupta N *et al.*, 2001 ; Fu C *et al.*,
2004] qui pourraient moduler le phénotype tumoral des cellules. Dans des lignées d'origine humaine, l'expression de la Cx43 conduit à une diminution de la prolifération cellulaire ; le rétablissement de la communication jonctionnelle n'est pas pour autant indispensable [Huang RP *et al.*, 1998]. Le mode d'action de la Cx43 pourrait passer par une diminution de l'expression d'une cytokine, MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) [Huang R *et al.*, 2002] ou dans certaines conditions de bas sérum par un inhibiteur de l'apoptose, bcl-2 [Huang R *et al.*, 2001]. La Cx30, exprimée par les astrocytes, a également été étudiée. Lorsqu'elle est exprimée dans certaines cellules de gliome, il semblerait qu'elle soit elle aussi capable d'inhiber la prolifération cellulaire [Princen F *et al.*, 2001].

Le rôle de la Cx43 comme inhibiteur de la prolifération cellulaire suscite néanmoins des controverses pour les cellules de gliomes [Singh MV *et al.*, 1997a,b]. La co-culture d'astrocytes avec des cellules de gliomes murins exprimant la Cx43 se traduirait par une transformation phénotypique des astrocytes [Zhang W *et al.*, 1999], et ces cellules sécrèteraient plus MMP-2 et MMP-9, qui jouent un rôle déterminant dans la capacité d'invasion des gliomes, que les C6 parentales [Zhang W *et al.*, 2003]. Des résultats allant également dans ce sens ont été obtenus avec des cellules d'astrocytomes en co-culture avec des astrocytes [Lin JH *et al.*, 2002 ; Oliveira R *et al.*, 2005]. L'expression résiduelle de la Cx43 par les cellules tumorales favoriserait ainsi la migration des cellules tumorales et l'invasion du tissu environnant.

Comme pour d'autres types de tumeurs, l'utilisation de gène suicide a été proposé comme perspective thérapeutique des tumeurs gliales. Celle-ci repose le plus souvent sur la transfection de cellules par HSV-tk et l'utilisation d'une drogue cytotoxique, le ganciclovir. Les jonctions communicantes pourraient alors favoriser la diffusion de métabolites toxiques ou de signaux apoptotiques. Cet effet bystander est en effet augmenté dans des cultures primaires de glioblatomes quand les cellules expriment la Cx43 [Burrows FJ et al., 2002; Asklund T et al., 2003] ou lorsque des cellules de gliomes (9L, C6) exprimant le gène suicide sont également transfectées par la Cx43 [Sanson M et al., 2002]. L'efficacité de l'effet bystander pourrait être amplifiée en fonction de l'expression résiduelle de la Cx43 dans les tumeurs gliales [Shinoura N et al., 1996]. D'autres études indiquent cependant que l'expression de Cx43 par les cellules cibles de la thérapie HSV-tk/ganciclovir jouerait un rôle crucial contrairement à l'expression de la Cx43 par les cellules exprimant le gène tk [Namba H et al., 2001]. La thérapie génique HSV-tk/ganciclovir s'est avérée peu efficace in vivo du fait du faible taux de transfection des cellules exprimant le gène suicide. Pour pallier à ce faible taux de transfection, le choix du vecteur est important [Colombo BM et al., 1995 ; Cirenei N



Figure 29 : Profil d'expression des ARNm de la Panx1 (rouge) et de la Panx2 (bleu) dans le cerveau de rat.

A défaut de cartographie établie chez l'Homme, l'expression des pannexines 1 et 2, détectée par hybridation in situ chez le jeune rat (15 jours), est ici présentée. Modifié d'après Barbe MT et al., 2006. *et al.*, 1998]. Une autre possibilité serait d'augmenter l'effet bystander lié aux jonctions communicantes. De nombreuses cellules tumorales n'étant plus couplées, certains cherchent à augmenter l'expression des connexines et la formation de jonctions communicantes par des traitement tels que le *dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate* [Robe PA *et al.*, 2000], le *n-butyrate* [Robe PA *et al.*, 2004] ou le *4-phenylbutyrate* [Ammerpohl O *et al.*, 2004]. Une autre approche a consisté en l'utilisation de cellules souche « *migratory neural stem cells* ». Celle-ci s'est avérée efficace en cultures primaires d'astrocytome si les cellules cibles expriment suffisamment la Cx43 [Uhl M *et al.*, 2005].

Pannexines et système nerveux central

Chez l'Homme, la Panx2 est la pannexine la plus fortement exprimée au niveau cérébral d'après des études en Northern blot. La Panx1 est également exprimée en plus faible quantité, alors que la Panx3 n'a été retrouvée qu'en très faible quantité dans l'hippocampe adulte [Baranova A et al., 2004]. Chez le rongeur, une cartographie de l'expression des pannexines au cours du développement a été réalisée au niveau cérébral [Barbe MT et al., 2006]. Il apparait que la Panx1 montre un pic d'expression entre le dix-huitième jour in utero et le premier jour après la naissance. Au contraire, la Panx2 voit son expression augmentée après la naissance avec un pic au guinzième jour [Figure 29, Ray A et al., 2005]. Les transcrits des pannexines 1 et 2 ont été retrouvés dans des cellules exprimant le plus souvent le marqueur neuronal NeuN. Les pannexines ont été retrouvées dans des régions où le couplage jonctionnel est particulièrement fort, mais aussi dans des régions cérébrales où le couplage jonctionnel est peu décrit, laissant supposer un rôle pour des hémicanaux de pannexines. Des différences ont été observées dans le profil d'expression des deux pannexines, la Panx1 étant détectée au niveau du corps calleux alors que la Panx2 est absente [Bruzzone R et al., 2003]. Les transcrits de la Panx1 et de la Panx2 ont été détectés dans des cultures primaires d'astrocytes murins [Lai CP et al., 2007]. Le rôle des pannexines est encore mal défini. Les canaux jonctionnels, établis à partir de hétéromériques (Panx1-Panx2), pourraient intervenir « pannexons » dans la synchronisation des interneurones inhibiteurs et excitateurs ; la Cx36 n'est, quant à elle, exprimée que dans les interneurones inhibiteurs [Pais I et al., 2003]. La Panx1 a également été proposé comme support moléculaire des hémicanaux libérant de l'ATP lors de la propagation de vagues calcigues. En effet, les hémicanaux de Panx1 pourraient être activés par des concentrations physiologiques de calcium intracellulaire contrairement aux hémicanaux de Cx43 qui nécessitent une faible concentration

calcique extracellulaire et une forte dépolarisation ou un stress mécanique important [Locovei S *et al.*, 2006]. Des fonctions attribuées aux hémicanaux de Cx43 sont ainsi de nouveau étudiées en considérant la possibilité d'un rôle joué par les pannexines. L'expression particulièrement forte de la Panx1 dans le noyau accumbens, structure qui pourrait présenter une désynchronisation dans la schizophrénie, laisse ainsi supposer que des canaux jonctionnels composés de Panx1 pourrait jouer un rôle dans cette région [Barbe MT *et al.*, 2006]. L'implication de la Panx1 dans le processus tumoral a été étudiée dans une lignée de gliome C6. Il apparait que l'expression de cette protéine conduit à une diminution de la prolifération des cellules, de leur mobilité et de la taille des tumeurs induites chez l'animal immunodéprimé [Lai CP *et al.*, 2007].

Objectifs de l'étude

Ce travail de thèse, basé sur des approches *in situ* et *in vitro*, avait pour but de déterminer si Cx43 est impliquée dans le développement des tumeurs gliales humaines.

Dans un premier temps, il s'agissait d'étudier Cx43 dans des prélèvements tumoraux obtenus par exérèses chirurgicales, afin de confirmer une éventuelle corrélation entre l'expression de Cx43 et les différents grades tumoraux. En se basant sur des travaux antérieurs [Huang RP *et al.*, 1999 ; Soroceanu L *et al.*, 2001 ; Pu P *et al.*, 2003], notre objectif était ici de préciser la localisation de la protéine dans un plus grand nombre d'échantillons en étudiant tous les grades des tumeurs astrocytaires retrouvées chez l'adulte.

Une perte d'expression de la protéine ayant déjà été décrite dans les tumeurs de haut grade, le second objectif était d'établir des cultures cellulaires afin de faire exprimer Cx43 et des formes tronquées de la protéine dans ces cellules. Cet objectif n'ayant pu être atteint, nous nous sommes reportés sur des lignées de gliomes humains afin de leur faire exprimer différentes formes de Cx43. Certaines formes, associées à une absence de communication intercellulaire, ont permis d'étudier l'implication de Cx43 dans la prolifération et de la migration cellulaires indépendamment de ce type de communication. Les constructions de Cx43 réalisées étaient : la protéine native, Cx43 amputée de son extrémité carboxyle et deux séquences d'acides aminés correspondant à l'extrémité carboxyle de la protéine. Ces constructions, insérées dans un vecteur d'expression rétroviral, ont été utilisées pour transduire les lignées LN18, U87 et U251. L'effet de l'expression des différentes constructions a ensuite été observé sur le comportement prolifératif et migratoire des cellules tumorales.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Etude <i>in situ</i>	79
Sélection des échantillons et traitement initial	79
Tissue micro-array	84
Préparation des échantillons	85
Immunohistochimie	85
Observation des échantillons en microscopie	87
Microscopie optique	87
Microscopie confocale	87
Western blot à partir d'échantillons congelés	87
Etude <i>in vitro</i>	91
Cultures cellulaires	92
Culture d'explants	92
Culture de lignées cellulaires	92
Obtention de lignes cellulaires exprimant différentes constructions de Cx43	94
Séquence codante de la Cx43 humaine	94
Amplification par PCR	94
Plasmide pMSCVpuro	96
Insertion de séquences codantes de Cx43 dans un plasmide pMSCVpuro	98
Culture de bactéries compétentes	98
Purification des ADN plasmidiques	100
Validation des constructions de Cx43	100
Amplification des constructions de Cx43	102
Séquençage des constructions de Cx43	103
Production de particules rétrovirales contenant les séquences des différe	ntes
constructions de Cx43	104
Transduction des cellules LN18, U87 et U251	105
Caractérisation des lignées cellulaires exprimant différentes constructions de Cx43	
Immunocytochimie	106
Western blot	107
Courbes de prolifération	108
Wound healing assay	108
Transwell assay	109
Soft agar assay	109
Preloading assay	111

Etude in situ

Cette étude a été menée en collaboration avec les services de neurochirurgie et d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Poitiers. La partie technique a principalement été réalisée au service d'anatomie et cytologie pathologiques avec l'assistance du personnel du CHU et l'expertise des Pr Levillain et Fromont.

Sélection des échantillons et traitement initial

Les tumeurs gliales étudiées proviennent d'exérèses chirurgicales réalisées au CHU de Poitiers. Les prélèvements peuvent être congelés à -80°C ou inclus en paraffine. Avant inclusion, ils sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% pendant douze à vingt-quatre heures.

Pour cette étude, toutes les études immunohistochimiques ont été réalisées sur des coupes incluses en paraffine. Des coupes d'échantillons entiers ont été utilisées pour vingt patients. Il s'agit de douze tumeurs de grade IV, de quatre tumeurs de grade III et de trois tumeurs de grade II (*Tableau X*). Afin de préserver les stocks de tissus tumoraux, nous avons eu recours à la technique de *tissue micro-array* (TMA). Un premier TMA disponible au service d'anatomie et cytologie pathologiques a permis l'étude de la Cx43 sur des tumeurs gliales dont des oligodendrogliomes et des tumeurs mixtes (*Tableau XI*). Ce TMA compte vingt-trois tumeurs de grade IV, sept tumeurs de grade III et six tumeurs de grade II. A ces échantillons s'ajoutent également huit tumeurs de grade B d'après la classification de l'hôpital Sainte-Anne (tumeurs de grade II ou III pour la classification de l'OMS).

Le second TMA a été réalisé spécifiquement pour cette étude en sélectionnant les tumeurs au contingent oligodendrocytaire le plus faible possible. Il comporte vingtdeux tumeurs de grade IV, douze de grade III, vingt de grade II et sept tumeurs présentant des zones de bas grade (II) et d'autres de haut grade (III ou IV). Ce dernier TMA contient également des échantillons non cancéreux de foie, de peau et de cœur utilisés comme témoins pour certaines de nos études (*Tableau XII*).

N°	Diagnostic	Grade	Renseignements	Etude	Sexe	Age
anapath			complémentaires			
410697	astrocytome gémistocytique	П		IF	3	53
450707	astrocytome	П		WB	?	?
412882	astrocytome fibrillaire microkystique	II		IF	8	16
459592	oligoastrocytome	II		WB	?	?
417826	oligoastrocytome	II		IF	8	34
408874	oligodendrogliome	III	Grade B d'après la classification de	IF	8	56
			l'hôpital Sainte-Anne		-1	
416902	oligodendrogliome anaplasique	III		IF	6	51
418794	astrocytome anaplasique	III		IF <i>,</i> WB	ď	58
453064	oligodendrogliome	III	Grade B d'après la classification de l'hôpital Sainte-Anne	IF	Ŷ	44
417826*	oligoastrocytome	ll vers	Classification de l'hôpital Sainte-	WB	8	34
		111	Anne : A vers B			
451325*	oligoastrocytome	III	Grade B d'après la classification de l'hôpital Sainte-Anne	WB	3	41
419170	glioblastome multiforme	IV		WB	?	?
408195	glioblastome	IV		IF	Ŷ	?
408698	glioblastome	IV		IF, WB	3	59
409261	glioblastome	IV		IF	Ŷ	51
410084	glioblastome	IV		IF	8	78
410596	glioblastome	IV		IF	8	58
411456	glioblastome	IV		IF, WB	Ŷ	45
412156	glioblastome	IV		IF	8	61
414263	glioblastome	IV		IF	8	68
414444	glioblastome	IV		IF <i>,</i> WB	Ŷ	67
415651	glioblastome	IV		IF <i>,</i> WB	8	40
454859	glioblastome	IV		IF	Ŷ	67
454693	glioblastome	IV		WB	?	?
452021	glioblastome	IV		WB	?	?
455927	glioblastome	IV		IF	8	64
Témoin						
457 335	tissu adjacent à la tumeur considéré			IF	?	?
	comme sain d'après les critères					
	anatomopathologiques					

Tableau X : Echantillons tumoraux étudiés sur coupes entières ou en western blot,
provenant d'exérèses chirurgicales de tumeurs gliales humainesIF = étude en immunofluorescence d'échantillons inclus en paraffine. WB = étude en western blot

IF = étude en immunofluorescence d'échantillons inclus en paraffine. *WB* = étude en western blot d'échantillons congelés.* Echantillons pour lesquels il existe également une étude en immunohistochimie sur le « tissue micro array » 2.

N°	Diagnostic	Grade	Renseignements complémentaires	Sexe	Age
anapath					
444001	GBM	IV		3	60
444969	GBM	IV		8	51
444430	GBM	IV		8	43
444741	GBM	IV		8	62
444819	GBM	IV		Ŷ	60
443952	GBM	IV		4	69
479275	glioblastome	IV		Ŷ	61
447824	glioblastome	IV		8	63
487835	glioblastome	IV		8	53
487162	glioblastome	IV		8	73
486531	glioblastome	IV		Ŷ	61
445255	glioblastome	IV		Ŷ	70
445210	glioblastome	IV		8	56
483495	glioblastome	IV	SF12*	Ŷ	42
445067	glioblastome	IV		3	75
439721	glioblastome	IV		Ŷ	50
444394	glioblastome	IV		3	52
441419	glioblastome	IV		3	61
441199	glioblastome	IV		3	62
446935	glioblastome	IV		3	72
484789	glioblastome	IV		3	57
458539	glioblastome	IV		Ŷ	61
443669	glioblastome	IV		Ŷ	42
447096	oligoastrocytome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	3	65
479281	oligoastrocytome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ŷ	71
447371	oligoastrocytome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ŷ	68
440342	oligoastrocytome anaplasique	Ш		3	42
443651	oligoastrocytome anaplasique	Ш		Ŷ	22
446982	oligodendrogliome	III	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	ð	45
447245	oligodendrogliome	III	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	ð	73
470841	oligodendrogliome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	ð	45
			récidive	0	-
450476	oligodendrogliome	Ш	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	3	43
482034	oligodendrogliome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ŷ	47
			récidive : SF9*	I	
453759	oligodendrogliome	Ш	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ŷ	63
445495	oligodendrogliome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ý	47
453515	oligodendrogliome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	ð	68
453064	oligodendrogliome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	Ŷ	59
			récidive	I	
486218	oligoastrocytome anaplasique	Ш		3	40
459238	oligodendrogliome	11	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : A	ð	40
459082	oligodendrogliome	Ш		ð	44
460749	oligoastrocytome		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B	ð	50
481562	astrocytome fibrillaire		Classification de l'hôpital Sainte-Anne : B :	Ŷ	22
		÷	SF7*	T,	-
446504	oligoastrocytome	П	-	3	67
447991	oligoastrocytome	П	Classification de l'hôpital Sainte-Anne : A	3	37
440298	oligoastrocytome	I	• -	Ŷ	?
467953	gangliogliome	?		3	37
481886	gangliogliome	?	Récidive de 467953 ; SF8*	Ŷ	38

Tableau XI : Cohorte de patients constituant le « tissue micro-array » 1Les échantillons proviennent d'exérèses chirurgicales de tumeurs gliales humaines. * : une partie de l'échantillon prélevé chez le patient a fait l'objet d'une culture d'explant.

N°	Diagnostic	Grade	Renseignements	Sexe	Age
anapath			complémentaires		
389993 B	astrocytome fibrillaire		possible mauvaise évolution	8	21
389993 N	astrocytome fibrillaire		possible mauvaise evolution	0.	21
390547B	astrocytome fibrillaire microkystique			б [.] 1	36
391612 B	astrocytome	II	calcification	б [.]	50
393974 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		С 1	62
398345 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		ර	12
401981 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		6	35
401981 N	astrocytome fibrillaire microkystique	II		6	35
402034 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		Ŷ	44
402034 N	astrocytome fibrillaire microkystique	II		Ŷ	44
402118 B	astrocytome gémistocytique	II		Ŷ	47
402164 B	astrocytome	II		8	54
404180 B	astrocytome fibrillaire microkystique	П		ð	36
404180 N	astrocytome fibrillaire microkystique	II		3	36
404787 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		4	20
404787 N	astrocytome fibrillaire microkystique	II		4	20
405531 B	astrocytome fibrillaire microkystique	П	récidive (364120)	Ŷ	38
405531 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II	récidive (364120)	9	38
406094 B	astrocytome protoplasmique et fibrillaire	II	avec contingent oligodendrocytaire	9	41
406094 N	astrocytome protoplasmique et fibrillaire	II	avec contingent oligodendrocytaire	9	41
406187 B	astrocytome fibrillaire microkystique	П	406342	3	66
409322 B	astrocytome fibrillaire microkystique	П		3	41
392553 H	astrocytome anaplasique	III		3	22
397480 H	astrocytome anaplasique	III		9	62
404594 H	astrocytome anaplasique ou glioblastome	III		9	62
404594 N	astrocytome anaplasique ou glioblastome	III		9	62
404756 H	astrocytome anaplasique	III		3	55
405077 H	astrocytome anaplasique	III		3	33
403493 B	glioblastome	IV	zones de grade moins élevé	3	65
403493 H	glioblastome	IV	zones de grade moins élevé	3	65
403493 N	glioblastome	IV	zones de grade moins élevé	8	65
405183 H	GBM	IV		Ŷ	67
408195 H	glioblastome	IV		Ŷ	?
408575 B	glioblastome	IV	zone de cellularité plus faible	3	66
408575 H	glioblastome	IV	zone de cellularité plus faible	3	66
409509 H	glioblastome	IV		Ŷ	64
409571 H	glioblastome à cellules géantes	IV		3	67
398734 B	astrocytome fibrillaire microkystique	ll vers III		?	67
	transformation en anaplasique				
400592 B	astrocytome fibrillaire microkystique avec	ll vers III		3	66
400502.11	plages anaplasiques			7	C C
400592 H	astrocytome fibrillaire microkystique avec	li vers ili		ð	66
400709 B	astrocytome fibrillaire avec zone de	ll vers III		Z	50
4007050	transformation anaplasique			0	50
400709 H	astrocytome fibrillaire avec zone de	ll vers III		3	50
	transformation anaplasique				
403817 B	astrocytome avec foyer anaplasique	ll vers III		9	31
403817 H	astrocytome avec foyer anaplasique	ll vers III		Ŷ	31
403817 N	astrocytome avec foyer anaplasique	ll vers III		Ŷ	31
407204 B	astrocytome gémistocytique en cours de	ll vers IV		Ŷ	73
	transformation vers IV			0	
407204 H	astrocytome gémistocytique en cours de	ll vers IV		¥	73
	transformation Vers IV				

N°	Diagnostic	Grade	Renseignements	Sexe	Age
anapath	ŭ		complémentaires		U
407204 N	astrocytome gémistocytique en cours de transformation vers IV	ll vers IV		Ŷ	73
410697 B	astrocytome gemistocytique	II	CK- GFAP+ PS100+	3	53
412882 B	astrocytome fibrillaire microkystique	II		3	16
414003 B	astrocytome fibrillaire	II		3	76
414407 B	astrocytome pléomorphe	II		3	16
417551 H	astrocytome anaplasique	III		Ŷ	56
419972 H	prolifération astrogliale primitive	III	avec prolifération endothéliocapillaire	S	42
439538 H	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B	8	57
451325 H	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B	8	41
469547 H	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B ; tumeur glioneuronale	Ŷ	33
471829 H	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B	2	30
476884 H	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B : récidive (434891)	2	44
476884 N	oligoastrocytome	III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : B : récidive (434891)	2	44
409881 H	GBM	IV	, , , ,	Ŷ	67
410051 H	GBM	IV		Ŷ	74
410084 H	glioblastome à cellules géantes	IV		3	78
411765 H	glioblastome à cellules géantes	IV		Ŷ	62
411860 H	glioblastome avec oligo	IV		Ŷ	69
412194 H	GBM	IV		Ŷ	62
413079 H	GBM	IV	éléments lymphocytoïdes	Ŷ	64
413443 H	GBM	IV		Ŷ	69
414263 H	glioblastome	IV		ð	68
415009 H	glioblastome	IV		3	66
415500 H	GBM	IV		3	59
415741 H	prolifération astrogliale primitive	IV	contingent oligodendrocytaire CD45+	8	64
416104 H	glioblastome	IV		3	65
417412 H	glioblastome	IV	CD45- CK- PS100- GFAP+	ð	39
420514 H	GBM	IV		3	61
420514 H	GBM	IV		ð	61
417826 B	oligoastrocytome	ll vers III	Classification de l'hôpital Sainte- Anne : A vers B	3	34
417826 H	oligoastrocytome	ll vers III	Classification de l'hôpital Sainte-	3	34
434891 B	oligoastrocytome de grade B	ll vers III		3	41
434891 H	oligoastrocytome de grade B	ll vers III		8	41
Témoins	foio			2	2
520185 519151	neau			r 2	r 2
491754	cœur			?	?

Tableau XII : Cohorte de patients constituant le « tissue micro-array » 2

Les échantillons proviennent d'exérèses chirurgicales de tumeurs gliales humaines. Les lettres suivant les numéros de référencement correspondent au diagnostic anatomopathologique : **N** pour du tissu histologiquement normal, à proximité de la tumeur ; **B** pour le tissu dont le diagnostic s'apparente à une tumeur de bas grade ; **H** pour le tissu dont le diagnostic s'apparente à une tumeur de haut grade.



Figure 30 : Réalisation d'un « tissue micro-array »

A partir des diagnostics établis sur les prélèvements chirurgicaux et référencés grâce au logiciel de gestion des examens anatomo-pathologiques (APIX V6), les échantillons inclus en paraffine présentant une taille suffisante sont sélectionnés pour constituer une cohorte. Une carotte de 0,6 mm de diamètre et de 2 mm de long est réalisée dans le bloc donneur, puis elle est insérée dans le bloc receveur. Cette procédure est renouvelée pour chaque échantillon en triplicata.

D'après Giltnane JM et Rimm DL, 2004.

Tissue micro-array

Cette technique présente l'avantage de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons sur une même lame et un plus grand nombre de marqueurs en travaillant sur de petites portions choisies de tissus. Le TMA a été conçu sur le logiciel *TMA designer* et réalisé sur le *tissue microarrayer 1997-2005 n° de série 628 (Beecher Instrument Inc.)* compatible avec l'interface *TMA Alphélys interface MTA Booster OI version 1.01.* Celle-ci permet l'acquisition et le repérage des spots sur les blocs d'inclusion. Des carottes de 0,6 mm de diamètre sont prélevées sur les blocs d'échantillons tumoraux conservés en paraffine et intégrés dans le bloc de TMA (*Figure 30*).

Préparation des échantillons

A partir de pièces opératoires incluses en paraffine, des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome puis étalées sur lames.

Les lames font l'objet d'un traitement spécifique visant à déparaffiner les coupes et à restaurer les sites antigéniques. Elles sont ainsi rincées trois fois cinq minutes dans un bain d'*Histosol (Shandon)* puis réhydrater dans des bains successifs d'éthanol (95, 80 et 75%) de cinq minutes chacun. Après rinçage des lames à l'eau désionisée, le démasquage antigénique est réalisé dans un tampon citrate (acide citrique 2 mM, pH 6,0 ; citrate de sodium 8 mM) chauffé à 98°C pendant deux minutes. Les lames sont laissées quinze minutes dans le tampon citrate avant d'être rincées avec un tampon Tris (*Wash buffer* S3006, *DakoCytomation*) et traitées cinq minutes avec de l'eau oxygénée 3%. S'ensuit un nouveau rinçage dans du tampon Tris.

Immunohistochimie

Les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt sont dilués dans une solution *ChemMate Ab diluent* (S2022, DakoCytomation). Selon les anticorps, l'incubation se fait une nuit à 4°C ou, trente minutes à une heure, à température ambiante (*Tableau XIII*). Après trois rinçages de cinq minutes dans du tampon Tris, deux protocoles sont réalisés selon que les observations sont faites en microscopie optique ou en microscopie à fluorescence (*Figure 31*).

Dans le premier cas, le kit *ChemMate Detection (DakoCytomation)* est utilisé suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, les lames sont incubées dans une solution d'anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin pendant quinze minutes, puis dans une solution composée d'un complexe streptavidine-peroxydase, de nouveau

Anticorps primaires	Espèce	Epitope	Utilisation	Provenance
Anti-Cx43	Souris, monoclonal	Dirigé contre le peptide 250-272	IHC 1/100 [°] Western blot 1/1000 [°]	Interchim
Anti-Cx43	Lapin, polyclonal	Dirigé contre le peptide 363-380 de la Cx43 de rat	IHC 1/2000 [°] Western blot 1/8000 [°]	SIGMA
Anti-GFAP	Lapin, polyclonal	Obtenu à partir de la protéine bovine	IHC 1/200 [°] Western blot 1/15000 [°]	Dako Cytomation
Anti-CD45	Souris, monoclonal	Non communiqué	IHC 1/200 ^e (30 minutes, température ambiante)	Dako Cytomation
Anti-Ki67	Souris, monoclonal	Dirigé contre Ki67 humain	IHC 1/100 ^e (30 minutes, température ambiante)	SIGMA
Anti-Ki67	Lapin, polyclonal	Dirigé contre le peptide 2641-2940 de Ki67 humain	IHC 1/100 ^e	SantaCruz Biotechnology
Anti-CD133	Lapin, polyclonal	Non communiqué	IHC 1/100 ^e	SantaCruz Biotechnology
Anticorps secondaires	Espèce	Couplage	Utilisation	Provenance
Kit ChemMate	Chèvre anti-souris et	Couplés à la peroxydase de raifort	IHC :	Dako
Detection	chèvre anti-lapin	(HRP, Horse Radish Peroxydase)	Non communiqué	Cytomation
Anti-souris	Chèvre anti-IgG de souris	Couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488	IHC 1/400 ^e	Molecular Probes
Anti-lapin	Chèvre anti-IgG de Iapin	Couplé au fluorochrome Alexa Fluor 568	IHC 1/400 ^e	Molecular Probes
Anti-souris	Chèvre anti-IgG de souris	Couplé à la peroxydase de raifort	Western blot 1/1000 ^e	Dako Cytomation
Anti-lapin	Chèvre anti-IgG de Iapin	Couplé à la peroxydase de raifort	Western blot 1/1000 ^e	Dako Cytomation

Tableau XIII : Liste des anticorps utilisés pour l'étude des échantillons tumoraux humains Sauf indication contraire, les anticorps primaires sont incubés pendant une nuit à 4°C et les anticorps secondaires de quarante-cinq minutes à une heure. IHC = immunohistochimie. pendant quinze minutes. Une solution *CHROM* contenant du diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) est incubée cinq minutes à l'abri de la lumière. A chaque étape, trois rinçages de cinq minutes sont réalisés. Les lames sont contre-colorées par une solution d'hématoxyline 3,5 g/L (SIGMA), déshydratées dans de l'éthanol 100% puis dans un bain d'Histosol avant d'être montées dans une colle *Histolab* (*Pertex*). Les lames peuvent alors être stockées à température ambiante.

Pour une observation en microscopie à fluorescence, les lames sont incubées en présence de l'anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire utilisé, pendant une heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les noyaux cellulaires sont marqués au TO-PRO®-3 (*InVitrogen*) dilué au 1/10 000^e dans du tampon Tris pendant dix minutes. Après trois rinçages dans du tampon Tris, les lames sont montées dans un milieu protégeant du photoblanchiment (Vectashield, *Clinisciences* ou Mowiol, *Polysciences*) puis conservées à -20°C jusqu'à observation.

Observation des échantillons en microscopie

Microscopie optique

Les lames colorées au DAB et contre-colorées à l'hématoxyline sont observées en microscopie optique (*Axioskop, ZEISS*) et les images font l'objet d'une acquisition par une caméra numérique (*KAPPA*) reliée au logiciel (*KIB*) Kappa Image-Base.

Microscopie confocale

Les échantillons pour lesquels un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome a été utilisé sont observés avec un microscope confocal (*Olympus FV1000*) associé à trois sources lasers dans le visible (Argon multi-raies à 457, 476, 488 et 515 nm ; Hélium-Néon vert 543 nm ; Hélium Néon rouge 633 nm) et un laser proche de l'ultra-violet (UV) 405 nm. Trois détecteurs photomultiplicateurs permettent l'acquisition automatique d'images en fluorescence. L'acquisition et l'analyse d'images sont réalisées par le logiciel *Fluoview FV10-ASW 1.6*.

Western blot à partir d'échantillons congelés

Préparation des échantillons

Les tissus sont finement découpés en morceaux puis dissociés mécaniquement dans 1 mL d'un tampon de lyse RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*. Sodium Dodecyl Sulfate ou SDS 0,1%, *SIGMA* ; IGEPAL 1%, *SIGMA*; Sarkosyl



Figure 31 : Immunodétection indirecte L'antigène est reconnu par l'anticorps primaire. L'utilisation d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire est couplé à un fluorochrome ou à une enzyme permettant la transformation d'un substrat en un produit coloré.

D'après interchim.com.

0,5%, *SIGMA*; NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM ; pH 8,0) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*Protease Inhibitor Cocktail* 1/100^e, *SIGMA* ; PhenylMethylSulfonyl Fluoride ou PMSF 0,5 mM, *SIGMA*). Après cinq minutes, les échantillons sont passés au sonicateur trois fois quinze secondes (*Branson Sonifier 450*) pour fragmenter l'ADN et compléter la destruction des membranes cellulaires. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes pour culoter les débris cellulaires et l'ADN, puis les surnageants sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Afin de charger la même quantité de protéines dans tous les puits du gel d'électrophorèse, les extraits protéiques sont quantifiés par un test amélioré à partir de la technique de Lowry (*DC Protein assay, BIO-RAD*). Cette technique colorimétrique est basée sur la liaison établie entre les protéines et les ions cuivre en milieu alcalin et sur la réduction du réactif de Folin lors de sa mise en présence avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. La coloration obtenue est mesuré à 750 nm pour une gamme de concentrations étalon d'albumine sérique bovine (BSA pour *Bovine Serum Albumin*) et pour chaque échantillon.

Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Cinquante µg d'extraits protéigues sont dilués dans du tampon d'échantillon TE (TE 2x: glycérol 50%, SIGMA; SDS 10%; Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; bleu de bromophénol 0,5%; β-mercaptoéthanol 20 μL/mL). Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide constitué de deux phases : un gel de tassement (acrylamide/bis-acrylamide 5%, SIGMA; glycérol 7,5%, Tri-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 0,1%; persulfate d'ammonium ou APS 0,1%; N,N,N'N'-TEtraMéthylEthylèneDiamine ou TEMED 0,1%) et un gel séparateur (acrylamide/bis-acrylamide 10, 12 ou 15% selon les protéines étudiées ; glycérol 7,5% ; Tri-HCI 375 mM, pH 8,8 ; SDS 0,1% ; APS 0.1% : TEMED 0.04%). La migration s'effectue à 100 V pendant deux heures trente minutes. Le transfert sur membrane de nitrocellulose est réalisé en condition semisèche : la membrane de nitrocellulose est hydratée dans du tampon de transfert (glycine 19.2 mM; Tris-base 2.5 mM, pH entre 8.2 et 8.5; méthanol 10%) et le gel équilibré dans le même tampon pendant trois minutes. La membrane et le gel sont mis en contact et l'ensemble est monté entre deux papiers filtres (Whatman filter paper, BIO-RAD). Le transfert s'effectue à 15 V pendant une heure trente minutes. La membrane est rincée trois fois cinq minutes dans du tampon TBS-T (TBS, Tris Buffer Saline: Tris-base 25 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM) contenant 0,1% de Tween® 20 (SIGMA) puis incubée pendant une heure dans une solution de lait écrémé 5% afin de

saturer les sites non spécifiques par la caséine du lait. La membrane est rincée trois fois cinq minutes dans du TBS-T puis incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt à 4°C pendant une nuit. Après trois rinçages dans du TBS-T, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase de raifort, à température ambiante, pendant une heure. Après trois rinçage au TBS, le kit de détection *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* fournit le substrat à la peroxydase de raifort, ce qui permet de révéler les bandes caractéristiques des protéines d'intérêt sur un film photographique.

L'intensité des différentes bandes a été mesurée par densitométrie en établissant un rapport entre la protéine d'intérêt et une protéine de référence, la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), en utilisant le logiciel *ImageJ*.

Lignée cellulaire	LN18	U87	U251
Classification	Grade IV Glioblastome	Grade III Glioblastome, astrocytome	Grade IV
	Homme, 65 ans	Femme, 44 ans	
Provenance	ATCC cat# CRL-2610	ATCC cat # HTB-14	CIRC Lyon
Tumorigénicité	Tumorigène chez la souris nude	Tumorigène chez la souris nude	Tumorigène chez la souris nude
Établissement	1976	1968	1968
Caractéristiques	PTEN + [Kim <i>et al.,</i> 2005] GFAP – S100 –	PTEN – [Kim <i>et al.,</i> 2005] GFAP – [Bigner <i>et al.,</i> 1981]	PTEN – [Kim <i>et al.,</i> 2005] GFAP + [Bigner <i>et al.,</i> 1981]
	Forte expression d'EGFR [Combs 2007] p53 + (mutation, TGT (Cys)> TCT (Ser, mutation au niveau du codon 238) p16 – (délétion) p14ARF – (délétion)	Expression modérée d'EGFR [Combs <i>et al.,</i> 2007]	
Conditions de culture	DMEM + 4.5 g/L glucose 5% SVF	DMEM + 4.5 g/L glucose 10% SVF	DMEM + 4.5 g/L glucose 10% SVF
Références	[Diserens et al., 1981]	[Ponten et McIntyre, 1968]	[Ponten et McIntyre, 1968]

Tableau XIV : Caractéristiques principales des lignées cellulaires humaines ayant servi de support à cette étude

+ : expression de la protéine. - : perte d'expression de la protéine.

Substances ou composés	Concentration (mg/L)	Substances ou composés	Concentration (mg/L)
Glycine	30	Niacinamide	4
L-arginine hydrochloride	84	Pyridoxine hydrochloride	4
L-cystine	63	Riboflavin	0.4
L-glutamine	584	Thiamine hydrochloride	4
L-histidine	42	I-inositol	7.2
L-isoleucine	105	Calcium chloride	200
L-leucine	105	Ferric nitrate	0.1
L-lysine hydrochloride	146	Magnesium	97.67
L-methionine	30	Potassium chloride	400
L-phenylalanine	66	Sodium bicarbonate	3700
L-serine	42	Sodium chloride	6400
L-threonine	95	Sodium phosphate monobasic	125
L-tryptophan	16	D-glucose (dextrose)	4500
L-tyrosine disodium salt dihydrate	104	Phenol red	15
L-valine	94	Sodium pyruvate	110
Choline chloride	4		
D-calcium pantothenate	4		
Folic acid	4		

Tableau XV : Composition du milieu de culture DMEM utilisé pour la culture des lignées cellulaires LN18, U87 et U251

Etude in vitro

Cultures cellulaires

Culture d'explants

Les échantillons tumoraux, prélevés par exérèse chirurgicale, sont découpés en morceaux d'environ 1 mm³ à l'aide de scalpels puis mis en suspension dans du *milieu Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM, *Gibco*) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, *Biowhittaker*) et de 1% d'un mélange d'antibiotiques (sels de pénicilline G 10 000 U/mL et sulfate de streptomycine 10 000 µg/mL, *Gibco*). La suspension cellulaire ainsi obtenue est déposée dans deux boîtes de Petri traitées pour la culture cellulaire (Ø100 mm, *NUNCLON®*, *Nunc*). Après vingt-quatre heures, le milieu est changé afin d'éliminer les débris cellulaires. Les milieux sont ensuite renouvelés tous les deux à trois jours et les cultures sont maintenues sous atmosphère humide dans un incubateur à 37°C, CO₂ 5%, air 95%.

Les cultures d'explants constituaient le modèle d'étude du Dr Ferrand lors de son stage de DEA en 2005 (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Poitiers). En accord avec le Dr Karayan-Tapon (CHU de Poitiers), il a été possible d'utiliser certaines cultures pour une étude des connexines après l'obtention de cultures confluentes, soit après le premier passage. Les études qui seront présentées par la suite portent donc sur des cultures secondaires obtenues, selon les cas, entre six et huit semaines après le prélèvement de la tumeur chez le patient.

Culture de lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées proviennent de tumeurs gliales humaines (*Tableau XIV*). La lignée LN18 a été obtenue originellement en 1976 à partir de la mise en culture d'explants provenant d'une tumeur du lobe temporal de grade IV d'après les critères en vigueur selon la classification de Kernohan, base de la classification de l'OMS de 1979 [Diserens *et al.*, 1981]. Les lignées U87 et U251 ont été établies en 1968 à partir de culture d'explants de tumeurs astrocytaires de haut grade [Ponten et McIntyre, 1968]. Rétrospectivement, la lignée U87 a été classée comme une tumeur de grade III selon la classification de l'OMS, alors que la lignée U251 a été classée comme une tumeur de une tumeur de grade IV [Bigner *et al.*, 1981].

Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu DMEM (*Gibco, Tableau XV*) contenant 4 mM de L-glutamine et 110 mg/mL de pyruvate de sodium et additionné de 5% de SVF (*Biowhittaker*) pour la lignée LN18 et de 10% de SVF décomplémenté pour



Figure 32 : Constructions de différentes formes tronquées de Cx43

Séquences à amplifier	Nom des amorces	Séquence des amorces
pMSCVpuro	5'pMSCV	cct tga acc tcc tcg ttc gac
	3'pMSCV	gtg tag cgc caa gtg ccc agc
Cx43	5'hCx43 (BamH 1)	aatt gga tcc acc atg ggt gac tgg agc
	3'hCx43 (Hpa I)	aatt gtt aac cta gat ctc cag gtc atc ag
TrCx43	5'hTrC43 (Bgl II)	aatt aga tct acc atg ggt gac tgg agc gcc
	3'hTrCx43 (Hpa I)	aatt gtt aac cta tcc ctt aac ccg atc ctt aac
232Cx43	5'h232Cx43 (BamH 1)	aatt gga tcc acc atg ttc ttc aag ggc gtt aag gat c
	3'h232Cx43 (Hpa I)	aatt gtt aac cta gat ctc cag gtc atc ag
243Cx43	5'h243Cx43 (BamH 1)	aatt gga tcc acc atg aag agc gac cct tac cat gc
	3'h243Cx43 (Hpa I)	aatt gtt aac cta gat ctc cag gtc atc ag

Tableau XVI : Amorces ayant permis l'amplification des séquences codantes des différentes formes de Cx43 à partir de la Cx43 humaine

les lignées U87 et U251. Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine. Les cultures cellulaires sont maintenues sous atmosphère humide dans un incubateur à 37° C, CO₂ 5%, air 95%.

Obtention de lignées cellulaires exprimant différentes constructions de Cx43

Séquence codante de la Cx43 humaine

La séquence codante de la Cx43 humaine contenue dans un plasmide Bluescript KS+ provient du Dr Fishman, *Albert Einstein College of Medicine*, New York. L'ADNc codant la Cx43 compte 1149 nucléotides. Les constructions TrCx43, 232Cx43 et 243Cx43 sont des formes tronquées de Cx43. TrCx43 résulte de l'insertion d'un codon stop conduisant à une séquence codante des 726 premiers nucléotides, 232Cx43 correspond aux 456 derniers nucléotides et 243Cx43 aux 422 derniers nucléotides (*Figure 32*).

Amplification par PCR

Les séquences d'intérêt sont obtenues par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à l'aide d'amorces conçues spécifiquement (*InVitrogen*). De part et d'autre de la séquence codante, des sites reconnaissables par des enzymes de restriction sont introduits (*Tableau XVI*). Ces sites seront ensuite utilisés pour l'insertion des séquences codantes dans le plasmide pMSCVpuro (*Clontech laboratories*).

Chaque réaction de PCR est réalisée en suivant le protocole fourni pour *Platinium*® *Pfx DNA polymerase* (*InVitrogen*) soit, pour 20 ng d'ADN plasmidique : 5 μ L de tampon d'amplification 10X ; 1,5 μ L d'un mélange de desoxynucléotides (dNTP 10 mM, *InVitrogen*) ; 1 μ L de MgCl₂ (50 mM) ; 1 μ L de la paire d'amorces (1 pM) et 0,5 μ L d'ADN polymérase (2,5 U/ μ L) pour un volume final de 55 μ L par réaction. Après une étape de dénaturation du double brin d'ADN pendant deux minutes à 92°C, le cycle suivant est reproduit trente fois sur le thermocycleur *Eppendorf Mastercycler ep Gradient* S : dénaturation à 92°C pendant quinze secondes ; hybridation des amorces sur la séquence complémentaire de l'un des brins d'ADN à 59°C pendant trente secondes ; élongation d'un brin d'ADN néosynthétisé complémentaire à 68°C pendant une minute et dix secondes. La réaction se termine par une dernière étape à 72°C pendant 5 minutes afin de permettre la fin de l'étape d'élongation. Les produits de PCR peuvent alors être conservés à -20°C.

Pour chacun des produits de PCR obtenus, 10 µL additionnés de 2 µL de tampon d'échantillon (EDTA 20 mM, glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,05%) sont

Séquence	Enzymes de restriction	Tampon	Digestion 1	Digestion 2
Cx43	BamH 1 (10 000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen	Simultanées	, 37°C, 5 heures
	InVitrogen	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM	puis p	urification
	Hpa I (5000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen		
	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM		
TrCx43	Bgl II (10 000 U/mL)	React [®] 3 InVitrogen		37°C, 5 heures
	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 MgCl ₂ 10 mM		puis purification
		NaCl 100 mM		
	Hpa I (5000 U/mL) New England Biolabs	React [®] 4 InVitrogen Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl ₂ 5 mM KCl 50 mM	37°C, 5 heures puis purificatio	ı
232Cx43	BamH 1 (10 000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen	Simultanées	, 37°C, 5 heures
	InVitrogen	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM	puis p	urification
	Hpa I (5000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen		
	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM		
243Cx43	BamH 1 (10 000 U/mL) InVitrogen	<i>React® 4 InVitrogen</i> Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl ₂ 5 mM KCl 50 mM	Simultanées puis p	, 37°C, 5 heures urification
	Hpa I (5000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen		
	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM		
pMSCVpuro	Hpa I (5000 U/mL)	React [®] 4 InVitrogen	37°C, 2 heures	
-	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 MgCl₂ 5 mM KCl 50 mM	puis purificatio	n
	Bgl II (10 000 U/mL)	React [®] 3 InVitrogen		37°C, 2 heures
	New England Biolabs	Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 MgCl ₂ 10 mM		puis purification
		NaCl 100 mM		

Tableau XVII : Enzymes de restriction utilisées pour isoler les séquences codantes

déposés sur un gel composé de 1,2% d'agarose dans du tampon (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; acide acétique 100 mM ; EDTA 0,2 mM) et contenant 15 µL d'une solution d'agent intercalant révélant la présence des bandes (*SYBR*® *Safe DNA gel stain*, *Molecular Probes*). L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant quarante minutes. Les bandes sont visualisées sous UV (*Alphalmager 3400, Alphainnotech*) et leur taille est estimée grâce au marqueur de taille *TrackIt*® *1 Kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*).

Après vérification de la taille des produits obtenus, ils sont purifiés sur membrane de silice (*QIAquick® PCR purification*, *QIAGen*). En se basant sur les conditions de pH et les propriétés d'interaction entre l'ADN et la membrane de silice, cette procédure permet d'éliminer les amorces et les dNTP. Puis une digestion par les enzymes de restriction spécifiques (*InVitrogen*) des séquences comprises dans les amorces est réalisée. En fonction des enzymes de restriction utilisées, la digestion enzymatique est réalisée en même temps pour les deux enzymes (tampons compatibles) ou en deux fois (*Tableau XVII*). Pour chaque produit de PCR purifié, 25 µL d'ADN sont mis en présence de 3 µL d'enzymes de restriction ensuite purifiés sur colonne. Les ADN nécessitant une digestion enzymatique en deux temps sont purifiés entre chaque digestion. Les produits de PCR sont à nouveau analysés sur gel d'agarose à 1,2% et conservés à -20°C.

Plasmide pMSCVpuro

Le plasmide pMSCVpuro (*Figure 34*) est un vecteur produit à partir de vecteurs rétroviraux LN et de virus des cellules souches embryonnaires murines (*Murine Embryonic Stem Cell Virus, MESV*). Ce plasmide contient la séquence codant le gène de résistance à la puromycine en aval du promoteur de la phosphoglycérate kinase murine. La présence du gène de la β -lactamase confère à *E.coli* la résistance à l'ampicilline. Il permet l'expression transitoire des séquences qu'il contient, et peut également être utilisé pour une intégration de la séquence d'intérêt dans le génome de la cellule receveuse à la suite de la production de particules rétrovirales par des cellules *packaging*. Le promoteur placé en amont du site multiple de clonage est un promoteur LTR (5' Long Terminal Repeat) devant induire un haut niveau d'expression dans les cellules de mammifère.

Le plasmide pMSCVpuro est amplifié par PCR en utilisant les amorces 5'pMSCV (cct tga acc tcc tcg ttc gac) et 3'pMSCV (gtg tag cgc caa gtg ccc agc). Après une première étape de dénaturation pendant deux minutes à 92°C, le cycle suivant est reproduit trente fois : dénaturation à 92°C pendant quinze secondes ; hybridation à



Figure 33 : Plasmide pMSCVpuro

Le plasmide contient un promoteur 5'Long terminal repeat (5'LTR) en amont du gène permettant la production de particules rétrovirales (ψ^+) et du site multiple de clonage (MCS) dans lequel est insérée la construction d'intérêt. Le gène de résistance à la puromycine est placé sous le contrôle d'un promoteur CMV. Le plasmide contient également une origine de réplication bactérienne (ori) et le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r).

D'après clontech.com.

59°C pendant trente secondes ; élongation à 68°C pendant une minute et dix secondes. La réaction se termine par une dernière étape à 72°C pendant 5 minutes. Le plasmide amplifié est conservé à -20°C.

Afin de recevoir les séquences codant les différentes formes de la Cx43, le plasmide est digéré par les enzymes de restriction Hpa I puis Bgl II (*New England BioLabs*). Le plasmide est d'abord mis en présence de Hpa I à raison de 2 µL d'enzyme pour 1 µL d'ADN plasmidique dans un volume final de 20 µL de tampon *React*® *4* (Tris-HCI 50 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 5 mM ; KCI 50 mM ; *InVitrogen*) à 37°C pendant deux heures. Après purification sur colonne, le plasmide est digéré par la seconde enzyme dans du tampon *React*® *3* (Tris-HCI 50 mM, pH 8,0 ; MgCl₂ 10 mM ; NaCl 100 mM ; *InVitrogen*) à 37°C pendant deux heures. Le plasmide ouvert est alors de nouveau purifié sur colonne puis stocké à -20°C.

Insertion de séquences codantes de Cx43 dans un plasmide pMSCVpuro

La ligation entre le plasmide pMSCVpuro et les différentes séquences codantes est réalisée en mettant en contact 1 μ L d'ADN plasmidique (140 ng/ μ L) avec 2 μ L de produit de PCR en présence de 1 μ L de ligase (*T4 DNA ligase* 400 000 U/mL, *New England BioLabs*) dans un volume final de 10 μ L de tampon de ligation (*T4 DNA ligase buffer, New England BioLabs*). L'ensemble est incubé à 16°C pendant une nuit.

Culture de bactéries compétentes

Les bactéries compétentes DH5a[™] sont utilisées pour réaliser le sous-clonage des différentes constructions en suivant les recommandations du fournisseur (Subcloning Effciency[™] DH5a[™] Competent Cells, *InVitrogen*). Les bactéries sont décongelées sur glace, 1 µL de solution contenant les différents plasmides est ajouté à 50 µL de suspension bactérienne. L'ensemble est incubé sur glace pendant trente minutes puis pendant deux minutes à 37°C. Après deux minutes sur glace, 500 µL de milieu SOC (Extrait d'*E.coli* 0,5% ; Tryptone 2% ; NaCl 10 mM ; KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM ; glucose 20 mM) sont ajoutés et les tubes sont laissés à incuber à 37°C pendant une heure sur table d'agitation. Les bactéries transformées sont alors mises en culture dans des boîtes de Petri (Ø100 mm) dans lesquelles ont été coulés 15 mL de milieu LB agar (40 g/L, *SIGMA*) contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit.

Pour chaque construction, six colonies sont prélevées. Chaque colonie est mise en suspension dans 2 mL de milieu LB Broth (25 g/L, *SIGMA*) contenant 100 μg/mL



Figure 34 : Digestion du plasmide pMSCVpuro et des séquences insérées par Xba I et Hind III ou par Pst I

Plasmide	Taille (bp)	Taille des fragments (bp)						
	、 .,	Xba I 2877 → Xba I 220	Xba I 220 → Hind III 1950	Hind III 1950 → Xba I 2877	Pst 923 → Pst 931	Pst 931 → Pst 1 107	Pst 1 107 → Pst 1 945	Pst 1 945 → Pst 923
pMSCVpuro	6 295	3 638	927	1 730	8	176	838	5 273
pMSCVpuro- Cx43	7 444	3 638	927	2 879	8	176	1 422 + 545	5 273
pMSCVpuro- TrCx43	7 021	3 638	927	2 456	8	176	999 + 545	5 273
pMSCVpuro- 232Cx43	6 751	3 638	927	2 185	8	176	1 294	5 273
pMSCVpuro- 243Cx43	6 717	3 638	927	2 142	8	176	1 260	5 273

Tableau XVIII : Estimation de la taille des fragments obtenus après digestion par Xba I et Hind III ou par Pst I

d'ampicilline dans des tubes de culture bactérienne de 12 mL. Les tubes sont incubés à 37°C, pendant une nuit sous agitation. Les boîtes de Petri sont conservées à 4°C pour l'éventuel prélèvement d'autres colonies.

Purification des ADN plasmidiques

Un aliquot des produits de culture bactérienne est purifié à l'aide d'un kit de purification d'ADN plasmidique (GenElute™ Plasmid MiniPrep, SIGMA). La culture bactérienne est conservée à 4°C en attendant la validation des produits obtenus. Un mL de solution est prélevé et centrifugé à 13 000 g pendant une minute. Le surnageant est éliminé puis le culot est remis en suspension dans 200 µL d'une solution contenant de la RNase A (dégradation des ARN simple brin). Les cellules sont alors lysées par l'ajout de 200 µL d'une solution alcaline, puis cette solution est inactivée par 200 µL d'une solution de neutralisation qui permet également de précipiter les débris cellulaires. Les tubes sont centrifugés à 13 000 g pendant dix minutes. Le surnageant, contenant l'ADN plasmidique, est alors récupéré dans des tubes (1,5 mL) et 800 µL d'éthanol 90% y sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés à 13 000 g pendant dix minutes. Le surnageant est éliminé par décantation et le culot est rincé avec de l'éthanol 70%. Celui-ci est alors éliminé et le culot est laissé à sécher à température ambiante pendant dix minutes. Enfin, le culot est remis en suspension dans 50 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ; EDTA 1 mM). Les plasmides purifiés sont stockés à -20°C.

Validation des constructions de Cx43

Afin de s'assurer que les constructions plasmidiques purifiées contiennent bien les séquences codantes d'intérêt, des digestions enzymatiques sont réalisées (*Figure 34, Tableau XVIII*). Les enzymes sélectionnées sont Xba I (20 000 U/mL, *New England Biolabs*) et Hind III (10 000 U/mL, *InVitrogen*) en raison de la taille des fragments obtenus, facilement distinguables après migration sur gel d'agarose. De plus, ces deux enzymes sont utilisables dans le même tampon *React*® *2* (Tris-HCI 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCI 50 mM; *InVitrogen*). Pour chaque échantillon, 10 µL d'ADN plasmidique sont mis en contact avec 0,25 µL de chacune des deux enzymes dans un volume final de tampon de 20 µL. Après une incubation à 37°C pendant une heure trente minutes, 6 µL de solution de plasmides digérés sont déposés sur gel d'agarose 0,8%. L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant 40 minutes et les gels sont observés sous UV. Le profil de chaque piste est alors comparé à celui attendu. Les ADN plasmidiques correspondant aux pistes ayant le profil attendu sont alors traités de



Figure 35 : Représentation schématique de la démarche ayant conduit à la production d'ADN plasmidiques utilisables pour transduction

la même façon par une autre enzyme de restriction (Pst I 10 000 U/mL, *React*® 2, *InVitrogen*) afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de faux-positifs.

Amplification des constructions de Cx43

Pour chacune des solutions bactériennes dont les produits sont validés, 10 µL sont mis en culture dans 100 mL de milieu LB Broth (25 g/L) contenant 100 µg/mL d'ampicilline dans des flacons de culture bactérienne de 250 mL. Les cultures bactériennes sont incubées à 37°C, sous agitation, pendant une nuit. Une partie des bactéries contenant les plasmides d'intérêt est conservée à -80°C à raison d'un volume de suspension bactérienne pour un volume de glycérol. Le reste de la solution est traitée suivant le protocole QIAGen Endofree® Plasmid Purification afin de purifier les plasmides contenant les différentes constructions de Cx43 à partir de la solution bactérienne. La solution bactérienne est centrifugée (6000 g, 4°C) pendant guinze minutes. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans un tampon contenant de la RNase A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase A 100 µg/ml) puis lysées dans un tampon de lyse alcalin (NaOH 200 mM, SDS 1%). Les débris cellulaires, l'ADN génomique et les protéines sont précipitées par l'ajout d'un tampon acide de neutralisation (acétate de potassium 3 M, pH 5,5). Le lysat est ensuite passé sur une résine échangeuse d'anions sur laquelle l'ADN se fixe. Après deux rinçages (NaCl 1 M; MOPS 50 mM, pH 7,0; isopropanol 15%), l'ADN est élué (NaCl 1,25 M; Tris-HCI 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15%) puis précipité par ajout de 0,7 volume d'isopropanol. Le précipité est remis en suspension puis les tubes sont centrifugés (5 000 g à 4°C) pendant une heure. Le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70%, puis laissé à sécher à température ambiante pendant vingt minutes. Enfin, le culot est remis en suspension dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). La concentration d'ADN plasmidique est mesurée par lecture de la densité optique à 260 nm.

Un aliquot (2 μ L) de chaque solution de plasmide est digéré par l'enzyme de restriction Pst I (1 μ L) dans un volume final de 20 μ L de tampon *React*® 2 pendant une heure trente à 37°C. Les produits de la digestion enzymatique sont ensuite chargés sur gel d'agarose (0,8%) et la taille des fragments est évaluée. Ceci constitue la dernière étape de vérification avant séquençage des constructions de Cx43 et leur utilisation pour la production de particules rétrovirales (*Figure 35*).

Commoné	Concentration	Composés	Concentration
Compose	(mg/l)	Composes	(mg/l)
Glycine	30	Niacinamide	4
L-Arginine hydrochloride	84	Pyridoxine hydrochloride	4
L-Cystine 2HCl	63	Riboflavin	0.4
L-Glutamine	584	Thiamine hydrochloride	4
L-Histidine hydrochloride-H2O	42	i-Inositol	7.2
L-Isoleucine	105	Calcium Chloride	200
L-Leucine	105	Ferric Nitrate	0.1
L-Lysine hydrochloride	146	Magnesium Sulfate	97.67
L-Methionine	30	Potassium Chloride	400
L-Phenylalanine	66	Sodium Bicarbonate	3700
L-Serine	42	Sodium Chloride	6400
L-Threonine	95	Sodium Phosphate monobasic	125
L-Tryptophan	16	D-Glucose (Dextrose)	1000
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	104	Phenol Red	15
L-Valine	94	Sodium Pyruvate	110
Choline chloride	4	-	
D-Calcium pantothenate	4		
Folic Acid	4		

Tableau XIX : Composition du milieu de culture DMEM utilisé pour la culture des cellules « packaging » 293GPG

Séquençage des constructions de Cx43

Les constructions de Cx43 ont été séquencées par le laboratoire de séquençage d'ADN (*NAPS unit, Biotechnology laboratory, University of British Columbia*).

Production de particules rétrovirales contenant les séquences des différentes constructions de Cx43

La lignée cellulaire packaging 293GPG a été utilisée pour produire des vecteurs rétroviraux [Ory DS et al., 1996]. Les cellules 293GPG sont mises en culture dans un flacon de 75 cm² (NUNCLON®, Nunc) contenant un milieu composé de DMEM (Tableau XIX) additionné de 10% de SVF et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline G 10 000 U/mL et streptomycine 10 000 µg/mL, tétracycline 1 µg/mL, G418 0.3 µg/mL, puromycine 2 µg/mL). Le milieu est renouvelé tous les trois jours. La culture cellulaire est maintenue sous atmosphère humide dans un incubateur à 37°C, CO₂ 5%, air 95%. Lorsque la culture est confluente, les cellules sont trypsinisées (trypsine 0.25% en PBS, SIGMA) et ensemencées à 2x10⁶ cellules dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm. NUNCLON®) dans un milieu DMEM additionné de 10% de SVF et contenant uniquement de la tétracycline à 1 µg/mL. Après vingt-quatre heures, les cellules sont transfectées par le plasmide pMSCVpuro natif ou par le plasmide contenant les différentes constructions de Cx43. Quatre µg d'ADN et 12 µL de *Lipofectamine*™ 2000 sont mis en solution séparément dans 500 µL d'OptiMEM (InVitrogen) et incubés cinq minutes à température ambiante. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées vingt-cing minutes à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules 293GPG sont rincées avec du PBS puis 1,5 mL d'OptiMEM additionné de tétracycline (1 µg/mL) sont ajoutés. La solution de plasmide et de Lipofectamine[™] 2000 est ensuite ajoutée aux cellules. Après huit heures, 2 mL de milieu DMEM contenant 20% de SVF et de la tétracycline (1 µg/mL) sont ajoutés. Vingt-quatre heures et quarante-huit heures après transfection, le milieu est remplacé par du milieu DMEM contenant 10% de SVF sans tétracycline, ce qui induit la production de particules rétrovirales. Les trois jours suivants, le milieu est récupéré et filtré, afin d'éliminer les cellules potentiellement en suspension, en utilisant un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,45 µm (Millipore). Les particules rétrovirales ainsi récoltées sont utilisées immédiatement pour transduction des cellules receveuses (LN18, U87 ou U251) ou congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Anticorps primaires	Espèce	Epitope	Utilisation	Provenance
Anti-Cx43	Souris, monoclonal	Dirigé contre le peptide 250-272	IHC 1/100 ^e Western blot 1/1000 ^e	Interchim
Anti-Cx43	Lapin, polyclonal	Dirigé contre le peptide 363-380 de la Cx43 de rat	IHC 1/2000 ^e Western blot 1/8000 ^e	SIGMA
Anti-GAPDH	Souris, monoclonal	Non précisé	Western blot 1/10000 ^e	Hytest
Anti-GFAP	Lapin, polyclonal	Obtenu à partir de la protéine bovine	IHC 1/200 ^e	Dako
			Western blot 1/15000 ^e	Cytomation
Anticorps	Espèce	Couplage	Utilisation	Provenance

secondaires	·			
Anti-souris	Chèvre anti-IgG de souris	Couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488	IHC 1/400 ^e	Molecular Probes
Anti-lapin	Chèvre anti-IgG de Iapin	Couplé au fluorochrome Alexa Fluor 568	IHC 1/400 ^e	Molecular Probes
Anti-souris	Chèvre anti-IgG de souris	Couplé à la peroxydase de raifort	Western blot 1/1000 ^e	Dako Cytomation
Anti-lapin	Chèvre anti-IgG de Iapin	Couplé à la peroxydase de raifort	Western blot 1/1000 ^e	Dako Cytomation

 Tableau XX : Liste des anticorps utilisés pour l'étude des lignées de gliome humain LN18, U87 et U251

Les anticorps primaires sont incubés pendant une nuit à 4°C et les anticorps secondaires pendant quarante-cinq minutes à une heure. IHC = Immunohistochimie.

Transduction des cellules LN18, U87 et U251

Les cellules receveuses (LN18, U87 ou U251) sont ensemencées à 2x10⁵ cellules dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm, NUNCLON®) dans du milieu DMEM additionné de 10% de SVF. Le lendemain, le milieu est renouvelé (1,5 mL) et les cellules sont transduites par 1,5 mL de solution contenant les constructions rétrovirales. Après vingt-quatre heures, les cellules sont à nouveau transduites par les constructions rétrovirales. Le jour suivant, la sélection par la puromycine est initiée. Le gène de résistance à la puromycine est contenue dans la séquence transduite, aussi seules les cellules ayant intégré les séquences contenues dans les particules rétrovirales survivent. Compte tenu de la sensibilité des cellules parentales à la puromycine, les concentrations suivantes ont été utilisées pendant dix jours : 800 ng/mL pour les LN18, 1000 ng/mL pour les U87 et 200 ng/mL pour les U251.

Caractérisation des lignées cellulaires exprimant différentes constructions de Cx43

Immunocytochimie

Les cellules sont ensemencées sur lamelle de verre dans le milieu de culture habituel. Lorsque la culture est confluente, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS préchauffé à 37°C puis fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% (SIGMA) pendant dix minutes à température ambiante. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton X100 0,1% (SIGMA) pendant dix minutes. Après deux rinçages au PBS, les sites non spécifiques sont saturés à l'aide d'une solution à 4% d'albumine sérique bovine (BSA pour Bovine Serum Albumin, SIGMA) pendant guarante-cing minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec les solutions d'anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt à 4°C pendant une nuit (Tableau XX). Après trois rinçages de cinq minutes avec du PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires adaptés couplés à un fluorochrome, à température ambiante, pendant trente minutes ou une heure selon les anticorps utilisés. Les noyaux cellulaires sont marqués au ToPro-3 (*InVitrogen*) dilué au 1/10 000^e dans du PBS. Après trois rinçages de cinq minutes avec du PBS, les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage protégeant du photoblanchiment (Vectashield, Clinisciences; ou ProLong gold, Molecular Probes; ou Mowiol, Polysciences) puis conservées à -20°C jusqu'à observation en microscopie à fluorescence ou en microscopie confocale.



Figure 36 : « Wound healing assay »

Les cultures confluentes sont rayées à l'aide d'un cône puis observées au microscope optique. La surface S1, délimitée par la largeur de la blessure et la taille du champ, est mesurée ainsi que la taille de l'image (L1). Après seize à vingt-quatre heures, la surface restant entre les deux bords de la blessure est évaluée. Les images étant prises sur le même champ et dans les mêmes conditions, L2 a la même valeur que L1. La distance parcourue par les cellules (I1-I2) est estimée : (S1-S2)/2L1.



Figure 37 : « Transwell assay »

Les cellules sont ensemencées à 100 000 cellules par insert. La membrane microporeuse laisse passer les cellules aptes à migrer. Après seize à vingt-quatre heures (selon le type cellulaire), le nombre de cellules ayant migré dans le compartiment inférieur est évalué.

Western blot

Préparation des échantillons

Les cellules sont ensemencées dans le milieu DMEM habituel dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm, NUNCLON®, *Nunc*) à raison de 250 000 cellules par boîte. Lorsque la culture est confluente (deux à trois jours), les cultures sont maintenues sur glace et rincées trois fois avec du PBS froid. Huit cents µL d'un tampon de lyse RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases sont ajoutés. Après cinq minutes, le lysat est traité mécaniquement à l'aide d'un grattoir puis récolté et passés au sonicateur trois fois cinq secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes, puis les surnageants sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Afin de charger la même quantité de protéines dans tous les puits du gel d'électrophorèse, les extraits protéiques sont quantifiés.

Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les conditions de Western blot sont les mêmes que pour les échantillons tumoraux humains, exception faite de la quantité de protéines chargées qui est ici de 25 à 50 µg.

Courbes de prolifération

Les cellules sont ensemencées à raison de 40 000 cellules par puits en triplicata dans des plaques de douze puits (NUNCLON®, *Nunc*). Le nombre de cellules est compté pendant douze jours à l'aide d'un compteur de particules (*Z1*[™] *Coulter Counter, Beckman*). Le nombre de cellules est également évalué par dosage colorimétrique de l'activité mitochondriale pour les cellules U251 afin d'affiner les données obtenues pendant les premiers jours de culture. Les cellules sont alors ensemencées (2000 cellules par puits) dans des plaques de quatre-vingt-seize puits (NUNCLON®, *Nunc*). La déshydrogénase mitochondriale clive le 3-[4,(-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tetrazolium bromide (MTT, SIGMA) en MTT formazan de couleur violette. La densité optique est mesurée à 630 et 690 nm, la différence permettant d'éliminer le bruit de fond.

Wound healing assay

Cette technique reproduit *in vitro* le processus de cicatrisation (*healing*) observé *in vivo* après une blessure (*wound*) [*Figure 36*, Rodriguez LG *et al.*, 2005].
Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm, NUNCLON®, *Nunc*), dans le milieu de culture habituel, à raison de 250000 cellules par boîte. Après deux jours, la culture cellulaire est rayée à l'aide d'une pointe de cône. Le milieu est changé afin d'éliminer les cellules qui se sont détachées du support. Des images sont prises dans huit champs différents en microscopie optique en contraste de phase. Après seize heures pour la lignée U87 ou vingt-quatre heures pour les lignées U251 et LN18, les mêmes champs sont à nouveau photographiés. La différence de surfaces mesurée entre les deux champs permet l'estimation de la distance parcourue par les cellules [*Figure 36*].

Transwell assay

La technique de *Transwell*® est un autre moyen d'investigation de la capacité migratoire des cellules. Cette technique repose sur l'utilisation d'inserts au fond constitué d'une membrane et dont les pores de 8 µm permettent le passage de cellules en migration (*Figure 37*).

Les cellules sont ensemencées sur des inserts dont la membrane microporeuse en polycaronate est traitée pour la culture cellulaire, en triplicata, à raison de 100 000 cellules dans 200 µL de milieu par insert (*Transwell® permeable supports, Corning*). Les inserts sont disposés sur des plaques de vingt-quatre puits, chaque puits contenant 600 µL de milieu. En parallèle, une plaque de vingt-quatre puits est ensemencée à 100 000 cellules par puits (plaque « témoin »). Après seize heures pour les cellules U87 ou vingt-quatre heures pour les cellules U251 et LN18, le nombre de cellules est déterminé après trypinisation dans le compartiment inférieur et dans la plaque « témoin ». Le rapport entre le nombre de cellules dans le compartiment et le nombre total de cellules permet de déterminer la proportion de cellules aptes à migrer.

Soft agar assay

Le test de *soft agar* ou croissance en agar mou est utilisé afin de déterminer si les cellules sont capables de se multiplier et d'établir des colonies sans ancrage à un support solide.

Un premier gel composé à volume égal de milieu de culture DMEM additionné de 20% de SVF et d'une solution d'agar Noble à 1,2% (SIGMA) est coulé dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm). Puis 10 000 cellules sont mises en suspension dans du milieu de culture additionné de 20% de SVF avant qu'un volume égal d'une solution d'agar à 0,6% ne soit ajoutée. La suspension cellulaire est alors déposée sur le premier



Figure 38 : « Preloading assay »

Des cellules chargées en fluorochromes (Dil, rouge, et Cacéine-AM, vert) sont déposées sur une culture confluente de cellules receveuses à raison d'une cellule donneuse pour cent cellules receveuses. Après deux à quatre heures (selon le type cellulaire), le nombre de cellules ayant incorporé la calcéine-AM est estimé. Celui-ci permet une approche qualitative de la communication jonctionnelle.

gel solidifié, puis l'ensemble est laissé à température ambiante pendant vingt minutes afin que le second gel se solidifie. Pour chaque construction, l'expérience est réalisée en triplicata. Les cultures cellulaires sont conservées sous atmosphère humide, C0₂ 5%, air 95%. Après sept jours pour les lignées LN18 et U87 et dix jours pour la lignée U251, 500 µL de milieu DMEM additionné de 10% de SVF sont ajoutés. Après deux semaines pour les lignées LN18 et U87 et trois semaines pour la lignée U251, trente champs déterminés de façon aléatoires sont photographiés en microscopie optique pour chaque boîte, soit quatre-vingt-dix champs pour chaque construction. Le nombre et la taille des colonies sont alors déterminés.

Preloading assay

L'étude du transfert de colorant capable de diffuser via les jonctions communicantes donne une indication qualitative de la capacité des cellules à communiquer entre elles par ce type de structure [Goldberg G *et al.*, 1995]. Dans cette expérience, les fluorochromes utilisés sont un dialkylcarbocyanine, le Dil (*Molecular Probes*), qui marque les membranes cellulaires et la calcéine-AM (*Molecular Probes*), capable de passer de cellules à cellules via les jonctions communicantes (*Figure 38*).

Les cellules sont ensemencées en duplicata dans des boîtes de Petri (Ø 60 mm, NUNCLON®, *Nunc*), dans le milieu de culture habituel, à raison de 250000 cellules par boîte. Après deux jours, les cellules de la première boîte sont chargées en fluorochomes par une solution de glucose isotonique (0,3 M) contenant 15 µg de Dil et 15 µg de calcéine-AM pendant vingt minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du glucose isotonique puis incubées avec 500 µL de trypsine pendant cinq minutes. Ces cellules, dites donneuses, sont mises en suspension dans 5 mL de milieu DMEM additionné de 10% de SVF, puis 50 µL de suspension cellulaire sont déposés sur la deuxième boîte de cellules receveuses préalablement préparées. Après deux heures pour les cellules U87 et quatre heures pour les cellules donneuses est observé en microscopie à fluorescence. En parallèle, une observation en microscopie optique à contraste de phase permet la mise en évidence de la morphologie des cellules.

Chapitre 3

La connexine 43 présente une localisation aberrante dans les tumeurs gliales humaines

Problématique	113
La connexine 43 présente des niveaux d'expression variables selon le grade tumoral mais aussi au sein d'un même grade	114
La connexine 43 présente une localisation nucléaire aberrante	118
Le signal nucléaire détecté pour la connexine 43 n'est pas associé aux cellules d'origine gliale ou aux cellules en état de prolifération	122
Discussion	126

Problématique

L'expression des connexines dans les tumeurs gliales humaines a fait l'objet de peu d'études et celles-ci étaient, de surcroît, souvent limitées à un faible nombre d'échantillons et avec peu de précisions quant à l'origine astrocytaire ou oligodendrocytaire de la tumeur [Huang RP *et al.*, 1999 ; Soroceanu L *et al.*, 2001 ; Pu P *et al.*, 2003]. Les études de Huang RP *et al.* et Pu P *et al.* par immunohistochimie concluent à l'absence d'expression de Cx43 dans les tumeurs de grade IV. Les travaux de Soroceanu L *et al.* conduisent à la même conclusion dans quatre cas sur six et montrent un couplage très limité, évalué par FRAP, des cellules tumorales de grade IV mises en culture. Globalement, l'ensemble de ces études indique que l'expression de Cx43 serait inversement corrélée au grade tumoral, les tumeurs de grade IV n'exprimant plus ou très faiblement Cx43.

En mettant à profit la technique de *tissue micro array* (TMA), qui permet d'étudier des zones tumorales sélectionnées sur un plus grand nombre d'échantillons, nous nous sommes proposés d'étudier l'expression de Cx43 et de préciser sa localisation dans les cellules tumorales.

La connexine 43 présente des niveaux d'expression variables selon le grade tumoral mais aussi au sein d'un même grade

Dans un premier temps des coupes entières d'échantillons tumoraux ont été étudiées. Cette approche globale de l'échantillon a permis de mettre en évidence des zones de densité cellulaire différentes et, spécifiquement pour les tumeurs de haut grade, la présence de zones de nécrose et de néovascularisation. Elle a également permis, au-delà des zones tumorales, l'étude de régions histologiquement normales (Figure 39 A, B). Dans cette partie normale des échantillons, Cx43 est localisée dans le cytoplasme de cellules et la présence d'un léger marguage semble indiguer que le fond fibrillaire, correspondant à des prolongements d'astrocytes, exprime également la Cx43 (Figure 39 A). A plus fort grossissement, il est possible de détecter un marquage membranaire des astrocytes, ainsi qu'un liseré autour des vaisseaux correspondant à l'expression de Cx43 au niveau des pseudopodes (Figure 39 C, D). Dans la zone tumorale, l'hétérogénéité tissulaire observée semble associée à des variations d'expression de Cx43. Ainsi, dans certaines zones, un fond fibrillaire marqué pour la Cx43 est visible, alors que d'autres présentent une absence totale de marguage dans le cytoplasme ou au niveau de la membrane des cellules. Un signal aberrant dans le noyau est également détecté pour une proportion non négligeable des cellules (Figure 39 B). Nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

La constitution d'un TMA comptant vingt-deux tumeurs de grade IV, douze de grade III et vingt de grade II a permis l'étude de Cx43 en fonction du grade tumoral. Ce TMA comportait également des échantillons de tissu adjacent à la tumeur, sain d'après les critères histologiques. Le tissu considéré comme sain montre une localisation cytoplasmique et membranaire de Cx43 (Figure 40 A, E). Dans des tumeurs de grade II, le marguage observé semble associé à une localisation cytoplasmique et parfois membranaire (Figure 40 B). D'autres cellules d'asctrocytome fibrillaire microkystique ou d'astrocytome gémistocytique ne présentent pas d'expression détectable de la protéine (Figure 40 F, G). Dans les échantillons tumoraux provenant de tumeurs de grade III, observables deux schémas sont selon qu'il s'agit d'astrocytome ou d'oligodendrogliomes. Ainsi, dans les tumeurs astrocytaires, Cx43 n'est visibles que dans de rares cellules sous la forme de points dans le cytoplasme (Figure 40 H). En revanche, dans les tumeurs oligodendrocytaires, le fond fibrillaire apparait abondamment marqué et un signal apparait à la périphérie des oligodendrocytes (Figure 40 I, Figure 42). Enfin, dans les tumeurs de grade IV, Cx43 ne semble pas présente dans la majorité des cellules (Figure 40 J).



Figure 39 : Expression de Cx43 dans des échantillons tumoraux et dans des zones adjacentes histologiquement saines

A : Identification des différentes zones pouvant être observées dans un échantillon provenant d'une tumeur de grade IV. Dans la partie haute, on distingue la zone tumorale avec une densité cellulaire importante et une prolifération vasculaire. Cx43 n'est pas détectée pour sa localisation habituelle au niveau des contacts cellulaires. Dans la partie basse, le tissu est considéré comme sain d'après les critères histologiques. Cx43 est visible dans le cytoplasme de cellules et un marquage diffus correspondant au fond fibrillaire est observable. B: Au sein de la tumeur, le tissu est désorganisé. Un vaisseau néoformé à l'endothélium épaissi (V) et une zone de nécrose (N) sont visibles. Cx43 apparait dans le fond fibrillaire pour certaines régions ou est absente dans d'autres zones. Dans ces dernières, un signal nucléaire (flèche) est observé dans certaines cellules. C: A plus fort grossissement, dans le tissu considéré comme sain, Cx43 est détectée au niveau de la membrane des astrocytes. D: Cx43 peut également être détectée sous la forme d'un signal plus appuyé à la périphérie de vaisseaux. Barre : 100 μm.



Figure 40 : Expression de Cx43 dans des échantillons tumoraux de grade II, III et IV

Cx43 est détectée dans le cytoplasme des cellules et au niveau des contacts cellulaires (**A**, **E**) dans du tissu histologiquement sain, à proximité d'une tumeur gliale. Dans les tumeurs de grade II, Cx43 est présente au niveau de la membrane plasmique (**B** : oligoastrocytome) et dans le cytoplasme sous la forme d'un marquage diffus (**B**; **F** : astrocytome fibrillaire microkystique ; **G** : astrocytome gémistocytique). Certaines cellules ne présentent pas de marquage. Les tumeurs de grade III expriment peu de Cx43 (**C** et **H** : astrocytome anaplasique) ou au contraire présentent une localisation apparemment membranaire (flèche) de Cx43 (**I** : oligoastrocytome). Les tumeurs de grade IV (**J** : glioblastome) montrent une expression diffuse de la protéine au niveau du fond fibrillaire et la majorité des corps cellulaires apparait négative. Barre : 100 µm.



Figure 41 : Expression de Cx43 dans un oligoastrocytome de grade III

Chez un patient diagnostiqué pour un oligoastrocytome de haut grade, Cx43 est détectée à la périphérie de cellules présentant un phénotype oligodendrocytaire. **A** : Immunodétection de Cx43 en microscopie optique. **B** : Immunodétection de Cx43 en microscopie confocale. Barre : 50 µm.

Chronologiquement, c'est dans ce type tumoral que nous avons initialement détecté un signal nucléaire (*Figure 40 D*).

L'ensemble des échantillons présents sur les lames de TMA a été observé afin de caractériser l'expression de Cx43 dans les tumeurs en fonction du grade. Du fait de la désorganisation du tissu et de la présence d'un fond fibrillaire, une quantification exacte n'a pas été possible. Les échantillons présentant une absence totale de l'expression de Cx43 ont été répertoriés. Il apparait ainsi que Cx43 n'est pas exprimée dans 6,5% des échantillons provenant de tumeurs de grade II, dans 11,6% des grades III et dans 37,8% des grades IV (*Figure 42*).

Certains prélèvements ayant été conservés en tumorothèque sous la forme d'échantillons congelés, il a été possible de réaliser des western blots sur deux échantillons provenant de tumeurs de grade II, trois provenant de grade III et sept provenant de grade IV (Figure 43). Il apparait que la Cx43 a été détectée dans les deux échantillons de grade II à 43 kD, sous la forme d'une bande à 43 kD dans deux échantillons de grade III et d'une bande à 20 kD dans un échantillon de grade III. Pour les tumeurs de grade IV, la protéine n'est pas détectée dans quatre échantillons sur sept, un échantillon présente une expression de Cx43 à 43 kD, les deux derniers présentant plusieurs bandes à 43, 30 et 20 kD. Pour les patients pour lesquels nous disposions d'échantillons congelés et inclus en paraffine, les profils d'expression de Cx43 obtenus en western blot et en immunohistochimie ont été comparés. Compte tenu de l'hétérogénéité tumorale, il est apparu que les fragments congelés ou inclus en paraffine provenant d'un même patient semblaient exprimer des niveaux différents de Cx43 selon la zone de la tumeur. Ainsi, par exemple, pour un diagnostic posé de tumeur gliale de grade IV (patient n°408698) dont le prélèvement présentait, en immunohistochimie, une région de tissu histologiquement sain avec un fort marguage pour Cx43 (Figure 46 A), le western blot ne montrait aucune bande pour la protéine (Figure 43).

Cette première partie de l'étude a donc permis de préciser les données de la littérature en confirmant que l'expression de Cx43 tend à être perdue dans les grades tumoraux les plus élevés. Néanmoins, ce phénomène n'est observable que dans une partie de la population tumorale, Cx43 pouvant être détectée dans des tumeurs de haut grade dans certaines cellules. Un élément original apporté par cette étude est la présence d'un signal nucléaire, élément que nous allons maintenant développer.



Figure 42 : Proportion des échantillons présentant une absence complète de Cx43 Chaque échantillon est disponible en triplicata sur les lames de TMA. Sur l'ensemble des trois spots, seuls les échantillons ne présentant pas de marquage pour la Cx43 ont été comptabilisés ici comme négatifs.



Figure 43 : Détection, par western blot, de l'expression de Cx43 dans des tumeurs gliales humaines.

Pour chaque échantillon, 40 µg de protéines ont été chargés. Cx43 est détectée à 43 kD dans sept échantillons sur douze. Trois échantillons provenant de tumeurs de haut grade présentent une bande à 20 kD, et deux tumeurs de grade IV présentent une bande intermédiaire à environ 30 kD. **T1** : témoin positif, lignée de gliome de rat C6.13 chargé à 20 µg de protéines. **T2** : témoin positif, homogénat de cerveau de rat. **II** : échantillons provenant de tumeurs de grade II (450707, astrocytome ; 459592, oligoastrocytome). **III** : échantillons provenant d'une tumeur de grade II présentant des zones de plus haut grade (417826, oligoastrocytome). **III** : échantillons provenant de tumeurs de tumeurs de grade III (418794, astrocytome anaplasique ; 451325, oligoastrocytome). **IV** : échantillons provenant de tumeurs de grade IV (419170, gliobastome multiforme ; 408698, 411456, 414444, 415651, 454693, 452021, glioblastomes).

La connexine 43 présente une localisation nucléaire aberrante

Initialement, lors de notre étude, un signal nucléaire pour Cx43 a été détecté dans des glioblastomes. Puis, l'examen d'un plus grand nombre d'échantillons sur TMA, et en particulier de tumeurs de bas grade, a montré que ce signal pouvait être retrouvé dans des tumeurs de tout grade, mais aussi dans le tissu adjacent à la tumeur (Figure 40). Ce signal a été étudié en microscopie confocale. Cette approche, en permettant des coupes virtuelles dans la profondeur de l'échantillon, a montré que le signal pouvait être retrouvé dans le noyau et non pas à sa périphérie (Figure 44). L'ensemble des échantillons du TMA a été observé en focalisant notre attention sur ce marquage de Cx43 dans le noyau des cellules (Figure 45 A). Sur les dix-neuf échantillons provenant de tumeurs de grade II, cing se sont avérés exempts de signal nucléaire, les autres présentant de 1.1 à 26.3% de novaux margués sur l'ensemble de la population cellulaire, avec une médiane à 5,9%. Sur les douze échantillons de grade III, onze ont été analysés. Le nombre de noyaux présentant un signal nucléaire est compris entre 2 et 21,5% de la population cellulaire totale, avec une médiane à 9,4%. Parmi les tumeurs de grade IV, un échantillon montre une absence de signal nucléaire et vingt-et-un présentent un signal nucléaire dans 1,4 à 29,4% de la population cellulaire totale. Le test de statistique de Mann-Whitney appliqué s'est avéré non significatif: p = 0.0527 entre les tumeurs de grades II et III; p = 0.4801 entre les tumeurs de grades II et IV et p = 0,1633 entre les tumeurs de grades III et IV.

Au sein des différents grades tumoraux, plusieurs diagnostics avaient été posés. En fonction de ces diagnostics, des sous-groupes ont été réalisés dans les grades tumoraux. Du fait du trop faible nombre d'échantillons pour chaque sous-population, il n'a pas été possible d'effectuer des tests statistiques pour les tumeurs de grade II. Cependant, deux populations apparaissent clairement pour les astrocytomes fibrillaires microkystiques, la première regroupant des tumeurs dont les cellules présentant un marquage nucléaire positif est compris entre 0 et 2,9% et le second constitué d'échantillons où le pourcentage de cellules positives est compris entre 13,2 et 26,3. Les deux types de tumeurs de grade III, astrocytomes et oligodendrogliomes, ne présentent pas de différences significatives (test de Mann-Whitney, p = 0,2857). Pour les tumeurs de grade IV, il n'apparait pas de différences entre les gliobastomes mutiformes (GBM) et les glioblastomes (test de Mann-Whitney, p = 1536). En revanche, le test s'avère significatif entre GBM et glioblastomes à cellules géantes (test de Mann-Whitney, p = 0,0182). Les résultats obtenus ne permettent donc pas



Figure 44 : Signal nucléaire pour Cx43 analysé en microscopie confocale

Les immunodétections sont traitées en acquisition séquentielle selon les axes x et y puis selon z dans la profondeur de l'échantillon par pas de 0,2 µm. A : Détection de Cx43 (vert). B : Détection de GFAP (rouge). C : Superposition des images obtenues pour Cx43 et GFAP avec le marquage des noyaux au TO-PRO®-3 (bleu). D : Décomposition d'un signal nucléaire sur 4 µm d'épaisseur. Barre : 50 µm.



Figure 45 : Détermination du pourcentage de la population cellulaire montrant un signal nucléaire pour Cx43 dans des tumeurs de grade II, III et IV.

Le pourcentage de la population cellulaire montrant un signal nucléaire de Cx43 est déterminé pour chacun des échantillons présents sur les lames de TMA. Les résultats obtenus sont traités en fonction du grade tumoral (**A**) mais aussi selon le diagnostic établi pour chaque tumeur : astrocytome fibrillaire, astrocytomes fibrillaires microkystiques, astrocytomes gémistocytiques pour les grades II (**B**); astrocytomes anaplasiques et oligoastrocytomes pour les grades III (**C**); glioblastomes multiformes (GBM), glioblastomes et glioblastomes à petites cellules pour les grades IV (**D**).

d'associer ce signal nucléaire pour Cx43 au grade tumoral. Le signal nucléaire détecté pour Cx43 n'est pas associé aux cellules d'origine gliale ou aux cellules en état de prolifération.

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes attachés à essayer de déterminer quel était le type cellulaire montrant un signal nucléaire pour Cx43. Dans un premier temps, nous nous somme intéressés à un type cellulaire susceptible d'être à l'origine des tumeurs gliales, les astrocytes. Des co-marquages pour Cx43 et la protéine GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), spécifique des astrocytes, ont donc été réalisés (*Figure 46*). Dans le tissu adjacent à la tumeur, Cx43 est détectée au niveau de la membrane plasmique des cellules exprimant GFAP (*Figure 46 A*). Dans la zone tumorale, GFAP semble désorganisée dans les cellules et apparait sous la forme d'un marquage beaucoup moins intense (*Figure 46 B*). Les cellules pour lesquelles un signal nucléaire de Cx43 est visible ne semblent pas exprimer le marqueur GFAP (*Figure 46 C*, *D*, *E*).

Les cellules souches ayant été proposées comme autre origine possible des tumeurs gliales, le marqueur CD133 a également été utilisé. La mauvaise qualité du signal obtenu pour CD133 n'a pas permis de préciser s'il existait une corrélation entre son expression et celle de Cx43.

L'une des caractéristiques des tumeurs gliales étant leur indice mitotique, mesuré à partir du nombre de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67, l'hypothèse d'un signal nucléaire pour Cx43 associé à un état prolifératif s'est posée. L'analyse de coupes sériées montre que les pourcentages de cellules exprimant Cx43 ou Ki67 sont proches dans trois échantillons sur les onze présentés (*Figure 47 A, B, C*). Néanmoins, l'étude simultanée de Cx43 et de Ki67 en microscopie confocale semble indiquer que les cellules montrant Cx43 dans le noyau sont différentes de celles en prolifération (*Figure 47 D, E, F*).

La présence d'un plus grand nombre de cellules montrant un signal nucléaire de Cx43 à proximité des vaisseaux ou parfois dans l'endothélium des vaisseaux (*Figure 40* / pour exemple) nous a incités à rechercher un marqueur de cellules susceptibles d'intervenir lors du développement tumoral. Celui-ci étant associé à une inflammation du tissu [Dunn G *et al.*, 2007], nous avons recherché la présence de leucocytes à l'aide d'un anticorps anti-CD45. Sur des lames sériées, il apparait que l'endothelium des



Figure 46 : Co-immunodétection de Cx43 et d'un marqueur astrocytaire (GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein)

A : Détection de Cx43 (vert) au niveau des contacts cellulaires dans les astrocytes du tissu histologiquement sain situé à proximité de la zone tumorale. **B** : Au cœur de la zone tumorale, un noyau (N) apparait marqué pour Cx43, la protéine GFAP (rouge) est présente mais l'organisation visible dans le tissu adjacent à la tumeur n'est pas retrouvée. Des hématies (H) présentent une autofluorescence. **C** : Noyaux présentant un signal pour Cx43 dans une tumeur de grade IV. **D** : Immunodétection de GFAP dans le même champ qu'en C. **E** : Superposition des images C et D avec marquage des noyaux au TO-PRO®-3 (bleu). Barre : 100 µm.







Figure 47 : Cx43 et Ki67, recherche de co-expression Ki67 est un marqueur nucléaire des cellules en état de prolifération. Des immunodétections de Cx43 (A) et Ki67 (**B**) sont réalisées sur coupes sériées de TMA. Pour chaque échantillon, en triplicata, le pourcentage de cellules positives est déterminé. La mise en parallèle de résultats obtenus pour Ki67 et Cx43 dans onze tumeurs de haut grade (III et IV) est présentée en **C**. La co-immunodétection (**D**, **E**, **F**) de Cx43 (vert) et Ki67 (rouge) montre que les cellules présentant un signal nucléaire pour Cx43 ne sont pas les mêmes que les cellules exprimant Ki67. Les noyaux sont marqués au TO-PRO®-3 (bleu). Barre : 200 µm.



Figure 48 : Cx43 et CD45, recherche de co-expression

CD45 est un marqueur membranaire exprimé par les leucocytes. Des immunodétections de Cx43 (**A**) et CD45 (**B**) sont réalisées sur coupes sériées de TMA. Au niveau de l'endothélium d'un vaisseau néoformé, une accumulation de cellules positives (coloration brun foncé) pour Cx43 ou CD45 est visible. Barre : 200 µm.

vaisseaux présentant des cellules avec un signal nucléaire pour Cx43 présente également une forte proportion de cellules positives pour CD45 (*Figure 48*).

Discussion

Nos travaux ont porté sur l'étude de cinquante-trois échantillons de tumeurs gliales de grades II, III ou IV et sur six échantillons de grade II en cours d'évolution vers un grade III, en immunohistochimie et par western blot. Il s'avère que, contrairement à ce qui avait été proposé antérieurement [Huang RP et al., 1999; Pu P et al., 2003], notre approche ne permet pas de mettre en évidence une différence significative concernant Cx43 entre les tumeurs de grade II et celles de grade III : son expression est, en effet, maintenue dans près de 90% des échantillons, alors que Pu P et al. montraient une expression de Cx43 dans seulement 57% des cas. Si nos résultats vont dans le sens d'une diminution de l'expression de Cx43 dans les tumeurs de grade IV, il apparait qu'il faut néanmoins nuancer certaines conclusions préalablement exposées dans la littérature. En effet, des cellules exprimant Cx43 peuvent encore être détectées dans la majorité des échantillons de glioblastomes (62% des cas). Cette observation est à mettre en parallèle avec d'autres travaux portant sur vingt-guatre tumeurs d'origine astrocytaire supposée (huit de chaque grade) qui déterminaient des pourcentages proches de ceux que nous avons observés [Aronica E et al., 2001]. Les résultats de notre étude et de celle d'Aronica E et al. divergent, en revanche, en ce qui concerne les tumeurs d'origine oligodendrocytaire. En effet, nous avons pu mettre en évidence un marquage positif de Cx43 à la périphérie de cellules présentant un phénotype d'oligodendrocyte. Ce marquage est pour le moins intriguant et nécessiterait de plus amples investigations. En effet, l'induction de l'expression de Cx43 dans des types cellulaires ne l'exprimant pas normalement a déjà été décrite pour d'autres formes de cancer, comme par exemple les carcinomes hépatocellulaires [Krutovskikh V et al., 1994; Wilgenbus KK et al., 1992; Oyamada M et al., 1990]. Cependant, nous n'excluons pas que la protéine soit en fait exprimée par le fond fibrillaire formé par des prolongements astrocytaires.

Un autre élément original apporté par notre étude consiste en la détection d'un signal nucléaire pour Cx43. Celui-ci, d'abord observé dans des tumeurs de grade IV, nous a incités à l'étudier comme marqueur potentiel du grade tumoral. Il s'est finalement avéré qu'il pouvait être retrouvé dans tous les grades tumoraux, ainsi que dans le tissu adjacent à la tumeur. Au sein d'un même grade tumoral, la proportion de cellules présentant ce signal apparait très variable, ce qui semble refléter l'hétérogénéité des tumeurs gliales [Figarella-Branger D et Bouvier C, 2005]. La mise

en évidence de deux groupes déterminés par la différence de ce signal dans les astrocytomes fibrillaires microkystiques nécessite une recherche complémentaire afin de préciser quels sont les autres éléments qui pourraient distinguer ces tumeurs de même diagnostic. L'âge médian au moment du diagnostic ne semble pas être un critère différentiel. Les autres paramètres à considérer seront la médiane de survie de ces deux groupes de patients, leurs antécédents ou la confrontation aux données d'imagerie médicale.

Malgré l'absence de corrélation entre les grades tumoraux et la détection d'un signal nucléaire de Cx43, nous avons néanmoins poursuivi cette étude. En effet, la présence d'un signal nucléaire pour une protéine normalement exprimée au niveau de la membrane plasmique apparait aberrante, mais a déjà été décrite. Ainsi, la βcaténine, protéine des jonctions adhérentes, peut être transloquée dans le noyau [Behrens J et al., 1996]. Dans certains cancers colorectaux, une accumulation de β caténine est observée [Brabletz T et al., 2001 ; Rosin-Arbesfeld R et al., 2000]. Des protéines de la famille des MAGUK telles que ZO-1 et CASK (calcium/calmodulindependent serine kinase) ont aussi été décrites comme pouvant être transloquées dans le noyau, induisant des altérations de la prolifération cellulaire [Hsueh YP, 2006]. De plus, Cx43 serait localisée dans le noyau de cellules transfectées par l'oncogène src [de Feijter et al., 1996] ou par la Cx30 [Mennecier G et al., 2008]. Dans un modèle plus proche de celui que nous avons utilisé, la transfection de Cx43 dans des lignées de gliomes humains conduit à une diminution de la prolifération sans rétablissement de la communication jonctionnelle [Huang RP et al., 1998]. La transfection de cellules HeLa, de cellules HEK 293 et de cardiomyocytes par Cx43 ou par l'extrémité carboxyle de la protéine (15 kD) permet également la détection d'un signal nucléaire [Dang X et al., 2003 ; 2006]. Celui-ci est associé, dans les cellules HeLa, à une diminution de la prolifération cellulaire. Cet élément apparait ici important du fait de la détection de bandes supplémentaires à 35 et 20 kD en western blot. La bande à 20 kD a initialement été considérée comme un produit de clivage de la protéine lors de la préparation de lysat cellulaire [Yeager M et Gilula NB, 1992]. Depuis peu, il a été proposé que ce fragment serait le résultat de l'expression de la séquence le codant spécifiquement ; un traitement à la cyclosporine induit une diminution de l'expression de Cx43 sous sa forme détectée à 43 kD accompagnée d'une augmentation de l'expression du fragment à 20 kD [Joshi-Mukherjee R, 2007]. En plus du fait que cette dernière étude donne une explication possible à la présence d'un fragment de 20 kD, ceci pourrait lever une part du scepticisme à l'encontre d'une localisation nucléaire de la protéine. En effet, s'il est difficilement envisageable de considérer une protéine composée de quatre domaines

en hélices α (hydrophobe) dans le compartiment nucléaire, la présence de son extrémité carboxyle (hydrophile) semble plus facilement compréhensible. Afin de tester cette hypothèse, nous avons souhaité réaliser un isolement de la fraction nucléaire. Les contraintes techniques représentées par du matériel disponible uniquement congelé ou inclus en paraffine et dans des quantités restreintes ne nous a pas permis d'aboutir. Bien qu'un protocole de fractionnement cellulaire ait été réalisé sur du matériel murin congelé, disponible en plus grande quantité, il s'est avéré qu'une légère contamination de la fraction nucléaire par la fraction membranaire ne pouvait justifier l'utilisation d'échantillons rares [pour protocole, voir Guillemin I *et al.*, 2005].

La fin de nos travaux in situ a été consacrée à une tentative d'identification des cellules montrant ce signal nucléaire. En effet, s'il avait été possible d'isoler cette population cellulaire, son étude aurait été facilitée. Les premiers candidats ont été le type cellulaire supposé d'origine des tumeurs gliales, à savoir les astrocytes, d'après la classification de l'OMS. Il s'est avéré que le signal nucléaire pour Cx43 ne pouvait être corrélé à l'expression du marqueur astrocytaire GFAP. Nous nous sommes donc tournés vers la seconde théorie quant à l'origine des tumeurs gliales, celle des cellules souches cancéreuses [Singh SK et al., 2004]. L'anticorps dirigé contre CD133 a permis la détection d'un signal faible difficilement exploitable dans le cadre d'une étude comparée avec Cx43. Aussi, aucune conclusion ne sera donnée sur cette partie. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'une des caractéristiques des cellules tumorales, à savoir leur grand pouvoir prolifératif. Les cellules en prolifération, marquées par Ki67, sont apparues négatives pour le signal nucléaire de Cx43. Il semblait donc que les principales caractéristiques des cellules constituant les tumeurs gliales (expression de GFAP et indice mitotique élevé, surtout pour les tumeurs de haut grade) ne soient pas associées à l'expression de Cx43.

La présence de cellules présentant un signal nucléaire au niveau de l'endothélium des vaisseaux nous a conduits à rechercher un lien éventuel avec les cellules du système immunitaire. Le cerveau a longtemps été considéré comme une structure présentant une immunité différente de celle du reste de l'organisme du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique. Or, lors du développement de tumeurs cérébrales, celle-ci peut être altérée, les capillaires sanguins devenant alors plus perméables [Long DM, 1970]. La présence de lymphocytes et de macrophages a ainsi été décrites dans des prélèvements de tumeurs gliales et certains auteurs proposent que l'infiltration du tissu tumoral par des leucocytes pourraient être un élément favorable de la survie des patients [Palma L *et al.*, 1978 ; Boker DK *et al.*, 1984]. Notre étude ne nous a pas permis de déterminer si les cellules qui montrent un signal

nucléaire pour Cx43 sont les mêmes que celles qui expriment CD45. Il n'est donc pas possible de préciser si Cx43 est retrouvée de façon anormale dans le noyau de cellules leucocytaires, certaines de ces cellules exprimant normalement Cx43 au niveau de leur membrane plasmique [Oviedo-Orta E et Evans WH, 2004]. Si toutefois une colocalisation de Cx43 et de CD45 était mise en évidence, CD45 pourrait alors apparaître comme un marqueur de choix utilisable pour l'isolement par cytométrie en flux de la population cellulaire montrant un marquage nucléaire de Cx43.

Chapitre 4

Mise en culture de tumeurs gliales humaines : caractérisation pour Cx43

Problématique	131
Expression de la Cx43 dans des tissus provenant de tumeurs gliales et dans	
les cultures cellulaires obtenues à partir de celles-ci	132
Discussion	136

Problématique

L'une des difficultés majeures avec les études portant sur des lignées cellulaires tumorales de gliome provient souvent d'un manque d'exactitude du diagnostic formulé lors de l'analyse initiale du prélèvement. En effet, la plupart des lignées de gliomes disponibles ont été établies dans les années 1960 ou 1970, alors que les classifications du grade tumoral utilisées ont évolué depuis. Cette partie de notre étude s'est donc attachée à déterminer s'il était possible de travailler sur des cellules de tumeurs gliales humaines mises en culture. Partant du fait que la majorité des cellules tumorales composant une tumeur gliale de haut grade n'exprime que peu de Cx43 [Huang RP *et al.*, 1999], il s'agissait ici de déterminer si l'expression de la Cx43 endogène était suffisamment faible pour que des cultures cellulaires issues de ces tumeurs puissent servir de modèle pour une expression induite de Cx43.

Ce travail a porté sur six cultures cellulaires obtenues à partir d'exérèses chirurgicales effectuées au CHU de Poitiers (Service de Neurochirurgie). Quatre échantillons sur six ont pu faire l'objet d'une étude comparative de l'expression de la Cx43 dans le tissu d'origine et dans la culture cellulaire obtenue à partir du tissu.

Expression de la Cx43 dans des tissus provenant de tumeurs gliales et dans les cultures cellulaires obtenues à partir de celles-ci

L'expression de Cx43 a été étudiée sur quatre échantillons tumoraux inclus en paraffine et sur les cultures cellulaires obtenues à partir de la mise en culture d'explants de tumeur (*Figure 49*).

La Cx43 présente une répartition homogène dans le tissu tumoral provenant d'un patient diagnostiqué pour un astrocytome fibrillaire de grade II (n° anapath. 481562, culture cellulaire SF7, *Figure 49 A*). Chez le patient diagnostiqué pour un gangliogliome (n° anapath. 481886, culture cellulaire SF8, *Figure 49 C*) et celui présentant un oligodendrogliome (tumeur de haut grade, n° anapath. 482034, SF9, *Figure 49 E*), deux populations cellulaires sont distinguables en fonction de l'expression de Cx43, le type cellulaire exprimant Cx43 montrent une accumulation de la protéine dans le cytoplasme : 65,5% des cellules apparaissent marquées dans le gangliogliome contre 81,1% pour l'oligodendrogliome. Pour le glioblastome (n° anapath. 483495, SF12, *Figure 49 G*), l'expression est hétérogène avec un signal dans le cytoplasme pour 66,6% des cellules. Un signal nucléaire est détectable dans 29,8% des cellules du gliablastome et dans 5,5% des cellules du gangliogliome, les deux types de signaux, cytoplasmique et nucléaire, semblant exclusifs l'un de l'autre.

Les cultures cellulaires obtenues à partir des différentes tumeurs sont confluente après trois à quatre semaines. La moitié des cellules est alors congelée, alors que l'autre moitié est maintenue en culture. Ces cellules sont étudiées en immunohistochimie dès le passage suivant, soit à P₃. Dans les cellules SF7, Cx43 est exprimée au niveau de la membrane plasmique dans 94% des cellules (50 cellules testées), ce qui semble représentatif du tissu d'origine (Figure 49 A, B). En revanche, pour les cellules SF8 et SF9, l'homogénéité de la culture n'est pas représentative du tissu où deux populations distinctes étaient observées. Dans la culture SF8, l'ensemble des cellules montre un marquage de Cx43 au niveau de la membrane plasmique. Bien que la protéine soit retrouvée dans le cytoplasme des cellules, l'accumulation de protéine visible dans le tissu et les cellules n'exprimant pas Cx43 ne sont plus observées (Figure 49 C, D). Les cellules SF9 présentent un marquage peu abondant dans le cytoplasme des cellules, mais il ne semble pas y avoir d'accumulation de grandes quantités de la protéine (Figure 49 E, F). Les cellules SF12, quant à elles, ne présentent qu'un faible marquage ponctiforme dans 38,8% des cellules (85 cellules testées), les autres cellules apparaissant négatives ; le signal nucléaire détecté dans le tissu n'est pas retrouvé (Figure 49 G, H).



Figure 49 : Expression de la Cx43 dans des tumeurs humaines (A, C, E et G) et dans les cultures cellulaires obtenues à partir de ces échantillons (B, D, F et H)

La Cx43 est détectée par immunohistochimie indirecte à l'aide de l'anticorps anti-Cx43 dirigé contre la séquence 250-272 et d'un anticorps secondaire couplé à HRP (**A**, **C**, **E** et **G**; coloration marron et contrecoloration des noyaux à l'hématoxyline) ou à un fluorochrome Alexa Fluor 488 (**B**, **D**, **F** et **H**; émission à 522 nm dans le vert et coloration des noyaux au TO-PRO®-3). La Cx43 est détectée de façon uniforme dans un astrocytome fibrillaire de grade II (**A**). La culture cellulaire (SF7) obtenue à partir de cette tumeur montre également une expression homogène de la Cx43 (**B**). Dans un gangliogliome (**C**), la Cx43 est détectée dans une sous-population cellulaire, accumulée dans le cytoplasme. Cette expression semble moins importante dans le cytoplasme des cellules (SF8) obtenues après culture, alors qu'un marquage au niveau de la membrane plasmique est observé (**D**). Dans un oligodendrogliome de haut grade (**E**), deux populations cellulaires sont également retrouvées, alors qu'une seule population exprimant la Cx43, principalement au niveau cytoplasmique, est visible dans la culture cellulaire (SF9, **F**). Dans un glioblastome (grade IV), la Cx43 est visible dans certaines cellules au niveau cytoplasmique, alors que d'autres n'expriment pas la protéine. Un signal nucléaire est visible dans une population minoritaire (**G**). Dans la culture cellulaire obtenue (SF12) à partir de ce glioblastome, la Cx43 est présente sous la forme d'un signal de faible intensité (**H**). Barre : 50 µm. Des western blots réalisés sur des lysats de cultures cellulaires (SF7, SF9, SF12 ainsi que SF2 et SF21, ces deux dernières cultures provenant de glioblastomes de grade IV) ont permis de mettre en évidence des niveaux variables d'expression de Cx43 allant de 0,2 à 1,9 fois le niveau d'expression de la protéine de référence, GAPDH (*Figure 50*). Le rapport le plus faible (0,2) est obtenu pour la culture SF9 qui provient d'un oligodendrogliome. Pour les trois tumeurs de grade IV, les niveaux d'expression de la Cx43 varient entre 0,6 et 1,9 (SF12 : 0,6 ; SF2 : 1,1 ; SF21 : 1,9).

La culture SF2 s'est avérée difficile à maintenir en culture. Les cultures SF8 et SF9 proviennent de tumeurs gliales d'origine non astrocytaire et la SF12 est une récidive d'une tumeur de grade inférieur. Ces cultures, de par leur origine, n'ont donc plus été utilisées pour la suite de l'étude. Les cultures cellulaires SF7 et SF21 ont été maintenues en culture. L'expression de Cx43 a de nouveau été évaluée après neuf passages (P₉) : les cellules SF21 montrent une quantité de protéine divisée par 3,2 entre le quatrième et le neuvième passage, alors que les cellules SF7 voient la quantité de Cx43 multipliée par 8,4 entre le sixième et le neuvième passage. L'évaluation de la communication jonctionnelle par « *preloading assay* » montre que ces cellules sont douées de canaux fonctionnels (*Figure 51*).



SF7

SF2

SF12

MW -50 kD

EF3

SF21

0613

Α

NΝ

Figure 50 : Niveau d'expression de la Cx43 dans des cultures cellulaires provenant de tumeurs gliales humaines.

La Cx43 est détectée par western blot dans des cultures cellulaires obtenues à partir de tumeurs gliales à P_3 (**A**). Le marqueur de poids moléculaire (MW) est présenté. La quantification du niveau d'expression de la Cx43 est déterminée par rapport à une protéine de référence, GAPDH (**B et C**). A deux temps de culture différents (P4 et P9 pour les SF21 ; P6 et P9 pour les SF7), le niveau d'expression de la Cx43 est variable pour une même culture (**C**).



Figure 51 : Mise en évidence d'un couplage jonctionnel entre cellules (SF7 et SF21) en culture provenant de tumeurs gliales humaines.

Le couplage jonctionnel est étudié par « preloading assay ». Des cellules dites « donneuses » sont d'abord chargées avec deux fluorochromes (Dil, rouge, et calcéine-AM, vert) puis déposées sur des cellules dites « receveuses ». Après deux heures, les cellules donneuses se sont déposées sur la culture. Elles sont colorées par le Dil (**A et D**). Les cellules receveuses captent la calcéine-AM via les jonctions communicantes. Les cellules apparaissent donc vertes si les cellules sont douées de communication intercellulaire (**B et E**). Les panneaux **C et F** montrent les images superposées de A et B ou de D et E. Barre : 50 µm.

Discussion

Cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence une perte rapide de la représentativité tumorale des cultures cellulaires en ce qui concerne l'expression de Cx43. Sur les quatre cultures pour lesquelles il a été possible de comparer l'expression de Cx43 avec le tissu d'origine, il apparait que la mise en culture tend à favoriser la prolifération de cellules exprimant Cx43, à moins que des facteurs environnementaux présents dans le tissu ne freinent l'expression de la protéine et que la mise en culture permette sa ré-induction. En effet, la mise en culture de cellules peut conduire à des variations de l'expression des connexines. Ainsi, dans des cultures d'hépatocytes, l'expression de Cx32 peut être augmentée [Olsavsky KM *et al.*, 2007], alors que des cultures de cellules musculaires lisses conduisent à une perte d'expression de Cx37 et de Cx43 [Arensbak B, 2001].

De plus, à deux temps différents de la culture, le niveau de Cx43 peut s'avérer très variable. Il est donc possible que l'une des sous-populations prolifère plus rapidement et qu'elle représente un pourcentage croissant de la culture cellulaire. Une autre possibilité à envisager est que, pour une même population cellulaire, l'expression de Cx43 varie suite à une évolution phénotypique des cellules dépendante des conditions de culture en monocouche.

Quoiqu'il en soit, une fois ces considérations prises en compte (instabilité phénotypique), il apparait que les cultures cellulaires obtenues ne sauraient être un modèle valable pour l'expression de différentes formes de Cx43, celle-ci étant présente et formant des canaux fonctionnels dans les cultures testées.

Chapitre 5

Expression de formes tronquées de Cx43 dans des lignées de gliomes humains

Problématique	138
Les différentes constructions de connexine 43	139
Caractérisation des lignées de tumeurs gliales étudiées	140
Caractérisation des lignées obtenues après expression de différentes constructions de Cx43	141
Lignée LN18	142
Lignée U87	144
Lignée U251	145
L'expression de Cx43 ou de différentes formes tronquées de la protéine n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire	146
L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine conduit à une diminution de la capacité des cellules à proliférer sans ancrage	148
L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine induit une augmentation de la capacité à migrer des cellules LN18 et U87	150
Discussion	153

Problématique

De nombreux travaux ont proposé que l'expression des connexines pourrait être associée au contrôle de la prolifération cellulaire et à l'expression de gènes [pour revue, Cronier L *et al.*, 2008]. L'effet produit par l'expression de Cx43 serait indépendant de la communication intercellulaire [Huang R *et al.*, 1998]. En outre, il semble que l'expression de Cx43 amputée de son extrémité carboxyle conduisent à une augmentation de la capacité de migration des cellules de gliome de rat C6 [Bates *et al.*, 2007] ou que l'expression de l'extrémité carboxyle seule ait un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules HeLa [Dang X *et al.*, 2003]. Afin d'identifier le rôle de chaque portion de Cx43, nous avons donc produit différentes constructions de Cx43 dont une forme exempte de l'extrémité carboxyle (TrCx43) et l'extrémité carboxyle isolée (232Cx43 et 243Cx43) dans le but de les faire exprimer dans des lignées de tumeurs gliales humaines et d'en voir les effets (*Figure 52*).

Les cultures de tumeurs gliales humaines provenant du Service de Neurochirurgie du CHU de Poitiers n'ayant pas fourni un matériel exploitable (*voir chapitre précédent*), les effets produits par l'expression de différentes formes tronquées de Cx43 ont été investiguées dans des lignées de tumeurs gliales. Les lignées disponibles étaient les suivantes : LN18, U87, U251, SF188 et SF538. Du fait de leur origine tumorale, la lignée SF188 (pédiatrique) et la lignée SF539 (gliosarcome) ne sont pas retenues pour la suite de l'étude.



Figure 52 : Représentation schématique des différentes constructions de Cx43 utilisées Les différentes constructions de Cx43 ont été obtenues à partir de la séquence codante de la Cx43 humaine. La portion exprimée de la protéine est représentée en noir pour les quatre constructions. Cx43 est la forme native de la protéine. TrCx43 correspond à la séquence codant les 242 premiers acides aminés de la protéine ; elle comprend donc les quatre domaines transmembranaires. 232Cx43 code un peptide de 150 acides aminés constituant la totalité de l'extrémité carboxyle. 243Cx43 correspond aux 139 derniers acides aminés de la protéine.



Figure 53 : Digestion enzymatique du plasmide pMSCVpuro contenant les séquences codantes des constructions Cx43, TrCx43, 232Cx43 et 243Cx43

Après intégration des séquences codant les différentes constructions Cx43, TrCx43, 232Cx43 et 243Cx43, l'ADN plasmidique est traité par des endonucléases (Xba I et Hind III ou Pst I). Les produits des digestions enzymatiques sont ensuite soumis à électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des fragments obtenus permet de vérifier la bonne intégration des constructions dans le plasmide. Pistes 1, 5 et 16 : marqueur de taille. Pistes 2, 11 et 20: plasmide pMSCVpuro digéré par Xba I et Hind III. Piste 3 : plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de Cx43 digéré par Xba I et Hind III. Piste 4 : plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de Cx43 digéré par Pst I. Pistes 6 et 17 : plasmide pMSCVpuro digéré par Pst I. Pistes 7 et 8 : deux clones du plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de TrCx43 digéré par Pst I. Pistes 12 et 13 : les deux mêmes clones TrCx43 digérés par Pst I. Pistes 9 et 10 : deux clones du plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de TrCx43 digéré par Pst I. Pistes 12 et 13 : les deux mêmes clones TrCx43 digérés par Pst I. Pistes 9 et 10 : deux clones du plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de 232Cx43 digérés par Xba I et Hind III. Pistes 14 et 15 : les deux mêmes clones 232Cx43 digérés par Pst I. Piste 18 : plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de 243Cx43 digéré par Xba I et Hind III. Piste 19 : plasmide pMSCVpuro contenant la séquence codante de 243Cx43 digéré par Xba I et Hind III. Piste 19 : plasmide pMSCVpuro

Les différentes constructions de connexine 43

Différentes portions de la séquence codante de Cx43 ont été amplifiées par PCR puis insérées dans un plasmide pMSCVpuro (*Figure 52*). Afin de s'assurer de la validité des constructions, le plasmide vide ou le plasmide contenant les différentes séquences ont été traités par des endonucléases après avoir été extraits de cultures de bactéries compétentes DH5a[™] et purifiés. Sur vingt-quatre colonies sélectionnées pour Cx43, une seule s'est avérée contenir la séquence d'intérêt. Quatre clones ont été isolés à partir des douze colonies sélectionnées pour chacune des constructions TrCx43 et 232Cx43. Enfin, un clone positif a été obtenu pour 243Cx43 sur les douze étudiés (*Figure 53*).

Le séquençage des différentes constructions, réalisé par NAPS unit (Biotechnology laboratory, University of British Columbia, Vancouver, Canada), a montré une homologie parfaite de séquence avec la séquence humaine NP000156 (National Center for Biotechnology Information).

Caractérisation des lignées de tumeurs gliales étudiées

Les lignées tumorales LN18 et U251 expriment faiblement la Cx43. Celle-ci est détectée en western blot sous la forme d'une bande hypophosphorylée (*Figure 54 A*). Le rapport du niveau d'expression de Cx43 sur l'expression de la protéine de référence, GAPDH, dans ces deux lignées est de l'ordre de 0,3 et 0,4 (*Figure 54 B*). Leur couplage, évalué par *preloading assay*, est inexistant pour la lignée U251, la lignée LN18 présentant une communication limitée à une cellule dans quelques rares cas (*Figure 55*). La lignée U87 exprime Cx43 sous la forme de deux bandes correspondant à deux niveaux de phosphorylation (*Figure 54 A*). Le rapport de l'expression de Cx43 sur l'expression de GAPDH est estimé à 2,2, soit un niveau d'expression 5,5 fois plus élevé dans les cellules U87 par rapport aux lignées LN18 et U251 (*Figure 54 B*). La forme la plus phosphorylée, associée à l'expression de la protéine au niveau de la membrane plasmique [Musil LS *et al.*, 1990], coïncide avec le couplage mis en évidence (*Figure 55*).



Figure 54 : Expression endogène de Cx43 dans les lignées LN18, U87 et U251

A: L'expression de Cx43 est évaluée par westem blot dans les lignées LN18, U87 et U251. Les lignées LN18 et U251 montrent un taux d'expression faible de Cx43, inférieur de 2,5 (U251) à 3 fois (LN18) par rapport à la protéine de référence GAPDH. La lignée U87, quant à elle, montre une expression forte de Cx43 (2,2 fois plus que le niveau d'expression de GAPDH). La lignée U251 se distingue des lignées LN18 et U87 par l'expression de GFAP. C6.13 est une lignée de gliome de rat transfectée stablement par Cx43 et utilisée comme témoin d'expression de la protéine. **B**: Le niveau d'expression de Cx43 est estimé en réalisant le rapport de l'intensité des bandes pour Cx43 sur l'intensité des bandes pour la protéine de référence GAPDH.



Figure 55 : Evaluation de la communication jonctionnelle par « preloading assay » des lignées LN18, U87 et U251

Un lot de cellules dites « donneuses » est préalablement chargé avec deux fluorochromes. Le premier, Dil (rouge), est un composé lipophile, alors que le second, la calcéine-AM (calcein-AM, vert), est hydrophile et capable de diffuser via les jonctions communicantes. Un nombre déterminé de cellules chargées est déposé sur une culture de cellules dites « receveuses ». Après quatre heures pour les lignées LN18 et U251 et deux heures pour la lignée U87, le couplage jonctionnel est observé. Les cellules LN18 montrent peu de couplage, le colorant ne diffusant que dans de rares cellules. Les cellules U251 ne montrent aucune cellule couplée. Les cellules U87 montrent un couplage abondant. Barre : 100 µm.

Caractérisation des lignées obtenues après expression de différentes constructions de Cx43

Cx43 et les différentes formes tronquées TrCx43, 232Cx43 et 243Cx43 ont été exprimées dans les lignées tumorales. Toutes les expérimentations suivantes ont été réalisées après que les cellules aient été traitées par l'antibiotique de sélection (puromycine). Toutes les cellules ont donc été transduites par les différentes constructions.

Lignée LN18

L'expression de Cx43 dans la lignée LN18 a permis d'amplifier l'expression de la protéine de 62% par rapport au niveau d'expression de la protéine endogène (Figure 56 B, C). Cette expression est associée avec une localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique dans, au minimum, 50% de la population cellulaire, alors que la protéine est localisée dans le cytoplasme, à proximité du noyau, dans la lignée parentale (Figure 56 A). La forme tronquée de Cx43 contenant les quatre domaines transmembranaires (TrCx43) est détectée par western blot à environ 30 kD. En revanche, sa localisation n'a pas pu être déterminée directement par immunocytochimie (Figure 56). Parmi les deux constructions correspondant à l'extrémité carboxyle, 232Cx43 et 243Cx43, seule la seconde a pu être visualisée à 15 kD (Figure 56 B). Par immunocytochimie, les deux constructions sont mises en évidence sous la forme d'un marquage diffus dans le cytoplasme (Figure 56 A) dans près de 50% des cellules pour 243Cx43 et de 25% pour 232Cx43. Du fait du faible niveau d'expression détectable pour 232Cx43, les expérimentations concernant cette construction, dans la lignée tumorale LN18, n'ont pas été menées plus avant. La transduction des cellules par des particules rétrovirales n'exprimant pas de construction (mock) ou contenant la séquence pour 243Cx43 n'induisent pas de variation sur le niveau d'expression de la protéine endogène (Figure 56 C). L'expression de Cx43 dans la lignée LN18 est associée à un rétablissement de la communication jonctionnelle, évaluée par preloading assay. La calcéine-AM semble alors diffusée dans six à dix cellules autour de la cellule donneuse (Figure 57). Un couplage limité à deux ou trois cellules est observé pour TrCx43 dans quelques cas, ce qui suggère que cette forme de la protéine pourrait être exprimée à la membrane dans quelques cellules de la population cellulaire (cette localisation n'ayant pu être montrée par immunocytochimie). Néanmoins, l'analyse statistique ne permet pas de montrer une différence significative avec la





A: Cx43, 232Cx43 et 243Cx43 sont détectées par immunocytochimie indirecte en microscopie à épifluorescence. Cx43 est présente sous la forme d'un signal fort (vert) à proximité du noyau (bleu) dans les cellules LN18 mock. A ce signal s'ajoute un signal dans le cytoplasme et au niveau des contacts cellulaires dans les cellules LN18 Cx43. Les cellules exprimant 232Cx43 ou 243Cx43 présentent un marquage cytoplasmique diffus. TrCx43 n'a pas pu être mise en évidence par cette technique. Les noyaux sont marqués au TO-PRO®-3 (bleu). Barre : 50 µm. **B**: Les différentes constructions sont détectées en western blot à l'aide de deux anticorps. Le premier anticorps, dirigé contre l'extrémité carboxyle reconnait les formes Cx43, 243Cx43 et 232Cx43, alors que le second, dirigé contre la boucle cytoplasmique, reconnait TrCx43. C: Le rapport du niveau d'expression de Cx43 et de GAPDH est stable entre LN18 et LN18 mock, ainsi qu'entre LN18 mock et LN18 243Cx43. Le rapport de Cx43 sur GAPDH dans la lignée LN18 Cx43 est de 1,6, ce qui correspond à une augmentation de l'expression de Cx43 de 60% par rapport à la forme endogène de la protéine.





A: Dil (rouge) est le colorant permettant de repérer les cellules donneuses. La calcéine-AM (calcein-AM, vert) diffuse via les jonctions communicantes. Merge est l'image superposée des deux fluorochromes obtenue en épifluorescence et de l'image de microscopie optique. Barre : 100 μ m. **B**: L'expression de Cx43 conduit à une augmentation du couplage jonctionnel, alors que l'expression de TrCx43 ou de 243Cx43 n'induit pas de différence significative par rapport à la lignée LN18 mock. Test t de Student : *, p<0,05.
lignée LN18 *mock*. De même, l'expression de 243Cx43 n'induit pas de variation du couplage.

Lignée U87

L'expression de différentes constructions de Cx43 dans la lignée U87, qui présente déjà un niveau d'expression significatif de la protéine, avait pour but d'étudier une éventuelle modulation de la fonction de la forme endogène par l'apport de formes tronquées exogènes. La transduction des cellules par la Cx43 a conduit à une augmentation de 2,3 fois du niveau d'expression de la protéine (*Figure 58 A, B*). Cette augmentation de l'expression de la protéine semble associée à une augmentation du couplage (*Figure 58 C*). Du fait de l'impossibilité d'obtenir une culture confluente avec cette lignée (les cellules s'organisent « en réseau », formant des sphères mais pas de monocouche uniforme), l'analyse du nombre de cellules ayant reçu le colorant via les canaux de connexines n'a pas été établi (*Figure 59*). Comme pour la lignée LN18, les constructions TrCx43 et 243Cx43 ont été détectées par western blot à la taille attendue (*Figure 58 A*).

Lignée U251

L'expression des différentes constructions dans la lignée U251 a été obtenue pour Cx43 et 243Cx43. Cx43 est retrouvée au poids moléculaire attendu en western blot et présente une localisation cytoplasmique abondante ainsi qu'un marguage membranaire (Figure 60 A, B). De plus, l'expression de la protéine montre une restauration de la communication intercellulaire ; le nombre de cellules captant le colorant passant d'une cellule seulement dans la lignée mock à quatorze cellules dans la lignée U251 Cx43 (Figure 61). La forme tronquée de la protéine 243Cx43 est visible en western blot à environ 15 kD et apparait sous la forme d'un marquage diffus dans le cytoplasme des cellules (Figure 60). L'expression de 243Cx43 ne conduit pas à une augmentation du couplage (Figure 61). La construction TrCx43 est faiblement détectée en western blot et apparait absente en immunocytochimie (Figure 60). La nonrestauration du couplage jonctionnel ne peut être analysée pour cette forme. En effet, compte tenu du faible signal détecté en western blot, cette absence de couplage pourrait être la résultante d'un niveau d'expression trop faible. La construction 232Cx43 n'ayant pas été mise en évidence par immunofluorescence ou en western blot, son étude n'a pas été poursuivie.



Figure 58 : Expression des différentes constructions de Cx43 dans la lignée U87

A : Les différentes constructions sont détectées en western blot à l'aide de deux anticorps. Le premier anticorps, dirigé contre l'extrémité carboxyle reconnait les formes Cx43, 243Cx43 et 232Cx43, alors que le second, dirigé contre la boucle cytoplasmique, reconnait TrCx43. Toutes les formes de la protéine sont détectées à la taille attendue. La forme 232Cx43 apparait toutefois très faiblement. **B** : Le rapport du niveau d'expression de Cx43 et de GAPDH est stable entre U87 et U87 mock, ainsi qu'entre U87 mock et U87 243Cx43. L'expression forcée de Cx43 multiplie par 2,3 la quantité de Cx43 dans les cellules U87 Cx43 par rapport à la lignée mock. Test t de Student : *, p<0,05. **C** : Les cellules U87 mock, comme les cellules exprimant les différentes formes de Cx43 sont douées de couplage jonctionnel, ici évalué en « preloading assay ». Barre : 100 µm.



Figure 59 : Lignée U87 en culture

Les cellules U87 placées en culture forment un « réseau » puis, lorsque le niveau de confluence augmente, constituent des amas de cellules qui, peu à peu, forment des « sphères ». Ces « sphères » restent en contact avec le fond de la boîte de Petri. Barre : 200 µm.



Figure 60 : Expression des différentes constructions de Cx43 dans la lignée U251 A : Cx43 et 243Cx43 sont détectées par immunocytochimie indirecte (vert) en microscopie confocale. La lignée U251 mock ne présente pas de marquage pour Cx43. Cx43 est visible dans le cytoplasme et au niveau des contacts cellulaires dans les cellules U251 Cx43. 243Cx43 présente un marquage diffus dans le cytoplasme des cellules U251 243Cx43. TrCx43 n'a pas été mise en évidence. Les noyaux sont marqués au TO-PRO®-3 (bleu). Barre : 50 µm. **B** : Les différentes constructions sont détectées en western blot à l'aide de deux anticorps. Le premier anticorps, dirigé contre l'extrémité carboxyle reconnait les formes Cx43 et 243Cx43, alors que le second, dirigé contre la boucle cytoplasmique, reconnait TrCx43. 232Cx43 (non présenté ici) n'a pas été détectée en western blot et présente un marquage diffus faible dans le cytoplasme des cellules U251 232Cx43.



Figure 61 : Evaluation de la communication jonctionnelle par « preloading assay » de la lignée U251 exprimant Cx43, TrCx43 et 243Cx43.

L'expression de Cx43 conduit à une augmentation du couplage jonctionnel, alors que l'expression de TrCx43 ou de 243Cx43 n'induit pas de différence significative par rapport à la lignée LN18 mock. Test t de Student : ***, p<0,001.

L'expression de Cx43 ou de différentes formes tronquées de la protéine n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire

La prolifération des lignées LN18, U87 et U251 a été étudiée pendant douze jours par comptage du nombre de cellules à partir de cultures ensemencées à 50 000 cellules par puits dans des plaques de culture de douze puits. Les temps de doublement estimés sur la phase exponentielle sont respectivement de 21.6 heures. 28,2 heures et 28 heures (Figure 62). Suite à la phase de croissance exponentielle, la phase de plateau, traduisant l'état de confluence de la culture, est observée après 5,5 jours à 2.10⁶ cellules par puits pour la lignée LN18 (*Figure 62 A*) et après 9 jours à 0.9.10⁶ cellules par puits pour la lignée U251 (Figure 62 C). L'utilisation d'une technique colorimétrique d'estimation de la prolifération cellulaire, basée sur l'activité mitochondriale, n'a pas permis d'observer de différence significative de la prolifération cellulaire pour les cellules U251 (Figure 62 D). La lignée U87 mock ainsi que les cellules ayant recu les constructions Cx43 et TrCx43 ne présentent pas de phase de plateau, les cellules ayant la capacité de proliférer sans être adhérentes au support dès que le nombre de cellules atteint 0,5 à 0,6.10⁶ cellules par puits (Figure 62 B). Le comptage des cellules après le huitième jour n'a pas été réalisé du fait de la difficulté à obtenir une suspension de cellules dissociées à partir des sphères formées. Les cellules U87 ayant reçu la forme tronquée 243Cx43 semblent être les seules à présenter une phase de plateau bien que des sphères soient également observables dans la culture cellulaire (Figure 62 B). A l'exception de cette dernière construction, il n'apparait pas de différence significative dans l'allure des courbes entre les lignées mock et les lignées exprimant les différentes constructions, quelle que soit la lignée considérée. Ainsi, l'expression de la Cx43 ou de certaines portions de la protéine ne permettrait pas de ralentir la prolifération des lignées de gliomes LN18, U87 et U251.

L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine conduit à une diminution de la capacité des cellules à proliférer sans ancrage

Les cellules normales ne sont généralement pas aptes à proliférer en suspension en agar mou (absence d'indépendance d'ancrage). Les lignées LN18, U87 et U251 sont des lignées cancéreuses connues pour être tumorigéniques chez la souris et dont la capacité à proliférer en indépendance d'ancrage est établie. L'effet de Cx43 et des formes tronquées TrCx43 et 243Cx43 a été étudié en agar mou. Les colonies



Figure 62 : Effet de l'expression de Cx43 ou des formes tronquées de la protéine sur les lignées LN18 (A), U87 (B) et U251 (C et D) sur la prolifération cellulaire A à C : Evaluation du nombre de cellules par comptage. D : Evaluation de la prolifération cellulaire par dosage colorimétrique de l'activité mitochondriale. L'expression des différentes formes de Cx43 n'induit pas d'effet significatif sur la prolifération des cellules maintenues en culture.

formées à partir de cellules individualisées ont été comptées et mesurées après deux semaines pour les lignées LN18 et U87 et après trois semaines pour la lignée U251.

A partir de trente champs pris au hasard dans la boîte de culture, le nombre de colonies formées est déterminé pour les constructions mock, Cx43, TrCx43 et 243Cx43 (Figure 63 A). Respectivement, le nombre de colonies est estimé à 143 ± 17 , 112 ± 39 , 161 ± 29 et 159 ± 9 colonies dans la lignée LN18, 165 ± 39, 87 ± 1, 91 ± 10 et 131 ± 27 pour la lignée U87 et 102 ± 14, 86 ± 4, 86 ± 14 et 62 ± 5 pour la lignée U251. Comparativement à la lignée mock, seule la construction 243Cx43 semble réduire significativement le nombre de colonies dans la lignée U251. En revanche, la taille des colonies est significativement réduite dans les trois lignées dès que Cx43 ou une partie de la protéine est exprimée. Ainsi, la taille moyenne des colonies formées à partir de cellules LN18 est réduite de 41%, de 37% et de 55% selon qu'elles expriment Cx43, TrCx43 ou 243Cx43 (Figure 63 B). Pour la lignée U87, les colonies formées présentent une taille réduite de 37% lorsqu'elles expriment Cx43, de 40% en présence de TrCx43 et 38% en présence de 243Cx43 (*Figure 63 C*). Enfin, dans la lignée U251, l'expression de ces différentes constructions, dans le même ordre, induit une diminution de 14%, 31% et 58% (Figure 63 D). Ainsi, il apparait que Cx43 mais aussi certaines portions de la protéine exprimées seules permettent de réduire la capacité des cellules à proliférer en suspension dans l'agar mou.

L'expression de Cx43 ou de formes tronquées de la protéine induit une augmentation de la capacité à migrer des cellules LN18 et U87

La capacité des cellules à migrer a été évaluée par *wound healing assay* ou par *transwell assay*.

La migration des cellules LN18, évaluée par *wound healing assay* à 151 µm après vingt-quatre heures, est augmentée au-delà de 200 µm lorsque les cellules expriment Cx43 ou les formes TrCx43 ou 243Cx43 (*Figure 64*). Respectivement, les cellules parcourent ainsi une distance augmentée de 41, 36 et 51%. Le même phénomène est observé dans la lignée U87 par la technique de *transwell assay*. Cette technique a été utilisée ici car l'organisation en réseau de la culture cellulaire rendait l'analyse aléatoire (*Figure 65 A*). Après seize heures, les cellules ayant migré du compartiment supérieur au compartiment inférieur passer de 7,8 a 12,1% de la totalité des cellules. L'expression de TrCx43 augmente également le pourcentage de cellules jusqu'à 11,6%. L'expression de 243Cx43 induit la migration la plus forte avec 18,5% de





A : Observation en microscopie optique des colonies formées en « soft agar » après deux semaines pour les lignées LN18 et U87 mock et exprimant Cx43, TrCx43 ou 243Cx43 et après trois semaines pour la lignée U251 mock et exprimant les différentes formes de Cx43. Barre : 100 μm. **B**, **C et D** : Estimation de la taille des colonies formées. Test de Mann-Whitney : **, p<0,01 ; ***, p<0,001.



Figure 64 : Effet de l'expression de Cx43 ou de formes tronquées de Cx43 sur la migration des cellules LN18

A : Une « blessure » (« wound ») est pratiquée dans les cultures confluentes. Après vingt-quatre heures, la cicatrisation (« healing ») traduit la capacité des cellules à migrer. Des clichés de la même zone sont réalisés en microscopie optique juste après la blessure et après vingt-quatre heures. Barre : 200 μm. **B** : La mesure de la surface entre les deux bords de la blessure permet de déterminer la distance moyenne parcourue par les cellules. Celle-ci est augmentée lorsque les cellules expriment la Cx43 ou ses formes tronquées TrCx43 et 243Cx43. Test t de Student : ***, p<0,001.



Figure 65 : Effet de l'expression de Cx43 ou de formes tronquées de Cx43 sur la migration des cellules U87

A : Les cellules U87 formant un réseau, plutôt qu'une monocouche, le seul critère observable en « wound healing » est la rapidité à laquelle les cellules se déplacent. Après seize heures, des cellules isolées U87 mock occupent déjà une grande partie de l'espace laissé libre par la « blessure » de la culture. Ces expérimentations ne permettent pas de quantifier la capacité de migration de la lignée U87. Barre : 200 μm.
B : La migration des cellules U87, estimée par « transwell assay » montre que les différentes formes de Cx43 induisent une augmentation de la capacité des cellules à migrer. Test t de Student : *, p<0,05 ; **, p<0,01.

la totalité des cellules ayant migré vers le compartiment inférieur (*Figure 65 B*). Dans la lignée U251, en revanche, l'expression de Cx43 ou de ses différentes formes tronquées ne semble pas induire de changement dans la capacité de migration des cellules, qu'elle soit évaluée en *wound healing assay* ou en *transwell assay* (*Figure 66*). Ainsi, dans deux lignées de tumeurs gliales humaines sur les trois étudiées, l'expression de Cx43, de Cx43 amputée de son extrémité carboxyle ou de l'extrémité carboxyle seule est associée à une migration accrue.



Figure 66 : Effet de l'expression de Cx43 ou de formes tronquées de Cx43 sur la migration des cellules U251

A et B : La migration des cellules est évaluée par « wound healing ». Les tests t de Student réalisés ne sont pas significatifs pour les différentes constructions par rapport à la lignée U251 mock. Barre : 100 μm. **C** : De la même façon, la migration estimée en « transwell assay » ne montre pas de différence par rapport à la lignée U251 mock.

Discussion

Au cours de cette étude, nous n'avons pas observé d'effet sur la prolifération cellulaire lors de l'expression de Cx43 ou de ses différentes formes tronquées dans les lignées de gliomes humains LN18, U87 et U251, dans des conditions classiques de culture. Ces résultats diffèrent de ceux préalablement présentés où l'expression de Cx43 induisait une diminution de la prolifération de différentes lignées de gliomes [Zhu D et al., 1991; Naus CC et al., 1992; Huang R et al., 1998; Cirenei N et al., 1998]. Or, dans ces travaux. Cx43 était particulièrement surexprimée du fait de la sélection de clones obtenus après expression de la protéine sous la dépendance de promoteurs forts tels que celui de SV40 [Huang R et al., 1998] ou de cytomégalovirus [Cirenei N et al., 1998]. L'effet induit par Cx43 apparaissait, en outre, dépendant du niveau d'expression de la protéine. Nos constructions de Cx43 étaient exprimées au maximum 2,4 fois plus que GAPDH, ce qui pourrait expliquer nos résultats différents des études précédentes. Cette idée est confortée par les travaux de Bates D et al. (2007) dans lesquels une expression de Cx43 correspondant à 7 fois celle de GAPDH a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire, alors qu'une expression de Cx43 multiplié par 2 par rapport à GAPDH s'avère sans effet.

Au contraire, l'étude de la prolifération en agar mou (indépendance d'ancrage) met en évidence un effet inhibiteur de Cx43 et de ses différentes formes tronquées (TrCx43 et 243Cx43) dans les trois lignées cellulaires LN18, U87 et U251. Par ailleurs, dans un modèle en tri-dimension, l'effet inhibiteur induit par Cx43 et Cx26 sur la prolifération de cellules de cancer mammaire avait été mis en évidence, ce qui confirmait les effets observés in vivo, alors qu'un modèle en monocouche n'avait pu démontré cet effet que pour Cx26 [McLachlan E et al., 2006]. La différence entre les deux modèles (culture en monocouche et en suspension dans l'agar mou) pourrait donc être associée au modèle expérimental. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée pour la lignée U87. L'utilisation de cette lignée en culture sphéroïde ou dans des xénogreffes hétérotypiques, chez des rats immunodéprimés, montre que le profil d'expression de certains gènes peut être modifié. Ces modifications sont encore amplifiées lorsque des cellules U87 sont transplantées dans le cerveau des rats, indiquant l'importance de l'environnement tissulaire dans le développement des tumeurs gliales [Camphausen K et al., 2005 ; Strojnik T et al., 2006 ; Candolfi M et al., 2007]. Le modèle d'étude choisi apparait donc comme un élément primordial dans l'étude de l'effet de l'expression de Cx43.

Les résultats obtenus quant à la prolifération cellulaire des lignées de tumeurs gliales lors de l'expression de Cx43 ou de ses formes tronquées semblent indiquer que Cx43 pourrait jouer un rôle inhibiteur sur la prolifération des tumeurs gliales dans certaines conditions de culture (suspension en agar mou). Cette inhibition est obtenue pour toutes les constructions considérées avec un effet plus important induit par l'expression de l'extrémité carboxyle seule dans la lignée U251. Le fait que toutes les constructions utilisées induisent une diminution de la capacité des cellules à proliférer en agar mou conduit à plusieurs conclusions. (1) Tout d'abord, Cx43 apparait comme un facteur limitant de la prolifération cellulaire, ce qui a déjà été montré auparavant et est en accord avec la théorie émise par Loewenstein il y a maintenant guarante ans [Loewenstein W, 1979]. (2) L'expression d'une forme tronquée de la protéine, composée des guatre domaines transmembranaires et amputée de l'extrémité carboxyle (TrCx43), induit des effets similaires à l'expression de Cx43. Cette forme n'est pas associée à un couplage jonctionnel. Cette absence de couplage est inhabituelle, la plupart des études ayant utilisé des formes tronquées de Cx43 conduisent en effet à une communication intercellulaire [Fishman GI et al., 1991 ; Omori Y et Yamasaki H, 1998]. Néanmoins, une absence de restauration de la communication jonctionnelle a déjà été mise en évidence dans des cellules Hela exprimant une forme tronquée de la protéine [Martinez AD et al., 2003]. Cela suggère donc que Cx43 joue un rôle indépendamment de la communication intercellulaire, comme cela a déjà été montré dans d'autres modèles [Qin H et al., 2003 ; Huang RP et al., 1998 ; Omori Y et Yamasaki H, 1998; Moorby C et al., 2001; Lee HJ et al., 2002; Zhang YW et al., 2003]. La localisation de TrCx43 n'ayant pu être déterminée, il n'est pas possible de préciser si son expression met en jeu des interactions avec des protéines de la matrice extracellulaire (dans le cas d'un adressage à la membrane plasmique), ou s'il s'agit d'interactions avec des protéines intracellulaires ou d'activation de voies de signalisation (dans le cas d'une protéine maintenue dans le cytoplasme du fait d'un défaut d'adressage). (3) L'expression de l'extrémité carboxyle seule (243Cx43) est elle aussi capable d'inhiber la prolifération en agar mou. Cette forme de la protéine étant maintenue dans le cytoplasme, et sans effet sur la communication intercellulaire, il apparait que Cx43 pourrait agir via des interactions protéiques avec des protéines du cytosquelette ou par des voies de signalisation qui restent à déterminer.

La capacité à migrer des cellules a été estimée par *wound healing assay* ou par *transwell assay*. Dans ces modèles, les lignées LN18 et U87 semblent voir leur motilité augmentée lorsqu'elles expriment Cx43. Ceci va dans le sens d'études antérieures où l'expression de Cx43 induisait une augmentation de l'invasion des cellules de gliomes

in vitro [Lin JH *et al.*, 2002 ; Zhang W *et al.*, 2003] ou *in vivo* [Oliveira L *et al.*, 2005]. L'expression des formes tronquées TrCx43 et 243Cx43 conduit également à une augmentation de la motilité. Dans cette situation, tout comme ce qui a été montré quant à la prolifération cellulaire en agar mou, cela suggère que Cx43 pourrait agir indépendamment de la restauration de la communication intercellulaire. Le fait que les deux formes tronquées induisent les mêmes effets implique là encore au moins deux voies de signalisation ou des interactions protéiques différentes. Dans la lignée U251, aucun effet n'a été observé sur la migration cellulaire lorsque ces cellules ont été forcées à exprimer Cx43. L'une des particularités de cette lignée est d'exprimer la protéine GFAP, contrairement aux lignée LN18 et U87. Or, GFAP pourrait être impliquée dans la migration des cellules de gliomes, l'utilisation d'antisens dirigés contre GFAP induisant une augmentation de la migration des cellules U251 [Rutka JT *et al.*, 1998].

Nos travaux ont donc montré que des formes tronquées de Cx43 pouvaient avoir des effets similaires à ceux de la protéine native quant à la prolifération ou la migration des cellules de gliomes. Si l'inhibition de la prolifération cellulaire va dans le sens d'une « normalisation » des cellules tumorales, l'augmentation de la migration des cellules, en revanche, serait en faveur d'un rôle négatif de Cx43. L'expression de Cx43 dans les cellules tumorales pourrait alors faciliter l'invasion du tissu environnant. Des travaux antérieurs avaient déjà montré que le rétablissement de la communication intercellulaire dans des cellules de gliome conduisait à la transformation des astrocytes normaux lors de la transplantation des cellules tumorales dans le cerveau de rats [Zhang W *et al.*, 1999, Zhang W *et al.*, 2003]. Il reste cependant à déterminer si une transformation des cellules environnante serait également observée en absence de rétablissement de la communication, lorsque des formes tronquées de Cx43 sont exprimées par les cellules tumorales.

Chapitre 6

Discussion générale, perspectives et conclusions

Ce travail de thèse avait pour objet l'étude du rôle de Cx43 dans les tumeurs gliales humaines.

Une approche *in situ* a permis de confirmer, du moins partiellement, les données de la littérature [Huang RP *et al.*, 1998 ; Soroceanu L *et al.*, 2001 ; Pu P *et al.*, 2003] quant à une perte d'expression progressive de l'expression de Cx43 parallèlement à l'augmentation de la malignité tumorale. Il semble néanmoins, **d'après nos résultats**, que **la perte d'expression de Cx43 n'apparait pas aussi catégorique que ce qui avait été proposé car une proportion non négligeable de cellules exprime encore Cx43 dans les tumeurs de haut grade. Une observation originale, faite au cours de ce travail, consiste en la détection d'un signal nucléaire de Cx43, celui-ci n'étant apparemment pas associé à un grade tumoral particulier. Il semble pourtant que des groupes de patients puissent être distingués à partir de ce signal aberrant dans le noyau. Nous nous proposons donc, dans un avenir proche, de procéder à une recherche approfondie des éléments qui permettraient de distinguer ces groupes en plus du signal aberrant détecté pour Cx43.**

Si la recherche de marqueurs de type cellulaire n'a pour l'instant pas permis de définir avec certitude quelles étaient les cellules qui montraient un marquage nucléaire de Cx43, il n'en reste pas moins qu'une piste potentielle reste exploitable. La localisation de cellules montrant ce marquage à proximité de vaisseaux présents dans la zone tumorale ou dans leur endothélium, ainsi que la détection de cellules leucocytaires dans la même région, propose ainsi une nouvelle voie d'investigation. Le tissu tumoral peut en effet présenter une infiltration leucocytaire [Dunn G *et al.*, 2007]. Si les cellules marquées pour Cx43 se révélaient être des leucocytes, ces cellules pourraient alors être isolées par l'utilisation de marqueurs de surface spécifiques, et cela à partir du sang de patient et non plus à partir d'échantillons tumoraux, si toutefois bien sûr, le signal nucléaire n'est pas limité aux cellules présentes sur le site de la tumeur.

Ainsi, cette étude s'avère décevante du point de vue de la recherche appliquée : le lien entre l'expression de Cx43 et le grade tumoral n'est que trop ténu et ne permet pas de distinguer les tumeurs de grades II et III. En revanche, du point de vue de la recherche fondamentale, **ce travail est le premier à reporter une localisation nucléaire de Cx43** *in situ*, les travaux antérieurs ayant fait état de ce signal relevant tous d'études *in vitro* [Huang RP *et al.*, 1998 ; Dang X *et al.*, 2003 ; Dang X *et al.*, 2006 ; Mennecier G *et al.*, 2008]. Dans les modèles cellulaires que nous avons utilisés, qu'ils proviennent de cultures d'explants de tumeurs gliales ou de lignées exprimant différentes formes de Cx43, il n'a pas été possible de reproduire ce signal. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet. (1) Les conditions de culture ne permettraient pas de reproduire les conditions favorables à la localisation de la protéine dans le noyau. (2) Si ce signal est associé à une forme tronquée de la protéine, celle-ci n'est pas obtenue à partir des cultures cellulaires de tumeur ou par les constructions réalisées. En effet, les deux extrémités carboxyles produites avaient une taille de 15 et 17 kD, différentes donc de la bande à 20 kD pouvant être observées dans certains échantillons tumoraux. (3) Enfin, si ce signal nucléaire est effectivement associé à des cellules leucocytaires, alors le type cellulaire étudié, à savoir des cellules provenant de tumeurs gliales, n'est tout simplement pas adéquat pour observer ce phénomène.

L'approche menée *in vitro* a mis en évidence un rôle de Cx43 dans la régulation de la prolifération cellulaire en suspension dans l'agar mou et de la migration des cellules tumorales. L'effet de la forme native de la protéine était attendue du fait des nombreux travaux l'ayant déjà démontré [Zhu D *et al.*, 1991 ; Naus CC *et al.*, 1992 ; Huang R *et al.*, 1998 ; Cirenei N *et al.*, 1998]. De façon étonnante, cependant, l'effet inhibiteur de la prolifération n'a pas été reproduit lorsque les cellules étaient maintenues sur un support solide. Ce phénomène pourrait être associé au niveau d'expression de la protéine dans les cellules transduites.

L'expression d'une forme tronquée de Cx43, TrCx43, pourrait relever d'un rôle de plus en plus décrit dans la littérature [Elias LA *et al.*, 2007 ; Prochnow N et Dermietzel R, 2008], celui de protéine d'adhérence, si toutefois la protéine est exprimée au niveau de la membrane plasmique. Parmi les protéines capables d'interagir avec Cx43, p120 et la N-cadhérine, protéines des jonctions adhérentes, ont déjà été décrites [Wei CJ *et al.*, 2005]. L'implication de la N-cadhérine dans la gliomagenèse a déjà été montré, des travaux *in situ* ayant associé une augmentation de l'expression de N-cadhérine à des grades élevés [Utsuki S *et al.*, 2002], alors que des travaux *in vitro*, sur des lignées de gliomes, tendent à montrer qu'une désorganisation des protéines des jonctions adhérentes conduirait à un accroissement des capacités migratoires [Perego C *et al.*, 2002]. Dans notre étude, il s'agirait donc d'étudier l'expression de la N-cadhérine et de Cx43 dans les différentes lignées afin de déterminer si l'expression de différentes formes de Cx43 induit une modification de l'organisation des jonctions adhérentes.

L'expression de l'extrémité carboxyle seule conduit également à une diminution de la prolifération dans un modèle en agar mou et à une augmentation de la migration. Cette forme de la protéine s'avère être localisée dans le cytoplasme, n'est pas associée à une restauration de la communication intercellulaire et ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'expression de la protéine endogène. L'effet produit est donc indépendant des différentes formes de jonctions cellulaires. Le rôle potentiel de facteur de transcription proposé par certaines études [Stains J et al., 2003 ; Stains J et Civitelli R, 2006] n'est pas valable ici, la protéine n'ayant pas été détectée dans le noyau des cellules. Mais Cx43 peut interagir avec des protéines du cytosquelette d'actine via ZO-1. Or le cytosquelette d'actine est particulièrement impliqué dans la motilité cellulaire et son organisation semble modifiée dans les tumeurs d'origine astrocytaire [Belot N et al., 2002]. De plus, il n'est pas à exclure que Cx43 soit impliquée dans des voies de signalisation intracellulaires. La protéine peut, en effet, être phosphorylée par de nombreuses protéines kinases [Giepmans BN, 2004]. Dans un premier temps, notre étude va donc se diriger vers la recherche de modifications de l'expression ou de la localisation des partenaires protéines possibles de Cx43 pouvant être impliqués dans la motilité cellulaire. Par la suite, les voies de signalisation associées aux partenaires protéiques d'intérêt pourront être investiguées.

Ce travail a donc permis de confirmer que Cx43 pouvait agir sur la prolifération et la motilité cellulaire. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents restent encore à identifier. Ceux-ci apparaissent d'autant plus complexes qu'ils pourraient mettre en jeu au moins deux voies différentes, l'expression de formes tronquées de la protéine ne présentant aucun domaine commun étant capable d'induire des effets similaires.

Références bibliographiques

A

Ahmad S, Diez JA, George CH, Evans WH (1999). Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. Biochem J. 339 (Pt 2):247-53.

Ahmad S, Martin PE, Evans WH (2001). Assembly of gap junction channels: mechanism, effects of calmodulin antagonists and identification of connexin oligomerization determinants. Eur J Biochem. 268(16):4544-52.

Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. J Clin Invest. 105(2):161-71.

Akiyama M, Ishida N, Ogawa T, Yogo K, Takeya T (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. Biochem Biophys Res Commun. 335(4):1264-71.

Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD (2002). Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. Oncogene. 21(17):2634-40.

Al-Hajj M, Clarke MF (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene. 23(43):7274-82.

Almqvist PM, Mah R, Lendahl U, Jacobsson B, Hendson G (2002). Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. J Histochem Cytochem. 50(2):147-58.

Ammerpohl O, Thormeyer D, Khan Z, Appelskog IB, Gojkovic Z, Almqvist PM, Ekström TJ (2004). HDACi phenylbutyrate increases bystander killing of HSV-tk transfected glioma cells. Biochem Biophys Res Commun. 324(1):8-14.

Anderson CL, Zundel MA, Werner R (2005). Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. Genomics. 85(2):238-44.

Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Krüger O, Theis M, Willecke K, Sáez JC (2005). Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. J Cell Sci. 118(Pt 1):27-37.

Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH (2001). Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. Histochem Cell Biol. 115(6):479-87.

Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, McMillan JR, Eady RA, Shimizu H (2002). Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development. J Histochem Cytochem. 50(11):1493-500.

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D (2001). Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. Acta Neuropathol. 101(5):449-59.

Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Langmoen IA, Dilber MS, Aints A, Ekström TJ, Almqvist PM (2003). Gap junction-mediated bystander effect in primary cultures of human malignant gliomas with recombinant expression of the HSVtk gene. Exp Cell Res. 284(2):185-95.

Azarnia R, Larsen WJ, Loewenstein WR (1974). The membrane junctions in communicating and noncommunicating cells, their hybrids, and segregants. Proc Natl Acad Sci U S A. 71(3):880-4.

Β

Bailey P, Cushing H (1926). A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. Ed: Philadelphia: Lippincott.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 444(7120):756-60.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics. 83(4):706-16.

Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. Physiology (Bethesda). 21:103-14.

Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC (2007). Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. Glia. 55(15):1554-64.

Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F (2007). French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. J Neurooncol. 84(2):189-99.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003). Primary brain tumours in adults. Lancet. 361(9354):323-31

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996). unctional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature. 382(6592):638-42.

Belot N, Pochet R, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C (2002). Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. Biochim Biophys Acta. 1600(1-2):74-83.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science. 161(839):370-1.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Science. 262(5142):2039-42.

Berthoud VM, Minogue PJ, Guo J, Williamson EK, Xu X, Ebihara L, Beyer EC (2003). Loss of function and impaired degradation of a cataract-associated mutant connexin50. Eur J Cell Biol. 82(5):209-21.

Bertram JS (2004). Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. Arch Biochem Biophys. 430(1):120-6.

Bertram JS, Vine AL (2005). Upregulation of connexin 43 by retinoids but not by non-provitamin A carotenoids requires RARs. Nutr Cancer. 52(1):105-13.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. J Cell Biol. 105(6 Pt 1):2621-9.

Bigner SH, Bullard DE, Pegram CN, Wikstrand CJ, Bigner DD (1981). Relationship of in vitro morphologic and growth characteristics of established human glioma-derived cell lines to their tumorigenicity in athymic nude mice. J Neuropathol Exp Neurol. 40(4):390-409.

Böker DK, Kalff R, Gullotta F, Weekes-Seifert S, Möhrer U (1984). Mononuclear infiltrates in human intracranial tumors as a prognostic factor. Influence of preoperative steroid treatment. I. Glioblastoma. Clin Neuropathol. 3(4):143-7.

Bond SL, Bechberger JF, Khoo NK, Naus CC (1994). Transfection of C6 glioma cells with connexin32: the effects of expression of a nonendogenous gap junction protein. Cell Growth Differ. 5(2):179-86.

Bookstein R, Lee WH. Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene. Crit Rev Oncog. 1991;2(3):211-27.

Borek C (1972). Neoplastic transformation in vitro of a clone of adult liver epithelial cells into differentiated hepatoma-like cells under conditions of nutritional stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 69(4):956-9.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(18):10356-61.

Bradshaw SL, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Han VK (1993). Insulin-like growth factor binding protein-4 gene expression is induced by transfection of gap junction connexin43 gene in a C6 glioma cell line. Growth Regul. 3(1):26-9.

Brand-Schieber E, Werner P, lacobas DA, lacobas S, Beelitz M, Lowery SL, Spray DC, Scemes E (2005). Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. J Neurosci Res. 80(6):798-808.

Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K (2002). Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. J Pathol. 197(5):647-53.

Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H (2005). Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. J Neurochem. 92(5):1033-43.

Bruzzone R, Dermietzel R (2006). Structure and function of gap junctions in the developing brain. Cell Tissue Res. 326(2):239-48.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(23):13644-9.

Burr GS, Mitchell CK, Keflemariam YJ, Heidelberger R, O'Brien J (2005). Calcium-dependent binding of calmodulin to neuronal gap junction proteins. Biochem Biophys Res Commun. 335(4):1191-8.

Burrows FJ, Gore M, Smiley WR, Kanemitsu MY, Jolly DJ, Read SB, Nicholas T, Kruse CA (2002). Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. Cancer Gene Ther. 9(1):87-95.

Butkevich E, Hülsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. Curr Biol. 14(8):650-8.

С

Camphausen K, Purow B, Sproull M, Scott T, Ozawa T, Deen DF, Tofilon PJ (2005). Orthotopic growth of human glioma cells quantitatively and qualitatively influences radiation-induced changes in gene expression. Cancer Res. 65(22):10389-93.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG (2007). Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. J Neurooncol. 85(2):133-48.

Carruba G, Stefano R, Cocciadiferro L, Saladino F, Di Cristina A, Tokar E, Quader ST, Webber MM, Castagnetta L (2002). Intercellular communication and human prostate carcinogenesis. Ann N Y Acad Sci. 963:156-68.

Cascio M (2005). Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. Biochim Biophys Acta. 1711(2):142-53.

Caspar DL, Goodenough DA, Makowski L, Phillips WC (1977). Gap junction structures. I. Correlated

electron microscopy and x-ray diffraction. J Cell Biol. 74(2):605-28.

CBTRUS : Primary Brain tumors in the United States, statistical report, 2005-2006. www.cbtrusorg/reports

Cesen-Cummings K, Fernstrom MJ, Malkinson AM, Ruch RJ (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. Carcinogenesis. 19(1):61-7.

Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavialle M, Denis I (2006). Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. Eur J Neurosci. 24(11):3084-90.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. Neuron. 6(6):983-92.

Charles AC, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Dirksen ER, Sanderson MJ (1992). Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. J Cell Biol. 118(1):195-201.

Chen Y, Hühn D, Knösel T, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I (2005). Downregulation of connexin 26 in human lung cancer is related to promoter methylation. Int J Cancer. 113(1):14-21.

Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP (2004). Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. Dev Biol. 272(1):203-16.

Chung TH, Wang SM, Wu JC (2004). 17beta-estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via the estrogen receptor. J Mol Cell Cardiol. 37(5):1013-22.

Cirenei N, Colombo BM, Mesnil M, Benedetti S, Yamasaki H, Finocchiaro G (1998). In vitro and in vivo effects of retrovirus-mediated transfer of the connexin 43 gene in malignant gliomas: consequences for HSVtk/GCV anticancer gene therapy. Gene Ther. 5(9):1221-6.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 66(19):9339-44.

Cochand-Priollet B, Raison D, Molinie V, Guillausseau PJ, Wassef M, Bouchaud C. Altered gap and tight junctions in human thyroid oncocytic tumors: a study of 8 cases by freeze-fracture. Ultrastruct Pathol. (1998) 22(6):413-20.

Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, Finocchiaro G (1995). The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. Hum Gene Ther. 6(6):763-72.

Connors BW, Long MA (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. Annu Rev Neurosci. 27:393-418.

Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV (2003). Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(20):11388-93

Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC (2002). Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(1):495-500.

Contreras JE, Sánchez HA, Véliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC (2004). Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. Brain Res Brain Res Rev. 47(1-3):290-303.

Cooper CD, Lampe PD (2002). Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. J Biol Chem. 277(47):44962-8.

Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M (2000). ATP-mediated glia signaling. J Neurosci. 20(8):2835-44.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(26):15735-40.

Cottrell GT, Burt JM (2005). Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. Biochim Biophys Acta. 1711(2):126-41.

Crespin S, Defamie N, Cronier L, Mesnil M (2007). Involvements of connexins in carcinogenesis. In "Connexin Biology: the role of gap junctions in disease." Ed. Pandalai SG / Recent Research in Physiology / Research Signpost (sous presse).

Cronier L, Crespin S, Mesnil M (2008). Gap junction and cancer: new functions for an old story. In "Antioxydants and redox signalling" (sous presse).

Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassiné A (1999). Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. Placenta. 20(8):669-76.

Cruciani V, Mikalsen SO (2006). The vertebrate connexin family. Cell Mol Life Sci. 63(10):1125-40.

D

Dahl G, Locovei S (2006). Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? IUBMB Life. 58(7):409-19.

Dang X, Doble BW, Kardami E (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. Mol Cell Biochem. 242(1-2):35-8.

Dang X, Jeyaraman M, Kardami E (2006). Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. Mol Cell Biochem. 289(1-2):201-7.

Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M, Chodkiewicz JP (1997b). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. J Neurooncol. 34(1):61-78.

Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP (1997a). Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. J Neurooncol. 34(1):37-59.

de Feijter AW, Matesic DF, Ruch RJ, Guan X, Chang CC, Trosko JE (1996). Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. Mol Carcinog. 16(4):203-12.

De Pina-Benabou MH, Srinivas M, Spray DC, Scemes E (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K+-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. J Neurosci. 21(17):6635-43.

de Pina-Benabou MH, Szostak V, Kyrozis A, Rempe D, Uziel D, Urban-Maldonado M, Benabou S, Spray DC, Federoff HJ, Stanton PK, Rozental R (2005). Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. Stroke. 36(10):2232-7.

De Vuyst E, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH, Leybaert L (2007). Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. Mol Biol Cell. 18(1):34-46.

DeAngelis LM (2001). Brain tumors. N Engl J Med. 344(2):114-23.

Delmar M (2003). Gap junction remodeling in the failing heart: different connexins--different message? J Cardiovasc Electrophysiol. 14(11):1213-4.

DeVries SH, Schwartz EA (1992). Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina.J Physiol. 445:201-30.

Dewey MM, Barr L (1964). A study of the structure and distribution of the nexus. J Cell Biol. 23:553-85.

Dobrenis K, Chang HY, Pina-Benabou MH, Woodroffe A, Lee SC, Rozental R, Spray DC, Scemes E (2005). Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. Neurosci Res. 82(3):306-15.

Duffy HS, Iacobas I, Hotchkiss K, Hirst-Jensen BJ, Bosco A, Dandachi N, Dermietzel R, Sorgen PL, Spray DC (2007). The gap junction protein connexin32 interacts with the Src homology 3/hook domain of discs large homolog 1.J Biol Chem. 282(13):9789-96.

Dunn GP, Dunn IF, Curry WT (2007). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. Cancer Immun. 13;7:12.

Duval N, Gomès D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R (2002). Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. J Cell Sci. 115(Pt 16):3241-51.

Ε

Eastman SD, Chen TH, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK (2006). Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. Genomics. 87(2):265-74.

Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature. 448(7156):901-7.

Essenfelder GM, Bruzzone R, Lamartine J, Charollais A, Blanchet-Bardon C, Barbe MT, Meda P, Waksman G (2004). Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity. Hum Mol Genet. 13(16):1703-14.

Eugenín EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC (2001). Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(7):4190-5.

Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. Biochem J. 397(1):1-14.

Ewart JL, Cohen MF, Meyer RA, Huang GY, Wessels A, Gourdie RG, Chin AJ, Park SM, Lazatin BO, Villabon S, Lo CW (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. Development. 124(7):1281-92.

F

Falk MM (2000). Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol. 79(8):564-74.

Fallon RF, Goodenough DA (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. J Cell Biol. 90(2):521-6.

Figarella-Branger D, Bouvier C (2005). Histological classification of human gliomas: state of art and controversies. Bull Cancer. 92(4):301-9.

Fishman GI, Moreno AP, Spray DC, Leinwand LA (1991). Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(9):3525-9.

Flachon V, Durand C, Selmi-Ruby S, Rousset B, Munari-Silem Y (2001). Connexin 32 fused to the green fluorescent protein retains its ability to control the proliferation of thyroid cells. Cell Commun Adhes. 8(4-6):447-52.

Frisch C, De Souza-Silva MA, Söhl G, Güldenagel M, Willecke K, Huston JP, Dere E (2005). Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice. Behav Brain Res. 157(1):177-85.

Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004). CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. J Biol Chem. 279(35):36943-50.

Fujimoto E, Satoh H, Negishi E, Ueno K, Nagashima Y, Hagiwara K, Yamasaki H, Yano T (2004). Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: possible involvement of Her-2. Mol Carcinog. 40(3):135-42.

Fujita K, Nakanishi K, Sobue K, Ueki T, Asai K, Kato T (1998). Astrocytic gap junction blockage and neuronal Ca2+ oscillation in neuron-astrocyte cocultures in vitro. Neurochem Int. 33(1):41-9.

Furshpan EJ, Potter DD (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. J Physiol. 145(2):289-325.

Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC (2003). Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. J Neuropathol Exp Neurol. 62(3):304-14.

G

Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. Science. (2002) 296(5567):503-7.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 64(19):7011-21.

Gee J, Tanaka M, Grossman HB (2003). Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer. J Urol. 169(3):1135-7.

Gemel J, Valiunas V, Brink PR, Beyer EC (2004). Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. J Cell Sci. 117(Pt 12):2469-80.

Giepmans BN (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovasc Res. 62(2):233-45.

Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (2001). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. Curr Biol. 11(17):1364-8.

Gilula NB, Reeves OR, Steinbach A (1972). Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. Nature. 235(5336):262-5.

Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC (1995). A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. Biotechniques. 18(3):490-7.

Goldberg GS, Bechberger JF, Tajima Y, Merritt M, Omori Y, Gawinowicz MA, Narayanan R, Tan Y, Sanai Y, Yamasaki H, Naus CC, Tsuda H, Nicholson BJ (2000). Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. Cancer Res. 60(21):6018-26.

Goodenough DA (1974). Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. J Cell Biol. 61(2):557-63.

Goodenough DA (1975). Methods for the isolation and structural characterization of hepatocyte gap junctions. In Methods in Membrane Biology, Vol. III. E. D. Korn, editor. Plenum Press, New York.

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. Cell Tissue Res. 310(3):257-70.

Grossman HB, Liebert M, Lee IW, Lee SW (1994). Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. Cancer Res. 54(11):3062-5.

Gu H, Smith FC, Taffet SM, Delmar M (2003). High incidence of cardiac malformations in connexin40-deficient mice. Circ Res. 93(3):201-6.

Guillemin I, Becker M, Ociepka K, Friauf E, Nothwang HG (2005). A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue. Proteomics. 5(1):35-45.

Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). Mol Pathol. 54(5):293-9.

Η

Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS (2001). Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. J Urol. 166(6):2267-72

Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS (2002). Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. J Urol. 167(2 Pt 1):655-60.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. Cell. 100(1):57-70.

Hanna EA, Umhauer S, Roshong SL, Piechocki MP, Fernstrom MJ, Fanning JD, Ruch RJ (1999). Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro. Carcinogenesis. 20(7):1369-73.

Harris AL (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Prog Biophys Mol Biol. 94(1-2):120-43.

Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(23):13268-73.

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(25):15178-83.

Hofer A, Dermietzel R (1998). Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. Glia. 24(1):141-54.

Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, LeCiel C, Huang RP, Boynton AL (1999). Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. Prostate. 38(1):55-9.

Hsueh YP (2006). The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. Curr Med Chem. 13(16):1915-27.

Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW (1998a). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. J Cell Biol. 143(6):1725-34.

Huang GY, Wessels A, Smith BR, Linask KK, Ewart JL, Lo CW (1998b). Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. Dev Biol. 198(1):32-44.

Huang R, Liu YG, Lin Y, Fan Y, Boynton A, Yang D, Huang RP (2001). Enhanced apoptosis under low serum conditions in human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). Mol Carcinog. 32(3):128-38.

Huang R, Lin Y, Wang CC, Gano J, Lin B, Shi Q, Boynton A, Burke J, Huang RP (2002). Connexin 43 suppresses human glioblastoma cell growth by down-regulation of monocyte chemotactic protein 1, as discovered using protein array technology. Cancer Res. 62(10):2806-12.

Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). Cancer Res. 58(22):5089-96.

Huang RP, Hossain MZ, Sehgal A, Boynton AL (1999). Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. J Surg Oncol. 70(1):21-4.

Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS (2007). Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. Glia. 55(1):46-56.

Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG (2005). Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. Mol Biol Cell. 16(12):5686-98.

Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD (1998). Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. J Pathol. 184(1):37-43.

Jang T, Sathy B, Hsu YH, Merchant M, Recht B, Chang C, Recht L (2008). A distinct phenotypic change in gliomas at the time of magnetic resonance imaging detection. J Neurosurg. 108(4):782-90.

Jiang H, Jin Y, Bu L, Zhang W, Liu J, Cui B, Kong X, Hu L (2003). A novel mutation in GJA3 (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. Mol Vis. 9:579-83.

Jiang JX, Paul DL, Goodenough DA (1993). Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. Invest Ophthalmol Vis Sci. 34(13):3558-65.

Jordan K, Solan JL, Dominguez M, Sia M, Hand A, Lampe PD, Laird DW (1999). Trafficking, assembly, and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells. Mol Biol Cell. 10(6):2033-50.

Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Burrer C, de Mora IA, Delmar M, Taffet SM (2007). Evidence for the presence of a free C-terminal fragment of cx43 in cultured cells. Cell Commun Adhes. 14(2-3):75-84.

K

Kamei J, Toyofuku T, Hori M (2003). Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 312(2):380-7.

Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, White TW, Brink PR, Valiunas V (2008). Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. J Gen Physiol. 131(4):293-305.

Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W (1998). Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. Cell Growth Differ. 9(1):13-21.

Kawasaki Y, Kubomoto A, Yamasaki H (2007). Control of intracellular localization and function of Cx43 by SEMA3F. J Membr Biol. 217(1-3):53-61.

Kernohan JW, Mabon RF, et al (1949). A simplified classification of the gliomas. Mayo Clin Proc.;24(3):71-5.

Kidder GM, Mhawi AA (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. Reproduction. 123(5):613-20.

Kihara AH, Santos TO, Paschon V, Matos RJ, Britto LR (2008). Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina. Neuroscience. 151(4):995-1005.

King TJ, Fukushima LH, Donlon TA, Hieber AD, Shimabukuro KA, Bertram JS (2000). Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. Carcinogenesis. 21(2):311-5.

King TJ, Lampe PD (2005). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. Biochim Biophys Acta. 1719(1-2):24-35.

Kleihues P, Cavanee WK (2000) WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of the Nervous System. Ed: Lyon: IARC Press.

Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ (2000). Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. J Cell Biochem. 79(3):347-54.

Kojima T, Sawada N, Chiba H, Kokai Y, Yamamoto M, Urban M, Lee GH, Hertzberg EL, Mochizuki Y, Spray DC (1999). Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin. Biochem Biophys Res Commun. 266(1):222-9.

Kojima T, Srinivas M, Fort A, Urban M, Lee GH, Sawada N, Spray DC (2001). Growth-suppressive function of human connexin32 in a conditional immortalized mouse hepatocyte cell line. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 37(9):589-98.

Kojima T, Yamamoto T, Lan M, Murata M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N (2004). Inhibition of MAP kinase activity moderates changes in expression and function of Cx32 but not claudin-1 during DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. Med Electron Microsc. 37(2):101-13.

Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Lan M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N (2003). Role of the p38 MAP-kinase signaling pathway for Cx32 and claudin-1 in the rat liver. Cell Commun Adhes. 10(4-6):437-43.

Kozoriz MG, Bates DC, Bond SR, Lai CP, Moniz DM (2006). Passing potassium with and without gap junctions. J Neurosci. 26(31):8023-4.

Kren BT, Kumar NM, Wang SQ, Gilula NB, Steer CJ (1993). Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. J Cell Biol. 123(3):707-18.

Kreuzberg MM, Deuchars J, Weiss E, Schober A, Sonntag S, Wellershaus K, Draguhn A, Willecke K (2008). Expression of connexin30.2 in interneurons of the central nervous system in the mouse. Mol Cell Neurosci. 37(1):119-34.

Krutovskikh V, Mazzoleni G, Mironov N, Omori Y, Aguelon AM, Mesnil M, Berger F, Partensky C, Yamasaki H (1994). Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. Int J Cancer. 56(1):87-94.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. Development. 127(16):3501-12.

Kumar NM, Gilula NB (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. J Cell Biol. 103(3):767-76.

L

Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC (2007). Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. Cancer Res. 67(4):1545-54

Laing JG, Chou BC, Steinberg TH (2005). ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells. J Cell Sci. 118(Pt 10):2167-76.

Laird DW (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. J Bioenerg Biomembr. 28(4):311-8.

Laird DW (2006). Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J. 394(Pt 3):527-43.

Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA (1999). Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. Cancer Res. 59(16):4104-10.

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. Biochem J. 273(Pt 1):67-72.

Lampe PD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, Lau AF (1998). Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. J Cell Sci. 111 (Pt 6):833-41.

Lampe PD, Lau AF (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. Int J Biochem Cell Biol. 36(7):1171-86.

Lan Z, Kurata WE, Martyn KD, Jin C, Lau AF (2005). Novel rab GAP-like protein, CIP85, interacts with connexin43 and induces its degradation. Biochemistry. 44(7):2385-96.

Lantos PL, Pilkington GJ (1979). The development of experimental brain tumours. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. I. Early lesions (abnormal cell clusters). Acta Neuropathol. 45(3):167-75.

Lee HJ, Lee IK, Seul KH, Rhee SK (2002). Growth inhibition by connexin26 expression in cultured rodent tumor cells. Mol Cells. 14(1):136-42.

Levin M, Mercola M (1999). Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node. Development. 126(21):4703-14.

Li WE, Waldo K, Linask KL, Chen T, Wessels A, Parmacek MS, Kirby ML, Lo CW (2002). An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. Development. 129(8):2031-42.

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, Nedergaard M (2002). Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. J Neurosci. 22(11):4302-11.

Litvin O, Tiunova A, Connell-Alberts Y, Panchin Y, Baranova A (2006). What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. J Cell Mol Med. 10(3):613-34.

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. FEBS Lett. 581(3):483-8.

Locovei S, Wang J, Dahl G (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Lett. 580(1):239-44.

Loewenstein WR (1966). Permeability of membrane junctions. Ann N Y Acad Sci. 137(2):441-72.

Loewenstein WR (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochim Biophys Acta. 560(1):1-65.

Loewenstein WR, Kanno Y (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. Nature. 209(5029):1248-9.

Loewenstein WR, Kanno Y (1967). Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. J Cell Biol. 33(2):225-34.

Loncarek J, Yamasaki H, Levillain P, Milinkevitch S, Mesnil M (2003). The expression of the tumor suppressor gene connexin 26 is not mediated by methylation in human esophageal cancer cells. Mol Carcinog. 36(2):74-81.

Long DM (1970). Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. J Neurosurg. 32(2):127-44.

Loring JF, Wen X, Lee JM, Seilhamer J, Somogyi R (2001). A gene expression profile of Alzheimer's disease. DNA Cell Biol. 20(11):683-95.

Μ

Maestrini E, Korge BP, Ocaña-Sierra J, Calzolari E, Cambiaghi S, Scudder PM, Hovnanian A, Monaco AP, Munro CS (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. Hum Mol Genet. 8(7):1237-43.

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. J Cell Biol. 74(2):629-45.

Markert CL (1968). Neoplasia: a disease of cell differentiation. Cancer Res. 28(9):1908-14.

Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. J Cell Sci. 114(Pt 21):3845-55.

Martin PE, George CH, Castro C, Kendall JM, Capel J, Campbell AK, Revilla A, Barrio LC, Evans WH (1998). Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. Reporting intracellular and plasma membrane calcium environments. J Biol Chem. 273(3):1719-26.

Martínez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC (2003). A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap junction plaque formation but not for homo- or hetero-oligomerization. Cell Commun Adhes. 10(4-6):323-8.

Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A (2003). Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. Hum Mol Genet. 12(8):805-12.

Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K (2003). patiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. Neuroscience. 119(3):689-700.

McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW (2006). Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. Cancer Res. 66(20):9886-94.

Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA, Roos BA (1996). Gapjunctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. Mol Carcinog. 15(1):18-32.

Mehta PP, Perez-Stable C, Nadji M, Mian M, Asotra K, Roos BA (1999). Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. Dev Genet.24(1-2):91-110.

Melchheier I, von Montfort C, Stuhlmann D, Sies H, Klotz LO (2005). Quinone-induced Cdc25A inhibition causes ERK-dependent connexin phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun. 327(4):1016-23.

Menichella DM, Majdan M, Awatramani R, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL (2006). Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. J Neurosci. 26(43):10984-91.

Mennecier G, Derangeon M, Coronas V, Hervé JC, Mesnil M (2008). Aberrant expression and localization of connexin43 and connexin30 in a rat glioma cell line. Mol Carcinog. 47(5):391-401.

Mercier F, Hatton GI (2001). Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? J Comp Neurol. 431(1):88-104.

Mesnil M (2004). Gap junctions and cancer: implications and perspectives Med Sci (Paris). 20(2):197-206.

Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. Biochim Biophys Acta. 1719(1-2):125-45.

Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N, Gilula NB (1988). Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. EMBO J. 7(10):2967-75.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood. 90(12):5013-21.

Mobbs P, Brew H, Attwell D (1988). A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axolotl (Ambystoma mexicanum). Brain Res. 460(2):235-45.

Moorby C, Patel M (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. Exp Cell Res. 271(2):238-48.

Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. J Cell Biol. 111(5 Pt 1):2077-88.

Ν

Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE (2003). Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. Glia. 44(3):205-18.

Nagy JI, Li W, Hertzberg EL, Marotta CA (1996). Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. Brain Res. 717(1-2):173-8.

Nakase T, Fushiki S, Naus CC (2003). Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. Stroke. 34(8):1987-93.

Nakashima Y, Ono T, Yamanoi A, El-Assal ON, Kohno H, Nagasue N (2004). Expression of gap junction protein connexin32 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. 39(8):763-8.

Namba H, Iwadate Y, Kawamura K, Sakiyama S, Tagawa M (2001). Efficacy of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy is influenced by the expression of connexin43 in the target cells. Cancer Gene Ther. 8(6):414-20.

Naus CC, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX (1991). Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. Neurosci Lett. 126(1):33-6.

Naus CC, Bond SL, Bechberger JF, Rushlow W (2000). Identification of genes differentially expressed in C6 glioma cells transfected with connexin43. Brain Res Brain Res Rev. 32(1):259-66.

Naus CC, Elisevich K, Zhu D, Belliveau DJ, Del Maestro RF (1992). In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. Cancer Res. 52(15):4208-13.

0

Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, 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(1):7.

Olsavsky KM, Page JL, Johnson MC, Zarbl H, Strom SC, Omiecinski CJ (2007). Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. Toxicol Appl Pharmacol. 222(1):42-56.

Omori Y, Yamasaki H (1998). Mutated connexin43 proteins inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin43 in a dominant-negative manner. Int J Cancer. 78(4):446-53.

Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS, Abrams CK (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. J Neurosci. 27(51):13949-57.

Oviedo-Orta E, Howard Evans W (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. Biochim Biophys Acta. 1662(1-2):102-12.

Oyamada M, Krutovskikh VA, Mesnil M, Partensky C, Berger F, Yamasaki H (1990). Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap

junction gene connexin 43. Mol Carcinog. 3(5):273-8.

Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T (2005). Regulation of connexin expression. Biochim Biophys Acta. 1719(1-2):6-23.

Oyamada Y, Oyamada M, Fusco A, Yamasaki H (1994). Aberrant expression, function and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity. J Cancer Res Clin Oncol. 120(8):445-53.

Ozog MA, Siushansian R, Naus CC (2002). Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. J Neuropathol Exp Neurol. 61(2):132-41.

Pais I, Hormuzdi SG, Monyer H, Traub RD, Wood IC, Buhl EH, Whittington MA, LeBeau FE (2003). Sharp wave-like activity in the hippocampus in vitro in mice lacking the gap junction protein connexin 36. J Neurophysiol. 89(4):2046-54.

Palma L, Di Lorenzo N, Guidetti B (1978). Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. J Neurosurg. 49(6):854-61.

Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. Curr Biol. 10(13):R473-4.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat Rev Cancer. 3(12):895-902.

Paul DL (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. J Cell Biol. 103(1):123-34.

Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, Swenson KI, Goodenough DA (1991). Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of Xenopus oocytes. J Cell Biol. 115(4):1077-89.

Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. Am J Hum Genet. 72(2):408-18.

Pelegrin P, Surprenant A (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J. 25(21):5071-82.

Perego C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Pola S, Cattaneo MG, Francolini M, Vicentini LM, Pietrini G (2002). Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherincatenin adhesion system. J Cell Sci. 115(Pt 16):3331-40.

Phelan P (2005). Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. Biochim Biophys Acta. 1711(2):225-45.

Philippon J (2004). « Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement ». Ed. Masson.

Pierce GB (1974). Neoplasms, differentiations and mutations. Am J Pathol. 77(1):103-118.

Pilkington GJ (2005). Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. Cell Prolif. 38(6):423-33.

Pilkington GJ, Lantos PL (1979). The fine structure of stratified ependyma in the ventricular wall of N-ethyl-N-nitrosourea-treated rats. Acta Neuropathol. 46(3):173-6.

Pitot HC, Dragan YP (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. FASEB J. 5(9):2280-6.

Potter VR (1978). Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture. Br J Cancer. 38(1):1-23.

Princen F, Robe P, Gros D, Jarry-Guichard T, Gielen J, Merville MP, Bours V (2001). Rat gap junction connexin-30 inhibits proliferation of glioma cell lines. Carcinogenesis. 22(3):507-13.

Prochnow N, Dermietzel R (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. Histochem Cell Biol. 130(1):71-7.

Pu P, Xia Z, Yu S, Huang Q (2004). Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors. Clin Neurol Neurosurg. 107(1):49-54.

Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2002). Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. J Biol Chem. 277(32):29132-8.

Qin H, Shao Q, Thomas T, Kalra J, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2003). Connexin26 regulates the expression of angiogenesis-related genes in human breast tumor cells by both GJIC-dependent and - independent mechanisms. Cell Commun Adhes. 10(4-6):387-93.

R

Rana S, Dringen R (2007). Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. Neurosci Lett. 415(1):45-8.

Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R (2005). Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. Eur J Neurosci. 21(12):3277-90.

Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. Science. 267(5205):1831-4.

Retamal MA, Cortés CJ, Reuss L, Bennett MV, Sáez JC (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(12):4475-80.

Revel JP, Karnovsky MJ (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. J Cell Biol. 33(3):C7-C12.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 414(6859):105-11.

Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH Jr, DiGiovanna JJ, Compton JG, Bale SJ (1998). Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratodermia variabilis. Nat Genet. 20(4):366-9.

Robe PA, Jolois O, N'Guyen M, Princen F, Malgrange B, Merville MP, Bours V (2004). Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. Int J Oncol. 25(1):187-92.

Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, Gielen J, Merville M, Bours V (2000). Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetinic acid, and cytosine arabinoside. Biochem Pharmacol. 60(2):241-9.

Rodriguez LG, Wu X, Guan JL (2005). Wound-healing assay. Methods Mol Biol. 294:23-9.

Rose B, Simpson I, Loewenstein WR (1977). Calcium ion produces graded changes in permeability of membrane channels in cell junction. Nature. 267(5612):625-7.

Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. Nature. 406(6799):1009-12.

Rouach N, Avignone E, Même W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. Biol Cell. 94(7-8):457-75.

Rutka JT, Ackerley C, Hubbard SL, Tilup A, Dirks PB, Jung S, Ivanchuk S, Kurimoto M, Tsugu A, Becker LE (1998). Characterization of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas: an immunoultrastructural analysis. Eur J Cell Biol. 76(4):279-87.

S

Saad AG, Sachs J, Turner CD, Proctor M, Marcus KJ, Wang L, Lidov H, Ullrich NJ (2007). Extracranial metastases of glioblastoma in a child: case report and review of the literature. J Pediatr Hematol Oncol. 29(3):190-4.

Saffitz JE, Hames KY, Kanno S (2007). Remodeling of gap junctions in ischemic and nonischemic forms of heart disease. J Membr Biol. 218(1-3):65-71.

Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H (2001). Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. Int J Cancer. 93(3):317-23.

Saito T, Oyamada M, Yamasaki H, Mori M, Kudo R (1997). Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy. Int J Cancer. 73(4):479-85.

Sanson M, Marcaud V, Robin E, Valéry C, Sturtz F, Zalc B (2002). Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models. Cancer Gene Ther. 9(2):149-55.

Sato K, Gratas C, Lampe J, Biernat W, Kleihues P, Yamasaki H, Ohgaki H (1997). Reduced expression of the P2 form of the gap junction protein connexin43 in malignant meningiomas. J Neuropathol Exp Neurol. 56(7):835-9.

Schneider B, Teschner M, Sudermann T, Pikula B, Lautermann J (2002). Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 64(5):324-9.

Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. Biochemistry. 41(18):5754-64.

Serras F, Fraser S, Chuong CM (1993). Asymmetric patterns of gap junctional communication in developing chicken skin. Development. 119(1):85-96.

Shinoura N, Chen L, Wani MA, Kim YG, Larson JJ, Warnick RE, Simon M, Menon AG, Bi WL, Stambrook PJ (1996). Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: implications in brain tumor gene therapy. J Neurosurg. 84(5):839-45.

Singer SJ, Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 175(23):720-31.

Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. J Biol Chem. 280(34):30416-21.

Singh MV, Bhatnagar R, Malhotra SK (1997a). Inhibition of connexin 43 synthesis by antisense RNA in rat glioma cells. Cytobios. 91(365):103-23.

Singh MV, Bhatnagar R, Price CJ, Malhotra SK (1997b). Gap junctions in 9L and C6 glioma cells: correlation with growth characteristics. Cytobios. 89(358-359):209-25.

Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. Oncogene. 23(43):7267-73.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. 63(18):5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. 432(7015):396-401.

Söhl G, Güldenagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, Gutiérrez R, Heinemann U, Willecke K (2000). Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. Brain Res Mol Brain Res. 83(1-2):44-51.

Söhl G, Willecke K (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Commun Adhes. 10(4-6):173-80.

Söhl G, Maxeiner S, Willecke K (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. Nat Rev Neurosci. 6(3):191-200.

Solan JL, Fry MD, TenBroek EM, Lampe PD (2003). Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. J Cell Sci. 116(Pt 11):2203-11.

Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. Glia. 33(2):107-17.

Sosinsky G (1995). Mixing of connexins in gap junction membrane channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(20):9210-4.

Spray DC, Ye ZC, Ransom BR (2006). Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. Glia. 54(7):758-73.

Stains JP, Civitelli R (2005). Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. Mol Biol Cell. 16(1):64-72.

Stains JP, Lecanda F, Screen J, Towler DA, Civitelli R (2003). Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. J Biol Chem. 278(27):24377-87.

Stout C, Charles A (2003). Modulation of intercellular calcium signaling in astrocytes by extracellular calcium and magnesium. Glia. 43(3):265-73.

Stout C, Goodenough DA, Paul DL (2004). Connexins: functions without junctions. Curr Opin Cell Biol. 16(5):507-12.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. J Biol Chem. 277(12):10482-8.

Strojnik T, Kavalar R, Lah TT (2006). Experimental model and immunohistochemical analyses of U87 human glioblastoma cell xenografts in immunosuppressed rat brains. Anticancer Res. 26(4B):2887-900.

Sutor B, Hagerty T (2005). Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. Biochim Biophys Acta. 1719(1-2):59-68.

Tada J, Hashimoto K (1997). Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. J Cutan Pathol. 24(10):628-35.

Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. Trends Neurosci. 28(4):188-95.

Tomai E, Brownell HL, Tufescu TV, Reid K, Campling BG, Raptis L (1999). Gap junctional communication in cultured human lung carcinoma cells. Lung Cancer. 23(3):223-31.

Trosko JE (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. J Biochem Mol Biol. 36(1):43-8.

Trosko JE (2007). Gap junctional intercellular communication as a biological "Rosetta stone" in

understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy. J Membr Biol. 218(1-3):93-100.

Tsai H, Werber J, Davia MO, Edelman M, Tanaka KE, Melman A, Christ GJ, Geliebter J (1996). Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 227(1):64-9.

U

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(26):14720-5.

Uhl M, Weiler M, Wick W, Jacobs AH, Weller M, Herrlinger U (2005). Migratory neural stem cells for improved thymidine kinase-based gene therapy of malignant gliomas. Biochem Biophys Res Commun. 328(1):125-9.

Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J (2000). Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. Am J Obstet Gynecol. 182(5):999-1000.

Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K (2002). Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. J Neurooncol. 57(3):187-92.

V

Valiunas V, Bechberger JF, Naus CC, Brink PR, Goldberg GS (2005). Nontransformed cells can normalize gap junctional communication with transformed cells. Biochem Biophys Res Commun. 333(1):174-9.

Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N (2006). Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. J Cell Biol. 174(4):535-46.

Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. Cell Signal. 18(5):592-600.

Vis JC, Nicholson LF, Faull RL, Evans WH, Severs NJ, Green CR (1998). Connexin expression in Huntington's diseased human brain. Cell Biol Int. 22(11-12):837-47.

W

Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. J Neurosci. 26(20):5438-47.

Wei CJ, Francis R, Xu X, Lo CW (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. J Biol Chem. 280(20):19925-36.

Wei CJ, Xu X, Lo CW (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 20:811-38.

Weidmann S (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. J Physiol. 118(3):348-60.

Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O (1992). Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. Int J Cancer. 51(4):522-9

X

Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW (1997). A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. J Cell Biol. 137(1):203-10.

Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. Development. 133(18):3629-39.

Yano T, Ito F, Kobayashi K, Yonezawa Y, Suzuki K, Asano R, Hagiwara K, Nakazawa H, Toma H, Yamasaki H (2004). Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candiate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. Cancer Lett. 208(2):137-42.

Yeager M, Gilula NB (1992). Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. J Mol Biol. 223(4):929-48.

Ζ

Zhai Y, Wu R, Schwartz DR, Darrah D, Reed H, Kolligs FT, Nieman MT, Fearon ER, Cho KR (2002). Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. Am J Pathol. 160(4):1229-38.

Zhang JT, Nicholson BJ (1989). Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. J Cell Biol. 109(6 Pt 2):3391-401.

Zhang JT, Nicholson BJ (1994). The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. J Membr Biol. 139(1):15-29.

Zhang W, Couldwell WT, Simard MF, Song H, Lin JH, Nedergaard M (1999). Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. Cancer Res. 59(8):1994-2003.

Zhang W, Nwagwu C, Le DM, Yong VW, Song H, Couldwell WT (2003). Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. J Neurosurg. 99(6):1039-46.

Zhang YW, Kaneda M, Morita I (2003a). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. J Biol Chem. 278(45):44852-6.

Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S (2001). Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. Oncogene. 20(31):4138-49.

Zhang YW, Nakayama K, Nakayama K, Morita I (2003b). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). Cancer Res. 63(7):1623-30.

Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CC (1991). Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(5):1883-7.

Zhu D, Kidder GM, Caveney S, Naus CC (1992). Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(21):10218-21.
Annexe

Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process Marc Mesnil, Sophie Crespin, José-Luis Avanzo, Maria-Lucia Zaidan-Dagli Biochimica et Biophysica Acta 1719 (2005) 125 – 145



Available online at www.sciencedirect.com





Biochimica et Biophysica Acta 1719 (2005) 125 - 145

Review

Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process

Marc Mesnil ^{a,*}, Sophie Crespin ^a, José-Luis Avanzo ^b, Maria-Lucia Zaidan-Dagli ^b

^a Equipe Interactions et Communications Cellulaires, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS-UMR 6187, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

^b Laboratorio de Oncologia Experimental, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo,

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, CEP 05508-900 Sao Paulo, SP Brazil

Received 15 September 2005; received in revised form 7 November 2005; accepted 10 November 2005 Available online 21 November 2005

Abstract

Gap junctions are membrane structures made of intercellular channels which permit the diffusion from cytoplasm to cytoplasm of small hydrophilic molecules. Nearly 40 years ago, the loss of functional gap junctions has been described in cancer cells and led to the hypothesis that such type of intercellular communication is involved in the carcinogenesis process. From this time, a lot of data has been accumulated confirming that gap junctions are frequently decreased or absent in cancer cells whatever their tissue and species origins. Here, we review such data by insisting on the possible links existing between altered gap-junctional intercellular communication capacity (or the altered expression of their constitutive proteins, the connexins) and the stages of cancer progression in various cancer models. Then, we analyse particular aspects of the disturbance of connexin-mediated communication in cancer such as the cytoplasmic localization of connexins, the lack of heterologous communication between cancer cells and normal cells, the role of connexin gene mutations in cancer. In a separate part of the review, we also analyse the disturbance of gap-junctional intercellular communication during the late stages of cancer (invasion and metastasis processes). © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cancer, Carcinogenesis; Connexin; Gap junction; Gap-junctional intercellular communication

Contents

1.

Intro	duction
Conn	exins and cancer progression
2.1.	Connexin loss as an early event of cancer progression
2.2.	Liver cancer as a model of connexin-related cancer progression
	2.2.1. Human liver cancer
	2.2.2. Rat liver cancer
2.3.	Skin cancer
	2.3.1. Studies on murine and human skin tumors
	2.3.2. Studies on in vitro models of skin cancer
2.4.	Bladder cancer
	2.4.1. Studies on human material
	2.4.2. Studies on rat material
2.5.	Oesophageal cancer
2.6.	Prostate cancer

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 45 36 76; fax: +33 5 49 45 40 14. *E-mail address:* marc.mesnil@univ-poitiers.fr (M. Mesnil).

0005-2736/\$ - see front matter @ 2005 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.bbamem.2005.11.004

	2.7.	Breast t	tumors	133
	2.8.	Lung ca	ancer	133
	2.9.	Discuss	sions about the models used	134
3.	Aberr	ant gap-j	junctional intercellular communication and cancer	134
	3.1.	Cytopla	Ismic localization of connexins	134
		3.1.1.	Cytoplasmic localization of connexins in vivo	135
		3.1.2.	Cytoplasmic localization of connexins in vitro	135
		3.1.3.	Mechanisms leading to the aberrant localization of connexins	136
	3.2.	Lack of	f heterologous gap-junctional intercellular communication	136
	3.3.	Connex	in mutation and cancer	136
		3.3.1.	Cx37	136
		3.3.2.	Cx32	137
		3.3.3.	Cx43	137
		3.3.4.	Cx31.1	137
		3.3.5.	Other aspects and conclusions about connexin gene mutation and cancer	137
4.	Conne	exins and	1 metastasis	138
	4.1.	Cell dis	ssociation and invasion	138
	4.2.	Extravas	sation and formation of secondary tumors	139
5.	Concl	usions .		140
	5.1.	Connex	in expression as a prerequisite for the loss of growth control	140
	5.2.	The effe	ect of a lack of connexins on gene expression	140
	5.3.	General	conclusions	140
Ack	nowled	igements	\$	141
Refe	rences			141

1. Introduction

Gap junctions are present in all cell types of Vertebrates, except very few cases such as red blood cells, platelets, some neurons, mature skeletal muscle fibers and spermatozoids [1]. According to their ubiquity, it seems then reasonable, as it is generally admitted, to consider that gap junctions are fundamental structures necessary for cell differentiation [2,3], tissular physiology, and normal functions of the organs of the body [1].

Verifying, at least, this very general statement, physiologically abnormal cells such as cancer cells, can be added to the limited list of gap-junction deficient cells. Going through the literature in this domain, it is first surprising to see that gapjunction deficiency has been observed in cancer cells from a large panel of tissue and species origin; an observation supporting the general assumption that such a deficiency is associated to the cancer phenotype [4–6]. However, by considering precisely the literature, this general assumption may look more complex and less homogenous than expected depending (1) how gap-junction deficiency was defined and (2) on which cell or tissue models the observations have been carried out.

First, gap-junction deficiency has been defined in the literature from either the lack of gap-junction plaques through ultrastructural approaches (electron microscopy, freeze fracture) to the lack of gap-junctional intercellular communication (GJIC). GJIC itself has been defined with different meanings depending on the technical approaches used for estimating its capacity: electrical coupling, metabolic cooperation or dye-transfer assay. In this last case, the size and the biophysical properties of the tracers define the communication capacity

even if they do not have any metabolic role. We may then argue about the concluding statement (lack of GJIC) when dyetransfer assay has been used but not electrical coupling. We may also argue about such a statement when the GJIC capacity of cancer cells and normal cells from the same origin has not been compared.

Secondly, it is legitimate to wonder whether it is possible to compare the GJIC estimations obtained from very different models such as in situ and ex vivo approaches or in vitro by using primary cells and established cell lines. Similarly, is the term "cancer" appropriate whatever we consider a sporadic tumor in human, a chemically-induced tumor in animals, primary cultures deriving from such tumors or established cell lines? Moreover, in addition to these different ways of estimating the GJIC capacity applied on these different (cancer) models, we have also to consider the animal species from which the tumor cells do originate. This last aspect is very important if we keep in mind that a rodent cell is much easier to transform and to become tumorigenic than a human cell. In other words, do we really get similar conclusions by using human or animal cells? However, despite these fundamental and important questions, the large amount of in vitro and in vivo data which has been accumulated do show that GJIC is frequently altered in cancer cells whatever their tissue and species origins.

The story nearly started 40 years ago. It was in 1966 that one of the first links between gap junctions and cancer was established when Loewenstein and Kanno reported a lack of electrical coupling in rat hepatomas. This phenomenon was observed in both chemically-induced hepatomas as well as in Morris and Novikoff's rat transplanted hepatomas [7,8]; a situation which was completely different from the well-coupled normal liver cells [9]. Then, similar results were observed in

126

Organ/tissue	Pathology	Study	GJIC	Cx expression	Reference
Bladder	Normal urothelial	Cell lines	+ (Scrape loading)	Cx26 and Cx43 (Northern);	[19]
	cells			Cx26 ↑ (mRNA) in confluent cultures	[19]
	Cancer	Cell lines	_	$Cx26 \mid (mRNA)$	[20]
	Normal urothelium	Tissue	NT ^a	$Cx26^{b}$ (punctuate	[20]
				staining in basal laver)	[=+]
		Tissue	NT	Cx26 1 (70% of tumors)	
	Low grade	Tissue	NT	Diffusely expressed (28%)	
	non-invasive				
		Tissue	NT	Heterogeneous loss of expression (44%)	
		Tissue	NT	Extensive loss of	
				expression (28%)	
	High grade (invasive)	Tissue	NT	Diffuse expression (32%)	[19]
		Tissue	NT	Heterogeneous (41%)	
		Tissue	NT	Extensive (27%)	
Brain	Epilepsy	Primary culture	High (FRAP) ^c	Cx43 (intense)	[21]
	Low-grade	Primary culture	Moderate (FRAP)	Cx43 ↓ (moderate intensity)	[21]
	astrocytomas	-			
	Glioblastoma multiforme	Primary culture	Lowest (FRAP)	$Cx43 \downarrow$ (low levels)	[21]
	Glioma (Grades I and II)	Tissue	NT	Cx43 (intense)	[22,23]
	Glioma (Grade III)	Tissue	NT	Cx43 (very weak)	
	Glioma (Grade IV)	Tissue	NT	Cx43 (almost not detectable)	[22,23]
Breast	Normal	Tissue	NT	Cx26 (-)	[24]
				Cx43 (punctuate staining in	[24]
				myoepithelial cells)	1
	Benign lesions	Tissue	NT	Cx43 (punctuate staining in	[24]
	e			myoepithelial cells)	
	Ductal carcinoma	Tissue	NT	Cx43 (punctuate staining in	[24]
				myoepithelial cells)	
	Lobular carcinoma	Tissue	NT	Cx26 (-), Cx43 (-)	[24]
	Mucoid carcinoma	Tissue	NT	Cx43 (punctuate)	[24]
	Invasive carcinomas	Tissue	NT	↑ Cx26 (cytoplasmic	[24]
				staining + heterogeneous:	
				15/27 samples);	
				Cx43 (in stromal cells:	[24]
				27/27 samples;	
				heterogeneous expression	
				in carcinoma cells and	
				intracellular: 14/27 samples)	
	Normal	Tissue	NT	Cx43 (+)	[25]
	Infiltrated and	Tissue	NT	Cx43 (-)	[25]
	non-infiltrated				
	ductal carcinoma				(2.5)
	Infiltrated and	Tissue	NI	Cx43 (-)	[25]
	non-infiltrated				
	carcinoma	Coll llow	A TT	C-12 () (1/(1) 1 h	[25]
	Carcinoma	Cell lines	NI	Cx45 (-) (4/0 cell lines by Western and Northern)	[25]
Comin	Normal	Tisma	NT	(ref)	[26]
Cervix	Dueplactic regions	Tissue	NT	Cx43	[26]
Endometrium	Normal	Tissue	NT	$Cx26$ and $Cx22^d$	[20]
Endometrum	Nominal	Tissue	NT	Cx26 and Cx32	[27,20]
	Hyperpiasia	Tissue	IN I	(Week on possible 72 80%)	[27,28]
				(weak of negative, 75-80%;	
				autoplasm: 20-27%	
				C_{x43} (weak)	[27.29]
	Cancer	Tissue	NT	Cx26 and Cx32	[27.28]
	Caller	115500	141	(Weak or negative: 76-70%)	[0عر، ع]
				Diffuse: 15-18%: Normal: 6%)	
				15111050. 15-1070, Notifial. 070J	

(continued on next page)

Table 1 (continued	1)				
Organ/tissue	Pathology	Study	GJIC	Cx expression	Reference
Head and neck	Squamous cell carcinomas	Primary cells	NT	↓Cx31.1 (cDNA microarray)	[29]
Larynx	Normal	Tissue	NT	Cx26, Cx30, Cx43 ^e	[30]
	Squamous cell	Tissue	NT	Cx26, Cx32, Cx43	[30]
	carcinoma			(Heterogeneous expression)	
Liver	Normal	Tissue	+t	Cx32 (+), Cx26 (+), Cx43 (-)	[31]
	Hepatocellular	Tissue	\downarrow^{f}	Cx26 U/Cx32=cytoplasmic ^g	[31,32]
	carcinomas			Cx43 ↑ (cytoplasmic)	[31,33]
Lung	Normal	Tissue	NT	Cx26 (-), Cx32 (-), Cx43 (+)	[32]
	Carcinoma	Cell line	\downarrow^{h}	Cx43 ↓ ⁱ	[34]
	Small-cell carcinoma	Tissue	NT	Cx26 ↑, Cx32 (−), Cx43 ↓	[32]
	Non-small cell	Tissue	NT	$Cx43 \downarrow Cx32$ (-) poorly	[35]
	carcinomas ⁱ			differentiated	
		Freshly explanted	_k	NT	[35]
		tumor cells			
		Cell lines	k	NT	[35]
Oesophagus	Normal	Tissue	NT	Cx26 Cx43 (NT)	[36]
				Cx26 ¹ and Cx43 ¹	[37]
				Cx26 and Cx43	[32]
	Squamous-cell	Tissue	NT	$Cx26 \downarrow^m$ and $Cx43 \downarrow^m$	[32]
	carcinoma				
Ovary	Normal	Primary cultures ⁿ	Extensive ^h	Cx43 (Cx26, 32, 37, 40:	[38]
				not detected)	
		Tissue	NT	Cx43 cytoplasmic and	[38,39]
				punctated Cx26 (-), Cx32 (-)	
	Adenocarcinoma	Cell lines	None or little ⁿ	None	[39]
				Cx43 (Northern and western)	
				(stained positively: 59%)	
	Ovarian endometrioid adenocarcinomas	Tissue	NT	↑ Cx43 mRNA°	[40]
	Serous	Tissue	NT	Cx43 (1) Cx26 (-), Cx32 (-)	[38]
	cystadenocarcinomas			(19% stained positively for Cx43)	[39]
Prostate	Normal	Tissue	NT	Cx26(-) Cx32(-) Cx43(+)	[32]
	Benign tumors	Tissue	NT	Cx26 (NT) Cx32 (NT) Cx43(+)	[41]
	Cancer	Tissue	NT	Cx26 (NT) Cx32 (NT) Cx43↓	[41]
	Normal	Tissue	NT	Cx32 in cell-cell contact areas	[42]
	Tumors	Tissue	NT	Cx32 Cx43 in cell-cell contact areas	[42]
				(differentiated tumors) cytoplasm	
				and loss in advanced stages	
				(undifferentiated tumors)	
	Normal	Tissue	NT	Cx43: basal epithelial cells	[43,44]
				Cx32: luminal epithelial cells	[43,44]
	Benign prostatic	Tissue		Cx32 \uparrow and Cx43 \uparrow	[43,44]
	hyperplasia			(Increase of incidence and	
				intensity in epithelial cells)	
	Cancer	Tissue	NT	Cx43 (-): 65%	[43,44]
				Cx32 (-): 38%	
				Cx43 (-) Cx32 (-): 28%	
	In poorly			Cx43 (-): 90%	[43,44]
	differentiated cancer		k.	Cx32 (-): 60%	
	Normal	Cell lines	+"	Cx32 Cx40 transcripts	[45]
	Malignant	Cell lines	p	Cx43 transcripts GJIC	[45]
	Non-tumorigenic	Cell lines	p	Cx43	[46]
	Malignant	Cell lines	n 1	Cx43	[46]
	Normal	Epithelial	+n	Cx43	[47]
	-	primary cells	h		
	Tumor	Cell lines	_"	↓ Cx43 (impaired	[47]
				post-translational	
<i>a</i> .				modification)	
Skin	Normal	Tissue	NT	Cx43 st	[48]
	Basal cell carcinoma	Tissue	NT	Cx43 ↓'	[48]
	Squamous cell				
	carcinoma	T .'	NIT	0-42 + 1 0-27 +5	[22]
	Basal cell carcinoma	Issue	NI	$Cx43 \downarrow$ and $Cx26 \uparrow^{\circ}$	[32]

M. Mesnil et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1719 (2005) 125-145

Table 1 (continued)						
Organ/tissue	Pathology	Study	GJIC	Cx expression	Reference	
Testes	Testes infiltrated	Tissue	NT	Cx43 Cx26 (-)	[49]	
	Testes infiltrated	Tissue	NT	Cx43 (-)	[49]	
	with carcinoma in situ					
	Testes infiltrated	Tissue	NT	Cx26 (cytoplasmic)	[49]	
	with seminoma					
Thyroid	Normal	Tissue	NT	Presence of GJ (Freeze-fracture)	[50]	
	Oncocytic adenoma	Tissue	NT	No GJ		
	Oncocytic carcinoma	Tissue	NT	No GJ		
	Papillary carcinoma	Tissue	NT	Presence of GJ		

^a NT: not tested.

^b When there is no indication on the techniques used the expression of connexins was studied by immunocyto(histo)chemistry or immunofluorescence, and the connexins are expressed.

^c FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching.

^d Expression fluctuating during the phases of the reproductive cycle. Weak expression during the proliferation phase.

e Cx26 and Cx30 detected in parabasal and intermediate layers of the laryngeal epithelium. Cx43 detected in parabasal, basal and lower layers.

f Lucifer yellow transfer assay performed on fresh surgically removed samples.

g Only deficiency in normal punctate Cx32 and Cx26 staining was observed with altered localization of these proteins in some tumors.

h Microinjection of Lucifer yellow.

ⁱ Compared to non-transformed lung epithelial cells.

^j Adenocarcinomas and squamous cell carcinomas.

k Estimation of GJIC by electroporation.

¹ Cx26 is specifically detected in the basal and intermediate layers of the squamous epithelium of esophagus. Similar but weaker pattern was observed for Cx43. Cx32 was not detected.

^m Cx26 and Cx43 were coexpressed and confined to small areas in the turnor, whereas most parts of the turnors did not show any specific labeling. No significant decrease was observed between the primary turnor and the lymph-node metastasis [30].

n 2-4 passages of surface epithelium.

° Associated with deregulation of β-catenin.

^p Scrape loading and FRAP.

^q Cx43 was detected by immunoelectron microscopy and classical immunofluorescence. The expression varied according to the skin layers (weak expression in basal layer, increased expression in spinous layer and negative in homy layer).

^r Small number of small gap junctions and cytoplasmic localization of the Cx43 (immunofluorescence and immunoelectron microcopy).

⁸ Immunoflurescence heterogeneity of the Cx26 staining which looks more pronounced at the periphery of the tumors.

transplanted rat and hamster thyroid tumors [10]. The last example of this period came from human carcinoma of the stomach in which no electrical coupling was detected [11]. Already, in this short period of time, the same phenotype (lack of electrical coupling) appeared to be a common characteristic of solid tumors differently induced (chemically, transplanted or spontaneous) and originating both from various Mammal species (human, rat, hamster) and unrelated tissues (liver, thyroid, stomach). This first panel of data, coming from Loewenstein's laboratory and colleagues, established tumors, or cells derived from tumors, as communication deficient contrary to their normal counterparts. Since the most obvious phenotypic aberration of tumor cells is a deregulated growth, all these observations are at the origin of the general assumption that gap junctions are involved in cell growth control. The hypothesis linking lack of GJIC and cancer has been consigned in a review by W. Loewenstein himself [4]. Then, such an hypothesis has been reinforced by giving a more active involvement in carcinogenesis to gap junctions once tumor-promoting agents were found to be inhibitors of this type of cell-to-cell communication [12-15].

Now, it is known that the gap-junction channel (about 15 Å diameter) is expected to permit the cell-to-cell transmission of a wide range of cellular molecules (inorganic ions, metabolites,

high-energy phosphates, nucleotides, cyclic nucleotides, second messengers, etc.) [16,17]. A priori, it would not be surprising to consider that such an ubiquitous and ancient intercellular channel adapted, through the Vertebrate evolution, to a wide variety of cellular functions involving the intercellular transfer of molecules; one of these functions being the intercellular transmission of growth-regulating signals. Forty years after the original observations, the hypothesis associating lack or diminished gap junctions and cancer is still valid and developing with new emerging concepts like the possible involvement of stem cells and their GJIC capacity in carcinogenesis [18].

In order to understand better how do gap junctions are involved in carcinogenesis, several in vitro and in vivo analyses then attempted to describe an association between disturbed connexin expression and particular stages of cancer progression. A review of such studies performed on human cancer materials is presented in Table 1. The object of this article is to review first such data not only obtained from human but also animal materials by insisting on the possible links that can be established between altered GJIC and the stages of cancer progression. Then, some particular aspects linking GJIC and cancer will be analysed such as the cytoplasmic localization of the connexins, the lack of homologous and heterologous communication among cancer cells, mutation of the connexin

129

genes and the involvement of GJIC in invasion and metastasis processes.

2. Connexins and cancer progression

An important fact to consider is whether the decrease of GJIC and/or connexin expression do follow the cancer progression. If such a relationship does exist, it may mean that connexins are involved in the carcinogenesis process; the progressive loss of GJIC favorizing the tumor progression.

2.1. Connexin loss as an early event of cancer progression

If a decreased expression of connexins has been often claimed in carcinogenesis; it is difficult to indicate at which step of the multistage process it really does occur. It has been suggested that tumors may derive from the clonal expansion of an adult stem cell that either does not express connexins or is sufficiently differentiated to express them. The first situation would explain why the cells do not communicate from the very early stages of tumorigenesis. The second situation would illustrate why cancer cells do express connexins at the early stages of carcinogenesis; the level of expression and/or function of connexins being then decreased by the onset of oncogenic activations at later stages of tumor progression. This so-called stem-cell concept has been extensively reviewed elsewhere [18].

In some cases, the decreased expression of connexins indeed seems to be an early event, occurring in dysplastic cells of precancerous lesions; which is hypothesized to contribute to their neoplastic progression. This is the case for Cx43 which is highly reduced in the dysplastic regions of the human cervix compared to the normal tissues [26]. Hyperplasia of endometrium also exhibits such an abnormal expression for Cx26 and Cx32 [28]. Similarly, the lack of detection of gap junctions by freeze fracture in thyroid tumors whatever their stages (adenomas and carcinomas) argues for an early event favorizing the clonal expansion of abnormal cells towards cancer [50].

An interesting example illustrating that a disturbed expression of connexins might be a prerequisite for human cell expansion could be kidney. Indeed, hemodialysis patients with end-stage renal disease have an increased incidence of renal cell carcinoma compared to the general population. Hypermethylation of CpG islands of the Cx32 gene has been observed in both cancerous and non-cancerous regions of the kidney from such patients. Since hypermethylation of the Cx32 gene occurred only in cancers lesions from patients of the general population, the consequent lack of expression of Cx32 would be related, or even a prerequisite, to the early stage of renal carcinogenesis [51]. However, if the decreased expression of connexins or the lack of gap junctions at early stages (adenomas or even dysplastic region of precancerous lesions) has been observed in a wide range of tissues, it cannot be a "general law". As it is often the case, the situation is more complicated and depends on the tissue which is considered.

For instance, in the larynx, no obvious difference of connexin expression has been reported; Cx26 (in parabasal and intermediate layers), Cx30 and Cx43 (in basal, parabasal and lower layers) have a similar level of expression in normal tissue and in precancerous lesions [30]. On the contrary, an hyperexpression is even observed in some dysplastic lesions of the larynx [30]. The aberrant expression was observed in later stages (squamous cell carcinomas) and characterized by a heterogenous staining for these connexins (regions with intensive expression alternated with region of no expression). In prostate, the decrease of Cx43 is more obvious in the late stages but not in the benign stages [41]. This would mean that the decreased Cx43 expression is not involved in the initiation of prostate cancer [41]. This hypothesis is reinforced by the fact that there is a marked increase in incidence and intensity of Cx43 immunostaining in benign prostatic hyperplasia [43,44]. A similar observation was made about Cx43 in human gliomas: three different studies reported so far a diminished expression of Cx43 which correlates with the progression of the tumors [21 - 23]

2.2. Liver cancer as a model of connexin-related cancer progression

Liver cancer is an interesting model for studying the possible involvement of connexins in cancer. Indeed, wellestablished protocols of chemically-induced liver cancer in rodents have been known for long and provided a cancerprogression model exhibiting well-defined stages. Since liver was known to be a well-coupled tissue, expressing at least two major connexins (Cx26 and Cx32), it has been extensively used to reveal any putative correlation between connexin disturbance and fundamental steps of liver carcinogenesis. Moreover, since liver tissue is pretty homogenous and soft, it became possible to perform ex vivo dye-transfer assays [52]. Such a functional approach permitted to have a rather complete set of tools not only for studying the function (ex vivo microinjection of fluorescent tracers) but also the fluctuation of expression at the mRNA and protein levels (Northern and Western analysis) and the localization (immunohistochemistry) of connexins during each of the welldefined stages of chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. Finally, it was possible to use the same tools for human liver tumors in order to see if any disturbance of GJIC could be a general phenomenon independently of the considered species.

2.2.1. Human liver cancer

First, if we consider human liver cancer, connexin expression might be thought to not be a good marker of cancer progression since the decreased GJIC capacity which is in adenomas as strong as in carcinomas is not accompanied by a decreased expression of the connexins [31,33]. However, it is different if we consider the localization of Cx32; in adenomas it is detected in parts of the plasma membrane in contact with neighboring cells contrary to hepatocellular carcinomas in which Cx32 is mostly localized in the cytoplasm [31]. In addition to this aberrant expression and/or localization of the original connexins, another disturbance concerns the newly synthesized cytoplasmic and non-phosphorylated form of Cx43 in the invasive parts of human liver. The newly expression of Cx43 in hepatocellular carcinomas can be the sign of a "dedifferentiation process". On the other hand, it can be also due to the presence of liver stem cells (oval cells) which are known to express Cx43 [18,53]. However, a study evoked the presence of both Cx32 and Cx43 in the cytoplasm and in the plasma membrane of normal human liver [54]. Despite this fundamental difference with other studies showing no detection of Cx43 in normal human liver, both connexins were found to be markedly decreased by these authors in the hepatocellular carcinomas at a post-translational level [54].

2.2.2. Rat liver cancer

2.2.2.1. Early stages of rat liver cancer. The picture is clearer for rat liver carcinogenesis. An early and progressive decreased expression of connexins is clearly observed in chemicallyinduced liver tumors. In rats, Cx32 mRNA is decreased in hyperplastic nodules induced by N,N-diethylnitrosamine (DEN) or N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) treatments. It is barely detectable in further stages such as hepatocellular carcinomas [55]. When the function of gap junctions was tested by microinjecting fluorescent tracers such as Lucifer yellow, it was clear that the loss of Cx32 mRNA is accompanied by the decrease of GJIC. In such an experimental model, the decrease of GJIC appears to be an early event which is already obvious 4 weeks only after the beginning of the chemical treatment before the apparition of the focal lesions. Interestingly, the decreased GJIC capacity appeared before the decrease of the number of Cx32 spots as detected by immunohistochemistry meaning that a conformational change of Cx32 connexons could have been induced via phosphorylation by the treatment [52]. Most enzyme-altered (glutathione S-transferase placental form positive: GST-P positive) focal lesions showed lower GJIC and lower Cx32 spots than surrounding hepatocytes leading probably to a lack of heterologous communication which could emphasize the clonal expansion of such lesions.

An interesting observation is that if Cx32 mRNA is decreased in cells of the primary tumors induced chemically, the immunocytochemical analysis revealed a decrease in gap junctions in some but not all preneoplastic focal lesions [56]. Others described similar facts: only a small part (17%) of the GST-P positive foci were found to have a marked reduction of Cx32 gap junctions in rats; this decrease being more important in hyperplastic nodules [57]. Not such a relation was found for Cx26 which seems to be differently regulated at least in the first step of liver carcinogenesis. It is more expressed in some of the GST-P positive foci (44%) and in a small part of the hyperplastic nodules (16%) [57]. Similarly, most preneoplasticaltered foci generated by DEN initiation and phenobarbital or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) promotion exhibited a decreased Cx32 or an increased Cx26 staining; Cx43 being not detected [58]. Interestingly, the hyperexpression of Cx26 might be related to cell proliferation since Cx26 is enhanced in hepatocytes before the onset of S-phase after

partial hepatectomy in rats [59]. Therefore, the Cx32 decrease is an early event in induced rat liver carcinogenesis; this conclusion is reinforced by the fact that the quantity of Cx32 spots is decreased after partial hepatectomy, a promotion stage of rat liver carcinogenesis. This decrease is probably due to a lower amount of Cx32 mRNA [59].

This observation may tend to indicate that the focal lesions exhibiting a low level of gap junctions are the precursors of the primary tumors; these primary tumors keeping a low level of gap junctions. If this scenario is true, it means that in the rat liver, the loss of gap junctions is a prerequisite for the further development of primary tumors. Such a picture might be a correct one since Cx32-knock out mice do present a higher level of both spontaneous and chemically-induced liver tumors [60]. Similarly, the highest sensitivity of female rats than males to hexachlorobenzene is related to a lower amount of Cx32 mRNA (8 fold lower in females than in males) [61].

2.2.2.2. Late stages of rat liver cancer. A progressive decrease of Cx32 expression is often observed from early preneoplasia (enzyme-altered foci) to hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma (no Cx32 is even detected in pulmonary metastatic hepatocellular carcinomas). Since there is an inverse correlation with an increase BrdU index, the observed decrease appears linked to the cell proliferation and progression of hepatocarcinogenesis [62]. The fact that the number of Cx32 positive spots per mm² is significantly less in hepatocellular carcinoma than in surrounding non-carcinomatous cirrhotic tissues [63] may suggest that the Cx32 loss provides a cellular independence and a growth advantage to tumor cells [62].

The deficiency of normal punctuate Cx32 staining may not be related to a loss of Cx32 mRNA but rather to an altered localization of the protein in some tumors [58]. In this last case, Cx32 exhibited some altered electrophoretic mobility suggesting that post-translational modifications are responsible for the altered localization. In some tumors, Cx32 mRNA was detected without corresponding Cx32 immunoreactivity, indicating that some hepatomas downregulate Cx32 independently of mRNA abundance [58]. This tends to show that several pathways may lead to a decreased level of GJIC which seems to be the common, final and crucial event, tightly controlled by the level of Cx32 mRNA expression, the post-transcriptional expression of Cx32, the localization of this connexin and possibly its phosphorylation state. These different levels of alteration of the Cx32 might be related to the rat strains or the treatments

However, if Cx32 expression and/or function are highly related to the progression of rat hepatocarcinogenesis, we do not know how Cx32 does control cell proliferation. Cx32-KO mice exhibit a higher rate of liver tumors than wild-type mice [60]. Apparently, in these Cx32-KO mice, the amount of Cx26 is also decreased in the hepatocytes [60] up to a level which is probably not sufficient for suppressing the tumor growth. Recent observations have shown that Cx32 expression is needed for the initiation of synchronous DNA synthesis in hepatocyte nuclei after partial hepatectomy [64]. Since cAMP- signaling pathway have been shown to be involved in liver regeneration in partially-hepatectomized rats [65], this synchronous activation of quiescent hepatocytes could be achieved by equilibrating second messengers (cAMP or IP3) among cells. Interestingly, CREM-deficient mice exhibit a significant reduced cell proliferation during liver regeneration [66].

Despite the fact that Cx26 is also decreased in hepatocellular carcinomas [57], it seems reasonable to postulate that Cx32 and Cx26 are differentially regulated during the progression of rat liver carcinogenesis. First, the amount of Cx32 is apparently decreased earlier than Cx26. Second, the onset of tumorigenesis is related to both a decrease of Cx32 expression and/or cell communication function and an increase of Cx26 expression (possibly at the S-phase of the cell cycle). Since the Cx26 overexpression does not seem to counteract on the communication capacity, we may postulate that the two connexins have different roles concerning their involvement in the regulation of communication in liver; Cx32 loss is clearly related to GJIC loss, independently of Cx26 expression.

2.3. Skin cancer

In skin, most extensive studies on connexin expression have been performed on the mouse model. These studies were mostly focused on the behaviour of Cx26 and Cx43 which have been thought for long time to be the major connexins of the skin tissue. Now, we know that the expression pattern of the connexins in skin is very complicated and concern other types of connexins which have been identified in more recent years. For these reasons, the "picture" of connexin expression related to skin carcinogenesis is not complete and still need further studies both in animal models and in human tissues.

2.3.1. Studies on murine and human skin tumors

In mouse skin, the pattern of expression of Cx26 and Cx43 is clearly segregated: Cx43 is predominantly expressed in the less differentiated lower spinous layers of the normal skin whereas Cx26 is more present in the terminally differentiating upper spinous and granular layers [67]. The particular pattern of expression of Cx26 and Cx43 does not seem to be altered in the hyperplastic epidermis. It starts to be modified from the papillomas stages and follows two fundamental steps: (1) a loss of segregation in papillomas (both Cx26 and Cx43 are localized in the lower spinous layers); (2) a loss of detection in the squamous cell carcinomas [67]. The decrease of Cx26 and Cx43 expressions is apparently related to the progression stages of the tumors from papillomas to well-, moderately- and poorlydifferentiated squamous cell carcinomas of the skin induced chemically [68]. If a loss of segregation of expression is commonly observed for Cx26 and Cx43 in papillomas [67,68], some found an overexpression at this stage [69]. However, in late papillomas, a local loss of Cx26 immunostaining can be observed [69]. Then, the decrease of both connexins seems to be the consequence of a post-translational phenomenon since mRNA is still present [69]. Very few is known about the other connexins which are also present in the skin: a strong inhibition of Cx31.1 during all stages has been reported [69] but more

studies are needed to complete the "connexin scenario" during chemically-induced skin carcinogenesis in mice.

Moreover, we have to consider that the rare studies on connexin expression which have been performed on human biopsies did not report a so clear picture. Apparently, Cx43 is poorly present in squamous cell carcinomas [48]. This is also the case in the basal cell carcinomas contrary to Cx26 which was even found to be more expressed in the human basal cell carcinomas than in the normal epidermis [32,48].

2.3.2. Studies on in vitro models of skin cancer

Cell lines and primary cultures from different stages of mouse skin carcinogenesis have been used to estimate whether the GJIC capacity is related to the progressive stages of cancer progression. In general, it has been reported a good correlation between the decrease of GJIC capacity (often tested by Lucifer yellow microinjection) and the progression of skin cancer [70,71].

However, such in vitro approaches have to be considered carefully since the establishment of cell lines may denaturate the original properties of the tumor cells. This may explain why no significant difference of GJIC was found sometimes between cell lines from normal keratinocytes, papillomas or squamous carcinomas [72]. Actually, for this last report, a marked decrease (80–90%) in GJIC was found on progression from squamous to spindle carcinoma cells. E-cadherin seems to be involved in the regulation of GJIC in such cells by permitting or not, depending on their level of expression, the correct addressing of the connexins towards the cell membrane [72,73].

2.4. Bladder cancer

2.4.1. Studies on human material

As for the two previous kinds of cancer (liver and skin), two connexins have to be considered: Cx26 and Cx43. Contrary to these two previous examples, the correlation between the connexin behaviour and the progression stage of the bladder cancer is not so clear and looks confusing depending on the models used. By considering human cancer cells lines, a loss of Cx26 expression has been associated with the malignant phenotype contrary to Cx43 whose variable expression in cancer cell lines is not related to the GJIC capacity [19]. The expression of Cx26 is decreased but heterogeneously in situ without any clear difference between non-invasive and invasive cancers [20]. However, others have found that Cx43 expression and GJIC capacity of human uroepithelial cells are inhibited by the exposure to a tobacco-related nitrosamine [74]. Interestingly, the expression at the protein level of Cx43 is recovered within 24 h of removal of the carcinogen [74]. According to these results, Cx43 could play a major role at the very precancerous stages and Cx26 a more crucial role at the following steps of cancer progression but the data are too parcellar to make such a conclusion as a definitive one.

2.4.2. Studies on rat material

Bladder carcinoma cells from rats present contradictory results compared to the human model. In such cells, there is a clear tendency that all cell lines with a greater communication capacity (due to higher levels of Cx26 or Cx43 mRNAs) were the most tumorigenic. These results were similar to those obtained from in situ studies. In rat bladder, Cx43 is barely detectable and Cx26 is not. However, in rat bladder carcinomas, mostly in N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN)-induced carcinomas, abundant expression of the two types of connexins was observed. It was even concluded from these studies that increased GJIC capacity or increased connexin expression may give a growth advantage in rat bladder carcinogenesis [75].

2.5. Oesophageal cancer

If there are contradictory observations for a same kind of cancer, such as bladder cancer, depending on the considered species, there are also cases, such as oesophageal cancer, for which the same connexins (Cx26 and Cx43) expression and/or function do not exhibit any correlation with cancer progression. No drastic loss of connexin expression was found in squamous cell carcinomas of the human oesophagus [32]. Cx26 and Cx43 were still detected immunohistochemically but the only difference was on the heterogenous staining: some parts of the tumors exhibiting a normal staining and other parts without any staining. This heterogeneity was not modified according to the tumor phase since it was also found in metastasis. It has been suggested that such a heterogeneity of connexin expression could be the consequence of cancer stem cells present within the tumors with their partially-differentiated daughter cells [18].

However, this apparently lack of correlation between connexin expression and the progression stage of the tumor is related to what is observed in cell lines; in such cells the level of expression does not correlate perfectly with tumorigenicity [37]. Such a lack of correlation was also observed in rat cells; both non-tumorigenic and tumorigenic oesophageal cell lines exhibited high level of dye coupling and comparable levels of Cx43 expression [76].

2.6. Prostate cancer

The picture is clearer for human prostate cancer in which Cx32 and Cx43 expressions have been studied. The decrease of expression for both connexins is obvious in the carcinomas and even stronger in the poorly-differentiated tumors [44]. The study realized by Mehta was more precise since he reported, with his colleagues, a correct localization of the two connexins in well-differentiated tumors and a more cytoplasmic localization in the undifferentiated ones with an eventual loss of expression in advanced stages [42]. If this is true, it would mean that these connexins do not play a role at the beginning of the progression of prostate cancer. Interestingly, more doubt concerns the expression of the connexin in the normal tissue. Some only found Cx32 detectable [42] when others found a segregated expression of Cx32 (in luminal cells) and Cx43 (in basal cells) [44]. In the first case, Cx32 was detected in the tumors, meaning that its expression (like Cx43 for liver cancer) would be associated with the dedifferentiation of the tissue. More studies are necessary in order to have a better picture of the connexin expression pattern in human prostate cancer.

2.7. Breast tumors

In human breast, the expression and localization of Cx26 and Cx43 have been studied. Interestingly, Cx26 was not detected in the normal tissue but looked upregulated and cytoplasmic in invasive lesions of breast carcinomas [24]. The pattern of expression was different for Cx43 with a heterogeneous expression at intercellular regions of the carcinoma cells in some of the tumors studied. Laird et al. only studied Cx43 which was not detected in lobular and ductal carcinomas whatever the grade tested [25]. The result was so clear that the authors concluded that Cx43 would be an interesting marker for early oncogenesis of the breast. Here, we have to emphasize the discrepancy of results which can be obtained depending on in situ or in vitro observations. Indeed, Cx26 was claimed to be a putative breast-tumor suppressor gene by using a cell model of human breast cancer [77]. Such a result is in contradiction with in situ observations [24].

2.8. Lung cancer

Decreased expression of Cx43 has been observed in various human and mouse lung carcinoma cell lines which exhibit lower dye-transfer capacity than non-transformed lung epithelial cells [34,78–80]. Similarly, lack of communication, as tested by electroporation of Lucifer yellow [81], is a common feature of human lung carcinoma cell lines or cells freshly explanted from human lung tumors [35]. However, positive controls for this study were fibroblasts (exhibiting GJIC) and not epithelial cells which would be a more appropriate control.

Lack or decreased expression of connexins is not always observed for lung cancer. In mouse, a study which compared by competitive cDNA library screening the gene expression in chemically-induced lung carcinomas and normal lungs did not report any change of connexin gene expression among the 22 clones which were found to be differentially expressed [82]. This is in agreement with another study performed with urethane-treated A/J mice. Primary cells obtained from hyperplasias, adenomas and carcinomas of these mice exhibited extensive dye-transfer even at late-stage carcinomas. The loss of GJIC was obtained after several months in culture, meaning that in vitro the propagation of tumor cells can lead to gap-junction closure [83]. These results suggest that the molecular changes that lead to the formation of the tumor in vivo are not sufficient to interrupt gap junctions. An alternative explanation to the loss of GJIC during the in vitro propagation would be the selection for a few non-communicating cells that were present in the original population. If this is true, we cannot exclude the hypothesis that such cells might be initiated and non-communicating stem cells as proposed by Trosko [18].

However, the decreased amount of Cx43 which was observed in the Cx43^{+/-} mice makes them more sensitive to lung cancer after urethane treatment [84]. This last result tends

to show that the decreased amount of Cx43 could be a prerequisite leading to a deregulated growth of lung cells.

2.9. Discussions about the models used

The in vitro and in vivo/in situ studies presented above show that certain types of connexins may be specifically altered in some cancers. For instance, the loss of Cx26 expression seems to be associated with the malignant phenotype of human bladder cancer cells [19]. The loss of Cx32-mediated GJIC (by loss of mRNA in rats or cytoplasmic localization in humans) is associated with hepatocarcinogenesis [31,55]. The loss of Cx43 could be a marker of human breast cancer [25]. These results, in which different connexins seem to be involved in cancer affecting different organs, tend to show up a specific link between the growth regulation of one type of tissue with one type of connexin.

However, we have to be careful about these general conclusions. All these studies which are presented above do not reveal a simple and general aberration of GJIC in cancer. The picture is more complicated and seems to depend on the type of cancer which is considered. Except the case of liver which presents a rather homogenous picture concerning the connexin disturbance, the involvement of connexins depends on the model used. For instance, some discrepancies can be observed between in situ/in vivo analysis and in vitro studies. We may then wonder whether in vitro models such as cell lines are good models or not for studying the involvement of connexins in carcinogenesis. In particular, it is important to consider if the loss of gap junctions which is observed in vitro is actually associated with a neoplastic process, rather than being artificially induced by extensive cell culture: as it is for primary cells cultured from urethane-induced lung tumors [83]. Even if these cells were isolated from late-stage carcinomas, they possess an extensive GJIC capacity immediately upon isolation. The following propagation of these tumor cells in culture could induce either additional alterations that can lead to gap-junction closure or preferential in vitro clonal expansion of non-communicating cells originally present [18,83].

Moreover, connexin expression may depend on the cell environment. This was the case for hepatoma cells which fail to express connexin mRNAs in culture and express Cx32 mRNA once transplanted in vivo. However, after transplantation, Cx32 interestingly keeps being down regulated at the post-transcriptional level (Cx32 immunostaining is observed in less than 5% of the neoplastic cells in vivo) [85]. A shift of connexin expression is also observed: these cells (9618A cells) express Cx43 mRNA in vitro but Cx32 mRNA in vivo. This is different with other cells (N1S1 cells) which express Cx43 mRNA whatever their environment [85]. A similar phenomenon has been observed for mouse skin carcinoma cell lines unable to express Cx26 in vitro. Those cells growing as tumors in nude mice start to express Cx26 protein [71].

In some cases, a good correlation between in vitro models and tissues can be found for different kinds of tumors such as human ovarian carcinomas or rat liver carcinomas. In the first case, a lack of Cx43 expression was observed both in carcinoma cell lines [38] and in surgery pieces [39]. In the second case, the lack of expression of Cx32 which is observed in hepatocellular carcinomas is well correlated with the lack of expression of this connexin in hepatoma cell lines [86]. A similar good correlation between in vitro and in vivo models exists for rat bladder cancer but it goes in the opposite way concerning GJIC and remains an exception among other types of cancer: the chemically-induced rat bladder carcinomas exhibit an abundant expression of Cx43 and Cx26 whereas those connexins are barely detectable in the normal bladder tissue. Similarly, most tumorigenic rat bladder carcinoma cell lines exhibit an extended GJIC capacity related to both Cx26 and Cx43 expression [75].

In other cases such as human breast cancer, the data concerning Cx26 seem contradictory depending on the in vitro and in situ models. Cx26 was found to be a tumor suppressor in human breast cancer cells whereas it is not always detectable in normal breast tissue and upregulated in invasive lesions of breast carcinomas [24]. We may then conclude as S. Jamieson: "upregulated Cx26 in carcinoma cells is not necessarily inconsistent with a tumor suppressor role for GJIC. However, the role of gap junctions in the formation and progression of solid human tumors is likely to be more complex than indicated from experimental systems" [24]. In vitro models such as cancer cell lines are artificial indeed, but they present the advantage to minimize the number of uncontrolled parameters and they can bring important answers concerning the possible involvement of connexins in cell growth control.

3. Aberrant gap junctional intercellular communication and cancer

Aberrant GJIC can be either found among cancer cells or between cancer and normal cells. The lack of GJIC among cancer cells seems to be the consequence of two major phenomenons: either a lack of expression or an aberrant localization of the connexin proteins. The lack of expression is often the consequence of a lack of transcription which may be due to hypermethylation of the connexin normally expressed. So far, there are very few examples suggesting that such a phenomenon does happen. The downregulation of Cx32 expression by hypermethylation of the CpG island of Cx32 gene has been observed in human renal cell carcinomas and in a human renal cell carcinoma cell line [51,87]. The treatment of Cx43-negative HeLa cells with 5-aza-2'-deoxycytidine resulted in expression of Cx43, suggesting a Cx43-gene silencing via DNA methylation [88]. However, this is not always the case [36] and we still do not know precisely how connexin transcription is down regulated in some cancer cells.

3.1. Cytoplasmic localization of connexins

Several studies have shown that the expression of connexins can occur in tumor cells but are abnormally localized and accumulate in the cytoplasm. Such observations have been made both in vitro and in vivo and did not depend apparently on the origin of the tumor.

3.1.1. Cytoplasmic localization of connexins in vivo

In skin, Cx43 was detected by gold particles in small gap junctions but scattered in the cytoplasm of human basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas [52]. This last observation was not made in normal skin. Similarly, Cx26 was found to be cytoplasmic in human invasive carcinomas of the breast in more than 50% of the cases [24]. This was also true for Cx26 in some human bladder tumors [20] and in Sertoli cells of testis infiltrated with carcinomas in situ [49]. In this last case, the situation is even more complex since in Sertoli cells the Cx26 expression was induced cytoplasmically when Cx43 expression was decreased. This was associated to a less differentiated stage of Sertoli cells as demonstrated by the re-expression of cytokeratin 18 [49]. The altered expression of Cx26 and Cx43 in Sertoli cells in testes infiltrated with carcinomas in situ or seminoma suggests that a derangement in intercellular communication between Sertoli cells (and between Sertoli cells and germ cells) may play a role in the resulting spermatogenic impairment and in the proliferation and progression of carcinomas in situ [49]. Cx32 which is normally expressed in hepatocytes was found to be localized in the cytoplasm of human liver tumors. Similar results were found in a human liver tumor cell line [89]. Cx43 which is not detected in normal hepatocytes was present in the invasive parts of the same tumors [31]. This means that the impaired trafficking does not depend on the type of connexin which is expressed in liver. It appears to be a general phenomenon affecting all connexins expressed in the same cells. The fact that a new connexin (Cx43) appears in the invasive parts of a tumor suggests that aberrant localization/expression of connexins may depend on the stage of the tumor. Indeed, this was shown in human prostate cancer. In this type of cancer, the connexins are localized at the cell-cell contact areas in normal and well-differentiated tumors (only Cx32 in the normal tissue and both Cx32 and Cx43 in the tumors). But progressively, the cytoplasmic localization of both connexins in the undifferentiated stages is noted [42]. In a transgenicmouse model developing testicular tumors confined to Leydig cells, the endosomal requestration of Cx43 is an early event associated in situ with uncontrolled Leydig cell proliferation before the onset of testicular tumor invasion [90]. The cytoplasmic localization of connexins has also been observed in chemically-induced tumors suggesting it could be a general phenomenon of carcinogenesis. As an example, we can cite the cytoplasmic localization of Cx32 and Cx26 in chemically-induced rat hepatomas [58].

It is also interesting to note that the cytoplasmic localization of connexins has been associated with invasive parts of carcinomas. This is the case for Cx26 and Cx43 in chemically-induced rat bladder cancers [75]. Another example is about the apparition of Cx43 in either rat and human liver carcinomas [31,57].

3.1.2. Cytoplasmic localization of connexins in vitro

In a seminoma cell line, Cx43 was present in the trans-Golgi network [91]. But in this last case, the induced overexpression of the Cx43 was followed by the correct targeting of the connexin to the membrane and by growth decrease. In other cases, the aberrant localization of the connexins seems to be the consequence of a wrong intrinsic mechanism of membrane targeting since no induced overexpression of these proteins can change this situation. This was observed in some human colon tumor cells which express Cx43 in their cytoplasm. The transfection of a Cx43 cDNA did not improve the membrane localization of the Cx43 which was accumulating in the cytoplasm without modifying the cell–cell communication capacity tested indirectly by the lack of bystander effect [92]. The intracellular accumulation of connexins was also observed in several prostate cancer cell lines suggesting that the impaired trafficking of the connexins could be the major cause of GJIC deficiency in human prostate cancer cells [93].

The cytoplasmic localization of connexins is not always associated with abnormal or pathological situations. For instance, a transient intracytoplasmic storage of Cx43 has been described in uterine myocytes before parturition [94]. Similarly, the cytoplasmic storage of connexins represents a normal physiological process during spermatogenesis [91]. Curiously, in this last system, the storage of the connexins is associated with the presence of a 70-kDa isoform of Cx43. It has been argued that the cytoplasmic storage of Cx43 in the germ cells would play a role in cell growth control: it could allow spermatogonial proliferation at the beginning of a new wave of spermatogenesis before the recruitment of Cx43 to the plasma membrane [95]. The relationship between the localization of Cx43 and growth control is confirmed by the fact that its relocalization in the membrane is associated both with the induction of GJIC and decreased cell growth in vitro [91]. The association between Cx43 localization in the membrane and growth regulation is even reinforced by the fact that lindane induces a delocalization of Cx43 from the membrane to the cytoplasm and consequently a loss of GJIC [96]. Such a phenomenon was first observed by treating rat liver epithelial cells with lindane [97]. Apparently, lindane induces Cx43 phosphorylation and cytoplasmic localization in endosomes by activation of ERK/mitogen-activated protein kinase pathway [98].

It is interesting to note that even a nuclear localization of connexins has been reported. This is the case for Cx43 in rat liver epithelial cells transformed by either src or neu oncogenes [99]. Such a phenomenon seems to depend on the types of oncogenes which are activated since it is not observed when those cells are transformed by ras associated or not with an activated myc oncogene even if GJIC and phosphorylation of Cx43 are both decreased in all cases [99]. More recently, it was shown that the inhibition of growth of HeLa cells was induced by the carboxy-terminal part of Cx43 which was localized in the nucleus of the cells [100]. The reason for such a localization in the nucleus is not known. This may suggest that Cx43 could be involved in the control of transcription but this has not been proved yet [99]. However, without going so far, it tends to demonstrate that the formation of channels may not be always required for growth inhibition [100].

3.1.3. Mechanisms leading to the aberrant localization of connexins

The mechanisms leading to the aberrant localization of the connexins in the cytoplasm are not known. It was suggested that it is due to a cell-cell recognition impairment. Carcinomas often exhibit a decreased expression and/or aberrant localization of E-cadherin, a major transmembrane protein involved in the cell-cell recognition process of epithelial cells. Several studies have shown that the forced expression of E-cadherin in cell lines induces a more epithelial phenotype to the cells which may be accompanied by gap-junction restoration [101]. E-cadherin seems to permit a correct addressing of connexins to the cell membrane [73]. It has even been argued that such a process is the consequence of a hyperphosphorylation of the Cx43 mediated by the cadherin expression [102]. More recent data reinforce the idea of a possible involvement of cell-cell recognition in connexin localization: for instance, the induction of alphacatenin favorizes the membrane relocalization of the connexins in human prostate cancer cell lines [93]. Such data emphasize the fact that the disturbance of GJIC would be the consequence of an aberrant cell-cell recognition process.

However, other examples do not go in such a direction. For instance, it was suggested that the cytoplasmic localization of Cx32 in human liver carcinomas could be due to a lack/ decreased expression of E-cadherin but this protein is expressed in carcinomatous cells as in non-carcinomatous cells suggesting that connexin localization can be controlled by other processes [63].

3.2. Lack of heterologous gap-junctional intercellular communication

Several coculture experiments indicate that cancer or transformed cell lines had little or no GJIC capacity with their non-transformed counterparts. This was observed in different cell systems as BALB/c 3T3 cells [103], human lung carcinoma cells [34], mouse skin cells [70] and rat oesophageal cells [76]. Such an observation was even made if the tumorigenic cells do exhibit extensive intrinsic GJIC [76]. Similar results were also obtained on transformed foci which were raised from a normal cell population by oncogene transfection or chemical treatment [104]. This last approach may seem less artificial than mixing cancer cells and normal cells in the same dishes.

More convincingly, such results that could have been estimated as an in vitro artefact were also observed by using in vivo models. For instance, a selective lack of heterologous GJIC has been observed between neoplastic and surrounding normal cells by microinjecting fluorescent dye in fresh pieces of rat and human liver tissue [31,52]. It has to be noted that in both cases (rat and human), the dye-transfer assay revealed a strong reduction of the GJIC capacity compared with nontumoral surrounding liver tissue. The lack of heterologous GJIC occurs in most of GST-P positive foci in rats [52] and is related to a decreased homologous GJIC capacity in those foci. Similarly, all human liver tumors tested by dye-transfer assay revealed a strong reduction in GJIC compared with non-tumor surrounding liver tissue [31]. In this last case, the heterologous lack of GJIC was probably due to the presence of a connective capsule around the tumors [31].

Lower GJIC capacity in adjacent tissues surrounding the tumor may be also another cause of the lack of GJIC between the cells of the tumor and their non-tumoral conterparts [31]. Such a reduction of connexin expression in the adjacent nonneoplastic tissues has also been observed in skin tumors [67].

Actually, we do not know whether such a lack of GJIC between normal and tumor cells is a common feature in human cancer. This lack of knowledge is due to the lack of sophisticated in situ approach that would permit to estimate whether GJIC does occur or not between cancer cells and normal cells in biopsies. Moreover, even if techniques would be suitable for such estimations, the lack of a clear frontline between the tumor and the normal surrounding tissues would prevent to make it. Therefore, it is impossible to estimate whether the lack of communication between tumor and nontumor cells play a role in carcinogenesis by using in situ approaches.

We can simply hypothesize that it may play a role in growth control of cancer cells by referring to in vitro experiments in which re-induction of GJIC between the two cell types was able to prevent the growth of transformed cells [105]. This hypothesis is even reinforced by the fact that the growth inhibition of transformed cells correlates with their capacity to communicate with normal cells [106]. Such observations made GJIC suspected to be actively involved in growth control [106,107]. However, the situation is more complicated than it appears because GJIC is not obligatory required for promoting an heterologous growth control. Indeed, some studies have shown that non-transformed cells may completely suppress the growth of neighboring transformed cells without requiring gap junctions [108]. Therefore, at least in some cases, it seems that a direct intercellular contact is required for growth control even if it is not accompanied by the establishment of GJIC. We may then argue that molecules involved in direct cell-cell interaction may have such a role as they have for maintaining some cell differentiation [109].

3.3. Connexin mutation and cancer

Two different sorts of observations argued for possible mutations of connexin genes in cancer. First, the aberrant localization of connexins in cancer cells could have been the consequence of specific mutations since in vitro experiments have shown that mutations affecting connexins (which are associated with human genetic diseases) could accumulate into the cytoplasm. Secondly, several experiments have shown that connexins act as tumor suppressors which are classically mutated in cancers [6]. Consequently, the research of mutations has been performed in several types of connexins.

3.3.1. Cx37

Several studies on Cx37 mutations have been initiated from a report mentioning that mutated Cx37 is at the origin of shared

136

tumor-associated antigenic octa-peptides (MUT1 and MUT2) of mouse Lewis lung carcinoma cell lines (3LL and CMT cell lines) [110]. However, despite this previous result, DNA from 3LL and CMT cells did not exhibit any Cx37 mutation [111]. Since Cx37 is mostly expressed in endothelial cells, endothelial-derived tumors have been studied in order to see whether Cx37 mutations were involved in their genesis. Indeed, Cx37 mutations were detected in hepatic angiosarcomas (2 samples out of 22) from rats treated by vinylchloride. Base substitutions were detected at codon 166 (CGA to CGC) and codon 168 (GGG to GAG) in very few tumors (3/22 samples). The first mutation (3/22 samples) was silent (arginin) and the second was changing a glycine into a glutaminic acid. Cx37 proteins were detectable in endothelial cells of normal liver by immunohistochemical analysis, but none of these induced angiosarcomas showed Cx37-positive spots. These results suggest that Cx37mediated GJIC may be disturbed in most of these angiosarcomas. However, this mutation is probably not crucial for angiosarcoma development since it was found in only one out 22 samples [112]. In addition, a silent polymorphism was detected at codon 88 [112]. In human, mutations affecting the Cx37 (proline-serine change at codon 319) were found in hemangiosarcomas. Actually, this was a polymorphism of the gene since the mutation was also found in the normal tissue of the same patients. In 84 normal donors, this polymorphism exhibited different ratios (Pro/Pro: 65.5%; Pro/Ser: 23.8%; Ser/ ser: 10.7%) and, even if it does not seem to be correlated to angiosarcomas, the authors were questioning whether Ser319 predisposes to this type of cancer [113]. Another polymorphism could affect the Cx37 gene at codon 130 converting valine into isoleucine. This was found in patients suffering of breast cancer (3 tumors out of 18) and lung cancer (2 tumors out of 8) but also in the normal tissue of the same patients [114].

3.3.2. Cx32

The aberrant cytoplasmic localization of Cx32 in human hepatocellular carcinomas is not associated with any mutation in the coding region of the Cx32 gene [31]. Similar lack of mutation in Cx32 has been reported in human stomach tumors and human colon sporadic adenocarcinomas even if no study was performed about the Cx32 expression/localization in those samples [115,116]. In rats, only one chemically-induced hepatocellular carcinoma out of 12 exhibited a mutation affecting codon 220 of Cx32 [117]. This last mutation (His to Arg) was functionally silent, as tested by dye-transfer assay in HeLa cells, and responded normally to various stimuli (cAMP, 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate, lysophosphatidic acid) [117].

3.3.3. Cx43

More convincing data about a possible correlation between connexin mutations and cancer concerned Cx43. Cx43 is specifically mutated (but not Cx32) in human colon sporadic adenocarcinomas [116]. All these mutations were associated to advanced stages of progression of the tumors; they were located in the carboxy-terminal part of Cx43 and led to a shift of the reading frame of the gene. Interestingly, the expression of the mutated Cx43 was restricted to the invasive structures of the tumors. It is not known yet what could be the functional consequences of such mutations on the Cx43 function and if there are really associated with the invasive phenotype of the tumors (see the part 4 of this review). This mutational phenomenon is not a general one affecting Cx43 since the lack of detectable transcripts in ovarian carcinoma cells was not the consequence of deletions or rearrangement in the Cx43 gene [38]. Similar conclusion was made for murine and human lung carcinoma cell lines exhibiting limited ability for dye-transfer and Cx43 expression [34]. No mutation of Cx43 gene was found in mouse skin tumors induced chemically [118].

3.3.4. Cx31.1

In head and neck squamous cell carcinomas a 10-fold downregulation of Cx31.1 as well as mutations in the TGFbeta-receptor-II were reported [119]. Therefore, the research of mutations affecting the Cx31.1 gene has been performed without any success meaning that no Cx31.1 mutation is involved in laryngeal tumorigenesis [119]. Only a silent polymorphism has been observed in some tumors [119].

3.3.5. Other aspects and conclusions about connexin gene mutation and cancer

Another aspect to consider is that the lack of connexin expression in cancer cells could be the consequence of mutations affecting non-coding portions of the connexin genes. Such portions are known to play a crucial role in the regulation of expression of the connexins. This is not only the case for the promoter region of the gene but also for the newly discovered IRES (Internal Ribosomal Entry Site) elements of major connexin genes such as Cx26, Cx32 and Cx43 [120-122]. Indeed, the involvement of such regions has been observed for some human genetic pathologies which are associated with altered connexin function. Most examples come from the Xlinked Charcot-Marie-Tooth (CMTX) disease known to be associated with Cx32 defects [123]. If most mutations of the CMTX disease are located in the coding regions of the Cx32 gene, some were also found in the nerve-specific Cx32 promoter or in the 5'-untranslated region of the Cx32 mRNA [121,124,125]. Interestingly, the defective function or expression of Cx32 in such patients has not been shown yet to be related to a higher risk of tumorigenesis in the tissues where this connexin is normally expressed even for patients exhibiting no Cx32-coding region [126].

Previous studies on tumor-suppressor or cancer-associated genes have shown that tumorigenesis follows a two-hit mechanism that involves both gene mutations and loss of the second allele. In principle, tumor-suppressor genes include two classes: class I, in which loss of function results from mutation or deletion of DNA and class II, in which loss of function is from a block of expression. If connexins are putative tumor suppressors, they would belong to the class II which is assumed to be regulated by a different suppressor gene that lost its function by mutation or deletion [77]. This last case can be related to the altered expression of connexin-controlling transcription factors such as the hepatocyte nuclear factor $l\alpha$ (HNF-1 α) that positively regulates Cx32 [127] and is often downregulated in liver tumors [128–130].

However, the reality seems to be more complex. Indeed, when only one allele of a connexin gene is mutated, it may happen that the non-functional form of the connexin encoded by the mutated allele does prevent the function of the normal one. This dominant-negative effect has been indeed observed through in vitro approaches for some connexin mutations detected in human pathologies [131]. Recent data tend to show that such dominant mutations affecting Cx26 and involved in the keratitis–ichthyosis–deafness (KID) syndrome could increase the risk of epidermal carcinogenesis [132]. This last example suggests that connexins could be also a particular class I suppressor gene for which the loss of function may result from the mutation of only one allele of the gene.

4. Connexins and metastasis

Metastasis is a complex phenomenon where cell dissociation is followed by tissue invasion, transport of metastatic cells through the blood stream, extravasation and formation of secondary tumors by colonization of foreign organs. At least in two crucial steps of this dramatic succession of events, cellular interactions are heavily involved: (1) cell dissociation leading to invasion and (2) recognition between tumor cells and endothelial cells leading to diapedesis and the formation of secondary tumors. It is probable that in these two events, gap junctions in combination with cell adhesion molecules can affect the metastatic potential. This has been hypothesized for long time but a clear picture has not yet emerged [133,134]. In this part of this review, we will consider the succession of these events only from the point of view of gap junctions.

4.1. Cell dissociation and invasion

The common hypothesis about a possible involvement of connexins in metastasis directly comes from the reduced number of gap junctions which is observed during tumor progression. There are evidences suggesting that the loss of GJIC correlates with the metastatic potential. Even if this is not always true, several models do exhibit such a correlation. This was shown in rat mammary adenocarcinoma cells [135]. The observed decrease of GJIC might be correlated to a decreased expression of the connexins. For instance, mice treated with dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) exhibit a clear reduction of Cx26 and Cx43 in the invasive sites of the induced squamous cell carcinomas [68]. Similarly, Cx43 mRNA was not detected in a highly metastatic human lung carcinoma cell line [136]. A similar observation was made in breast cancer where a correlation was found between metastatic potential and the decrease of Cx43 gene expression [137]. Restoration of GJIC has been observed in a metastatic human breast carcinoma cell line transfected with the breast metastasis suppressor 1 (BRMS1) cDNA. It increases Cx43 expression and reduces Cx32 expression, resulting in a gap-junction phenotype more similar to the normal breast tissue [137].

However, the common assumption that connexin expression is inversely correlated to metastatic potential is probably too simple. Indeed, Cx26 was found to be still expressed and even upregulated in invasive human breast carcinomas (15 samples out of 27) but the cytoplasmic localization and its heterogeneity is not compatible with an efficient establishment of GJIC [24]. The wrong localization of connexins could be the consequence of the cytoplasmic localization (or lack of expression) of cell adhesion molecules, such as E-cadherin, which is frequently observed in carcinomas. This phenomenon which is thought to be a prerequisite for cell invasion probably interferes with the gap-junction formation. This can be assumed by the accumulated evidences in the past showing that E-cadherin expression favorizes the establishment of GJIC [73,101]. It is then easy to consider that the lack of cell recognition in the primary tumor prevents the establishment of GJIC and may facilitate the invasion process.

Another aspect to consider is the cell-substrate connections. In parallel with E-cadherin lack of function, detachment from the basal membrane is often observed as a prerequisite to cell invasion. Some data suggest that these types of interactions, such as $\alpha 3\beta 1$ -laminin 5 interaction, could be important for maintaining GJIC by regulating the intracellular protein trafficking involved in assembly of gap junctions. This process would involve a Rho-mediated signaling [138]. According to these results, the lack of such interactions could prevent the renewal of gap-junction plaques between cells. Even if it is not well documented yet, another reason for the loss of GJIC and wrong localization of connexins could be mutations affecting connexin genes (see part 3.3 of this review). Mutations of connexins have been indeed observed in invasive portions of some tumors. This is the case for Cx43 which is mutated in invasive regions of colon adenocarcinomas [116].

Whatever the molecular events responsible for GJIC decrease are, the subsequent loss of cooperation between neighboring cells is believed to lead to cell heterogeneity and cell dissociation in the invasive parts of the primary tumor [139]. Does it mean that the invasive phenotype of tumor cells is not compatible with GJIC? Probably not since gap-junctionally coupled tumor cells can invade embryonic chicken heart fragments (ECHF), whereas non-coupled tumor cells, like HeLa cells, did not [140]. Moreover, invasion of ECHF is made possible when HeLa cells were rendered communicating after transfection of connexin cDNAs. This phenomenon seems to be independent of the establishment of heterotypic GJIC between transfected HeLa cells and chicken heart cells. If the transfected connexins (Cx31, Cx40 and Cx43) did not modify the replication rate of the HeLa cells, they were differently invasive; Cx43-expressing cells being the most invasive ones in this experimental model [141]. These in vitro data support some in vivo data in which the abnormally-augmented expression of Cx26 is responsible for the enhanced spontaneous metastasis of mouse BL6 melanoma cells. This phenotype seems to be specific to the Cx26 function since the exogenous expression of a dominant-negative form of Cx26 or the chemical inhibition of Cx26-mediated GJIC (by a oleamide derivative) prevents the spontaneous metastasis of the BL6 cells [142].

4.2. Extravasation and formation of secondary tumors

Extravasation of malignant cells often involves transendothelial migration (diapedesis) into tissues prior to forming secondary tumors. In contrast to diapedesis of leukocytes during inflammatory responses, little is known about the molecular mechanisms that regulate tumor-cell diapedesis.

A possible explanation could be the establishment of heterocellular GJIC between tumor cells and endothelial cells. Such a phenomenon which has been observed for breast tumor cells and endothelial cells may be an important regulatory step during metastasis [143]. This was also observed in mouse melanoma cells expressing Cx26. Increasing the Cx26 expression by transfection or inhibiting its function by a dominant-negative variant resulted as a good correlation between GJIC and metastatic capacities of the melanoma cells [144]. This observation correlates with the level of Cx26 expression which is upregulated in melanoma cells invading the dermis compared with the melanoma cells residing in the basal layer, in human samples [144]. It was concluded that Cx26 plays a role in intravasation and extravasation of tumor cells through heterologous gap junction formation with endothelial cells [144].

As a parenthesis, we see here a contradictory observation. We have seen in the previous paragraph that the decrease of GJIC could play a role in cell dissociation and invasion. Here, upregulation of Cx26 is observed in invasive parts of the human melanoma. This apparent contradiction means that the cellular event we are reviewing may be different depending on the connexin which is expressed or the cell type and the tumor type which are considered. At least, the connexin type may be important to consider since upregulation of Cx26 was observed in invasive parts of both breast cancer and melanoma in human samples [24,144]. Without going further in speculation, it is interesting to note that Cx26 upregulation is observed in some cases where cells proliferate (psoriasis, etc.).

If the establishment of gap junctions is involved in the extravasation process, it is probably just a part of a more complex phenomenon in which paracrine communication, endothelial cell adhesion and gap junctions are all involved. At least a clear interdependence has been observed between endothelial cell adhesion and communication of lung-metastatic cancer cells. It was shown that the level of coupling at focal adhesion contacts depends on sufficient amounts of Cx43 by both cell partners and, in a rate-limiting fashion, on the expression level of the receptor/ligand pair that mediates adhesion between tumor cells and the endothelium. Significantly increased adhesion and communication levels in highly lung-metastatic carcinoma cells imply a role of gap-junctional coupling in cancer metastasis, presumably by facilitating extravasation [145].

An interesting scenario describing possible molecular mechanisms involved in this complex process came from studies on HTLV-1, the human T-cell lymphotropic virus type 1, which is the causative agent of adult T-cell leukaemia/ lymphoma (ATL). ATL-derived leukemic cells communicate with endothelial cells through both angiogenic-factor mediated paracrine stimulation and direct gap-junction-mediated heterocellular communication [146]. The HTLV-1 transactivator Tax seems to play an important role in this interaction by inducing the transcriptional activation of VEGF promoter and Cx43 promoter and by increasing the heterotypic communication [147]. This dual interaction between ATL-derived cells and endothelial cells induces the production of matrix metalloproteinases by endothelial cells which leads to the degradation of subendothelial basement membrane and retraction of endothelial cells, allowing then the extravasation of ATL-derived cells [147].

Local disturbance of the gap-junction pattern among endothelial cells may be also involved. For instance, it was shown that coculturing human breast cancer cells with endothelial cells leads to a rapid and transient inhibition of GJIC between the endothelial cells. Such a phenomenon is probably the consequence of interactions between the two cell types which leads to the tyrosine phosphorylation and functional inhibition of the endothelial Cx43 [148]. This local disturbance of GJIC among endothelial cells may be important since, in a model using human oral squamous cell carcinoma cells and rat lung endothelial cells, the development of cell-tocell interactions, e.g., gap junctions and tight junctions in endothelial cells, by chemical treatment (malotilate) results in the inhibition of invasion by the tumor cells [149].

Local disturbance of GJIC between endothelial cells may be the consequence of paracrine factors produced by the tumor cells. Such a phenomenon happens during tumor-stroma interaction of skin cells: the homologous GJIC of the stromal fibroblasts is inhibited by paracrine acting factors of epithelial tumor cells. In this model, the decrease of GJIC is due to a posttranslation modification of Cx43 but not to a change of expression of Cx43 [150]. This result correlates with the observation of aberrant Cx43 mRNA expression in adjacent normal lung tissue, around nodal micrometastasis of non-small cell lung cancers, which is a consequence of methylation of the Cx43 promoter [151].

Some work also suggested that gap junctions could elicit particular tissue targeting for the metastatic cells. It was said that preferential metastasis could be the consequence of the formation of heterotypic gap junctions between metastatic cells and cells of the target tissue. For instance, the formation of heterotypic gap junctions between a human breast carcinoma cell line and a human osteoblastic cell line was suggested to explain why a large extent of metastasis from breast cancers occurs in bone [152]. This was reinforced by the fact that heterotypic GJIC was even larger than homotypic GJIC between the carcinoma cells [152]. Moreover, contrary to the parental cells, transfection of a breast metastasis inhibitor, BRMS1, into the breast cancer cells increased homotypic GJIC but not heterotypic GJIC [152].

Finally, in order to close this part concerning connexins and metastasis, just a few words about the direct or undirect use of connexins as putative therapeutic tools against metastasis. It is interesting to mention that regression of established murine carcinoma metastases following vaccination was obtained with tumor-associated antigen peptides which were in fact derived from a mutated Cx37 gap-junction protein (see Section 3.3.1 of

this review) [153,154]. Moreover, the treatment of mice with a oleamide derivative able to inhibit specifically the Cx26-mediated GJIC in melanoma cells blocks partially the metastasis of these cells in mice [142].

5. Conclusions

A question which is often asked is whether the lack of connexin expression is a prerequiste for the loss of growth control. In other words, the different questions we may ask are: does the lack of expression of a specific connexin:

- induce a deregulated cell growth?
- modify the pattern of expression of genes involved in cell growth control?
- increase the susceptibility to cell transformation (at the cellular level) or carcinogenesis (at the organism scale)?

5.1. Connexin expression as a prerequisite for the loss of growth control

The recent use of transgenic animals such as connexin-KO mice did not permit in the last years to bring some clear answers to these specific questions. Indeed, if fibroblasts isolated from Cx43-null mice exhibited a higher growth rate [155], it was not the case for all cell types. For instance, primary cultures of astrocytes isolated from Cx43-null mice grow slower than their wild-type counterparts despite a lack of GJIC as tested by dye-transfer [156]. Moreover, if we presume that glial fibrillary acidic protein and S100 are good markers for estimating glial differentiation, the differentiation of the cells was not modified by the lack of the most abundant connexin of astrocytes [156]. This is in agreement with the fact that brains of Cx43-null mice are macroscopically normal and display a pattern of cortical lamination that is not detectably different from wildtype siblings [157]. It has been argued that this lack of macroscopically effect is due to the presence of a variety of other types of connexins (Cx26, Cx30, Cx40, Cx45, Cx46), detected by various techniques and at various times of culture, in those Cx43-null astrocytes [157]. Therefore, it was concluded that astrocyte gap junctions can be formed by various types of connexins and that the metabolic and ionic coupling provided by these diverse gap-junction types may functionally compensate for the absence of the major astrocyte gap-junction protein in Cx43-null mice [157]. This is actually contradictory with the fact that no dye transfer was observed in those Cx43-null astrocytes, contrary to their wild-type counterparts [156]. It is possible then that dye-transfer is not an appropriate approach to answer to this question, that more subtle GJIC mediated by compensating connexins is involved at different periods of the brain development. It is also possible that primary cultures may be an artefactual model depending on growth factors which are present in the medium.

Observing the cancer susceptibility of the whole organism lacking a specific connexin may be a better approach. A higher tumor rate has been indeed observed in such animals meaning that the lack of specific connexins may be a prerequisite for tumor formation. For instance, a higher incidence of liver neoplasms (spontaneously- or chemically-induced) was shown in mice lacking Cx32 which is the major connexin usually expressed in hepatocytes [60]. The intraperitoneal injections, two weeks after birth, of DEN led, after 1 year, both to more liver tumors in Cx32-deficient mice than in controls [60]. Since Cx32 has a stabilizing effect on Cx26, the lack of Cx32 is probably emphasized by the decrease of Cx26 in hepatocytes. Indeed, comparison of dye spreading in connexin-32-deficient versus wild-type liver revealed a 96% decrease in connexin-32deficient tissue which would not be reached without a significant decrease of Cx26 [158].

Similarly, the deletion of one allele of a connexin gene may be sufficient to induce a higher susceptibility to tumor formation: for instance, the deletion of one allele of the Cx43 gene (and subsequent decrease of Cx43 expression) clearly favors the carcinogenic effect of urethane administration and results in a higher susceptibility to lung adenoma formation in mice [84]. In vivo, the lower Cx32 mRNA amount in female rats may also explain their higher sensitivity to liver tumors induced by hexachlorobenzene [61]. This Cx32 transcription difference between females and males seems to be controlled by ovarian hormones since ovariectomy abolished any difference between them [61]. All these examples tend to show that a decreased level of expression of a connexin may be a prerequisite for tumor growth.

5.2. The effect of a lack of connexins on gene expression

Very few studies have been performed on this topic so far. By using high-density cDNA microarrays in Cx43-null astrocytes, the analysis of gene expression revealed 4,1% of the 4998 quantifiable spots having significantly decreased hybridization compared to controls and 9,4% of the spots showing significantly higher hybridization. These different spots corresponded to RNAs encoding 252 known proteins including transcription factors, channels and transporters, cell growth and death signals, enzymes and cell adhesion molecules. These data indicate a surprisingly high degree of impact of deletion of Cx43 on others astrocytes genes: gap junction gene expression alters numerous processes in addition to intercellular communication [159,160]. Such experiments are still preliminary and it is obvious they should be extended to other types of connexins. However, those preliminary results concerning Cx43 and murine astrocytes reinforce the idea that gap junctions are involved in the regulation of gene expressions which are crucial for the cell phenotype and in particular for the control of cell growth.

Contrary to classical tumor suppressor genes which are known to control very specific molecular mechanisms, it seems that connexins do control a large panel of processes which may lead to cancer if they are not functioning properly.

5.3. General conclusions

Through all the examples which are cited in this review, we may conclude that connexins do play probably a role in carcinogenesis. Extensive data, which have been accumulated during 40 years, suggest that it is the case. Depending on the models which have been used, it is obvious that defective gap junctions may tend to be either a prerequisite (as suggested by some studies performed on connexin-KO mice) or a consequence of the tumor development. In this last case, the decreased expression of connexins or their aberrant cellular localization can be related to some tumor progression stages. Nevertheless, whatever the deficient gap junctions are a prerequisite or a consequence of the tumor formation, they seem to give a strong impact on the development of solid tumors. As we have seen, they probably play also a crucial role in the late stages of cancer but at different levels; the invasion stage being mostly associated with a loss of function of the gap junctions, whereas a gain of function may characterize the metastasis stage.

Still, very few is known about the molecular mechanisms regulated by the gap junctions and which are responsible for growth control, invasion and metastasis. Understanding these molecular mechanisms may depend on the answer to the two fundamental and following questions:

Is such a regulation made through the establishment of GJIC? If yes, the understanding of the molecular mechanisms which are involved in growth control will depend on the identification of molecules passing through gap junctions. Such an identification is one of the biggest challenge for the researchers working in the domain of the gap junctions.

Is the cell growth regulated by connexins but independently of GJIC? If yes, what are the other functions of the connexins? Do they have these other functions through either specific interactions with particular proteins of the cytoplasm or specific localizations inside the cells? Do these other functions make them able to switch off or switch on signaling pathways involved in cell growth control?

The role of connexin is probably complex and still new theories emerge trying to bring some answers [18]. New insights concerning the direct control of gene expression by connexins are coming out, especially from connexin-transfected cells and more recently from connexin-KO mice. We may also expect interesting data coming from conditional connexin-KO mice. The induced lack of expression of a specific connexin in an adult tissue could bring interesting conclusions about the role of that connexin on cell differentiation and growth control. Such a strategy would shut down the compensation phenomenon which is observed during embryogenesis and permit the replacement of the lacking connexin by others [157]. Connexin studies should also be extended to the human situation by using primary cultures of tumor cells and not only cell lines or animal models which have their own characteristics.

Now, let us imagine for a while the domain of gap junction research as a tree. The common trunk would correspond to the discovery of gap junction, their molecular structure, the diversity of connexins as members of a multigene family, etc. From that trunk, emerging branches would characterize the accomplished progresses concerning the involvement of gap junctions/or connexins in physiological and/or pathological events. Some of these branches could eventually grow up to the full understanding of their role in such events. Newer branches of that tree have been growing quickly establishing in very recent years a clear association between certain connexins, their function and particular types of human diseases. Branches elucidating physiological roles from studies using connexin-KO mice as models were also growing very rapidly during the last decade. Paradoxically, there is not yet a so rapid growth of knowledge about the oldest branch, which emerged about 40 years ago and associates one of the most extended human diseases, cancer, with gap junctions. Over these past four decades of research, it has become clear that connexins and GJIC are involved in cancer and cellular growth control. However, there does not appear to be a single, consistent result or mechanism. This is most likely due to the diversity of connexins and gap-junction channel properties, and the cell types and context in which they are expressed. Future research will undoubtedly help to clarify these ambiguities and lead to a better understanding of the mechanisms which are involved.

Acknowledgements

This work was supported by La Ligue Régionale contre le Cancer (Comités de la Vienne et de la Charente-Maritime) et par le Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (COFECUB, projet: 386/02).

References

- K. Willecke, J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch, G. Sohl, Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome, Biol. Chem. 383 (2002) 725–737.
- [2] B. Constantin, L. Cronier, Involvement of gap junctional communication in myogenesis, Int. Rev. Cytol. 196 (2000) 1–65.
- [3] G. Pointis, D. Ségrétain, Role of connexin-based gap junction channels in testis, Trends Endocrinol. Metab. 16 (2005) 300-306.
- [4] W.R. Loewenstein, Junctional intercellular communication and the control of growth, Biochim. Biophys. Acta 560 (1979) 1–65.
- [5] H. Yamasaki, C.C. Naus, Role of connexin genes in growth control, Carcinogenesis 17 (1996) 1199–1213.
- [6] M. Mesnil, Connexins and cancer, Biol. Cell. 94 (2002) 493-500.
- [7] W.R. Loewenstein, Y. Kanno, Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells, Nature 209 (1966) 1248–1249.
- [8] W.R. Loewenstein, Y. Kanno, Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth, J. Cell Biol. 33 (1967) 225-234.
- [9] R.D. Penn, Ionic communication between liver cells, J. Cell Biol. 29 (1966) 171-174.
- [10] A. Jamakosmanovic, W.R. Loewenstein, Intercellular communication and tissue growth. 3. Thyroid cancer, J. Cell Biol. 38 (1968) 556-561.
- [11] Y. Kanno, Y. Matsui, Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium, Nature 218 (1968) 775–776.
- [12] L.P. Yotti, C.C. Chang, J.E. Trosko, Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter, Science 206 (1979) 1089-1091.

- [13] A.W. Murray, D.J. Fitzgerald, Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 91 (1979) 395–401.
- [14] I.V. Budunova, G.M. Williams, Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication, Cell Biol. Toxicol. 10 (1994) 71–116.
- [15] J.E. Trosko, C.C. Chang, Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis: role of inhibited intercellular communication, Banbury Report 31: Carcinogen Risk Assessment: New Directions in the Qualitative and Quantitative Aspects, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988, pp. 139–170.
- [16] R. Bruzzone, T.W. White, D.L. Paul, Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling, Eur. J. Biochem. 238 (1996) 1-27.
- [17] N.M. Kumar, N.B. Gilula, The gap junction communication channel, Cell 84 (1996) 381–388.
- [18] J.E. Trosko, The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis, J. Biochem. Mol. Biol. 36 (2003) 43-48.
- [19] H.B. Grossman, M. Liebert, I.W. Lee, S.W. Lee, Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells, Cancer Res. 54 (1994) 3062–3065.
- [20] J. Gee, M. Tanaka, H.B. Grossman, Connexin26 is abnormally expressed in bladder cancer, J. Urol. 169 (2003) 1135–1137.
- [21] L. Soroceanu, T.J. Manning Jr., H. Sontheimer, Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas, Glia 33 (2001) 107–117.
- [22] R.P. Huang, M.Z. Hossain, A. Sehgal, A.L. Boynton, Reduced connexin-43 expression in high-grade human brain glioma cells, J. Surg. Oncol. 70 (1999) 21–24.
- [23] P. Pu, Z. Xia, S. Yu, Q. Huang, Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors, Clin. Neurol. Neurosurg. 107 (2004) 49-54.
- [24] S. Jamieson, J.J. Going, R. D'Arcy, W.D. George, Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours, J. Pathol. 184 (1998) 37-43.
- [25] D.W. Laird, P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H.T. Huynh, G.D. Carystinos, M.A. Alaoui-Jamali, Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors, Cancer Res. 59 (1999) 4104–4110.
- [26] T.J. King, L.H. Fukushima, A.D. Hieber, K.A. Shimabukuro, W.A. Sakr, J.S. Bertram, Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression, Carcinogenesis 21 (2000) 1097–1109.
- [27] T. Saito, M. Oyamada, H. Yamasaki, M. Mori, R. Kudo, Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy, Int. J. Cancer 73 (1997) 479–485.
- [28] T. Saito, M. Nishimura, R. Kudo, H. Yamasaki, Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium, Int. J. Cancer 93 (2001) 317–323.
- [29] A.E. Al Moustafa, M.A. Alaoui-Jamali, G. Batist, M. Hernandez-Perez, C. Serruya, L. Alpert, M.J. Black, R. Sladek, W.D. Foulkes, Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells, Oncogene 21 (2002) 2634–2640.
- [30] B. Schneider, M. Teschner, T. Sudermann, B. Pikula, J. Lautermann, Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx ORL, J. Oto-Rhino-Laryngol. Relat. Spec. 64 (2002) 324–329.
- [31] V. Krutovskikh, G. Mazzoleni, N. Mironov, Y. Omori, A.M. Aguelon, M. Mesnil, F. Berger, C. Partensky, H. Yamasaki, Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32, Int. J. Cancer 56 (1994) 87–94.
- [32] K.K. Wilgenbus, C.J. Kirkpatrick, R. Knuechel, K. Willecke, O. Traub, Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues, Int. J. Cancer 51 (1992) 522–529.

- [33] M. Oyamada, V.A. Krutovskikh, M. Mesnil, C. Partensky, F. Berger, H. Yamasaki, Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43, Mol. Carcinog. 3 (1990) 273–278.
- [34] K. Cesen-Cummings, M.J. Fernstrom, A.M. Malkinson, R.J. Ruch, Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells, Carcinogenesis 19 (1998) 61–67.
- [35] E. Tomai, H.L. Brownell, T.V. Tufescu, K. Reid, B.G. Campling, L. Raptis, Gap junctional communication in cultured human lung carcinoma cells, Lung Cancer 23 (1999) 223–231.
- [36] J. Loncarek, H. Yamasaki, P. Levillain, S. Milinkevitch, M. Mesnil, The expression of the tumor suppressor gene connexin 26 is not mediated by methylation in human esophageal cancer cells, Mol. Carcinog. 36 (2003) 74-81.
- [37] Y. Oyamada, M. Oyamada, A. Fusco, H. Yamasaki, Aberrant expression, function and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120 (1994) 445–453.
- [38] E.A. Hanna, S. Umhauer, S.L. Roshong, M.P. Piechocki, M.J. Fernstrom, J.D. Fanning, R.J. Ruch, Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro, Carcinogenesis 20 (1999) 1369-1373.
- [39] S. Umhauer, R.J. Ruch, J. Fanning, Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma, Am. J. Obstet. Gynecol. 182 (2000) 999–1000.
- [40] Y. Zhai, R. Wu, D.R. Schwartz, D. Darrah, H. Reed, F.T. Kolligs, M.T. Nieman, E.R. Fearon, K.R. Cho, Role of beta-catenin/T-cell factorregulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas, Am. J. Pathol. 160 (2002) 1229–1238.
- [41] H. Tsai, J. Werber, M.O. Davia, M. Edelman, K.E. Tanaka, A. Melman, G.J. Christ, J. Geliebter, Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 22 (1996) 64–69.
- [42] P.P. Mehta, C. Perez-Stable, M. Nadji, M. Mian, K. Asotra, B.A. Roos, Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes, Dev. Genet. 24 (1999) 91–110.
- [43] H. Habermann, V. Ray, W. Habermann, G.S. Prins, Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, J. Urol. 166 (2001) 2267–2272.
- [44] H. Habermann, V. Ray, W. Habermann, G.S. Prins, Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, J. Urol. 167 (2002) 655–660.
- [45] P.P. Mehta, B.L. Lokeshwar, P.C. Schiller, M.V. Bendix, R.C. Ostenson, G.A. Howard, B.A. Roos, Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP, Mol. Carcinog. 15 (1996) 18-32.
- [46] G. Carruba, M.M. Webber, S.T. Quader, M. Amoroso, L. Cocciadiferro, F. Saladino, J.E. Trosko, L.A. Castagnetta, Regulation of cell-to-cell communication in non-tumorigenic and malignant human prostate epithelial cells, Prostate 50 (2002) 73-82.
- [47] M.Z. Hossain, A.B. Jagdale, P. Ao, C. LeCiel, R.P. Huang, A.L. Boynton, Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells, Prostate 38 (1999) 55–59.
- [48] J. Tada, K. Hashimoto, Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma, J. Cutan. Pathol. 24 (1997) 628-635.
- [49] R. Brehm, A. Marks, R. Rey, S. Kliesch, M. Bergmann, K. Steger, Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma, J. Pathol. 197 (2002) 647–653.
- [50] B. Cochand-Priollet, D. Raison, V. Molinie, P.J. Guillausseau, M. Wassef, C. Bouchaud, Altered gap and tight junctions in human thyroid oncocytic tumors: a study of 8 cases by freeze-fracture, Ultrastruct. Pathol. 22 (1998) 413–420.
- [51] T. Yano, F. Ito, K. Kobayashi, Y. Yonezawa, K. Suzuki, R. Asano, K.

Hagiwara, H. Nakazawa, H. Toma, H. Yamasaki, Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients, Cancer Lett. 208 (2004) 137–142.

- [52] V.A. Krutovskikh, M. Oyamada, H. Yamasaki, Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo, Carcinogenesis 12 (1991) 1701–1706.
- [53] R.J. Ruch, J.E. Trosko, The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis, Anticancer Res. 19 (1999) 4831–4838.
- [54] X.D. Ma, Y.F. Sui, W.L. Wang, Expression of gap junction genes connexin 32, connexin 43 and their proteins in hepatocellular carcinoma and normal liver tissues, World J. Gastroenterol. 6 (2000) 66-69.
- [55] D.J. Fitzgerald, M. Mesnil, M. Oyamada, H. Tsuda, N. Ito, H. Yamasaki, Changes in gap junction protein (connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis, J. Cell. Biochem. 41 (1989) 97–102.
- [56] D.G. Beer, M.J. Neveu, D.L. Paul, U.R. Rapp, H.C. Pitot, Expression of the c-raf protooncogene, gamma-glutamyltranspeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms, Cancer Res. 48 (1988) 1610–1617.
- [57] H. Sakamoto, M. Oyamada, K. Enomoto, M. Mori, Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats, Jpn. J. Cancer Res. 83 (1992) 1210-1215.
- [58] M.J. Neveu, J.R. Hully, K.L. Babcock, E.L. Hertzberg, B.J. Nicholson, D.L. Paul, H.C. Pitot, Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver, J. Cell Sci. 107 (1994) 83–95.
- [59] M.J. Neveu, J.R. Hully, K.L. Babcock, J. Vaughan, E.L. Hertzberg, B.J. Nicholson, D.L. Paul, H.C. Pitot, Proliferation-associated differences in the spatial and temporal expression of gap junction genes in rat liver, Hepatology 22 (1995) 202–212.
- [60] A. Temme, A. Buchmann, H.D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz, K. Willecke, High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32, Curr. Biol. 7 (1997) 713–716.
- [61] I. Plante, M. Charbonneau, D.G. Cyr, Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced genderspecific hepatic tumor formation in the rat, Carcinogenesis 23 (2002) 1243-1249.
- [62] H. Tsuda, M. Asamoto, H. Baba, Y. Iwahori, K. Matsumoto, T. Iwase, Y. Nishida, S. Nagao, K. Hakoi, S. Yamaguchi, Cell proliferation and advancement of hepatocarcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin 32 expression, Carcinogenesis 16 (1995) 101–105.
- [63] K. Yamaoka, T. Nouchi, J. Tazawa, S. Hiranuma, F. Marumo, C. Sato, Expression of gap junction protein connexin 32 and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma, J. Hepatol. 22 (1995) 536–539.
- [64] A. Temme, T. Ott, F. Dombrowski, K. Willecke, The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin32 expressing gap junctions, J. Hepatol. 32 (2000) 627-635.
- [65] G. Servillo, M.A. Della Fazia, P. Sassone-Corsi, Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM, Exp. Cell Res. 275 (2002) 143–154.
- [66] G. Servillo, M.A. Della Fazia, P. Sassone-Corsi, Transcription factor CREM coordinates the timing of hepatocyte proliferation in the regenerating liver, Genes Dev. 12 (1998) 3639–3643.
- [67] M.J. Sawey, M.H. Goldschmidt, B. Risek, N.B. Gilula, C.W. Lo, Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia, Mol. Carcinog. 17 (1996) 49-61.
- [68] Y. Kamibayashi, Y. Oyamada, M. Mori, M. Oyamada, Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo, Carcinogenesis 16 (1995) 1287–1297.
- [69] I.V. Budunova, S. Carbajal, T.J. Slaga, The expression of gap junctional proteins during different stages of mouse skin carcinogenesis, Carcinogenesis 16 (1995) 2717–2724.
- [70] R.C. Klann, D.J. Fitzgerald, C. Piccoli, T.J. Slaga, H. Yamasaki, Gapjunctional intercellular communication in epidermal cell lines from

selected stages of SENCAR mouse skin carcinogenesis, Cancer Res. 49 (1989) 699-705.

- [71] I.V. Budunova, S. Carbajal, A. Viaje, T.J. Slaga, Connexin expression in epidermal cell lines from SENCAR mouse skin tumors, Mol. Carcinog. 15 (1996) 190–201.
- [72] P.R. Holden, B. McGuire, A. Stoler, A. Balmain, J.D. Pitts, Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis, Carcinogenesis 18 (1997) 15–21.
- [73] W.M. Jongen, D.J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T.J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi, H. Yamasaki, Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca2+ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin, J. Cell Biol. 114 (1991) 545-555.
- [74] F.M. Lyng, H.L. de Feijter-Rupp, T. Hayashi, K. O'Malley, D.M. Murphy, D.C. Cottell, J.E. Trosko, C.B. Seymour, C. Mothersill, Effect of a tobacco-related nitrosamine on intercellular communication in human urothelial cells: a possible factor in smoking-related bladder carcinogenesis, Oncol. Res. 8 (1996) 371–378.
- [75] M. Asamoto, S. Takahashi, K. Imaida, T. Shirai, S. Fukushima, Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis, Carcinogenesis 15 (1994) 2163–2166.
- [76] S.A. Garber, M.J. Fernstrom, G.D. Stoner, R.J. Ruch, Altered gap junctional intercellular communication in neoplastic rat esophageal epithelial cells, Carcinogenesis 18 (1997) 1149–1153.
- [77] S.W. Lee, C. Tomasetto, R. Sager, Positive selection of candidate tumorsuppressor genes by subtractive hybridization, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 2825-2829.
- [78] R.J. Ruch, K. Cesen-Cummings, A.M. Malkinson, Role of gap junctions in lung neoplasia, Exp. Lung Res. 24 (1998) 523-539.
- [79] R.J. Ruch, S. Porter, L.D. Koffler, L.D. Dwyer-Nield, A.M. Malkinson, Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation, Exp. Lung Res. 27 (2001) 231–243.
- [80] R. Chaudhuri, K. Sigler, E. Dupont, J.E. Trosko, A.M. Malkinson, R.J. Ruch, Gap junctional intercellular communication in mouse lung epithelial cell lines: effects of cell transformation and tumor promoters, Cancer Lett. 71 (1993) 11–18.
- [81] E. Tomai, H.L. Brownell, T.V. Tufescu, S. Raptis, K. Reid, B.G. Campling, L. Raptis, A functional assay for intercellular, junctional communication in cultured human lung carcinoma cells, Lab. Invest. 78 (1998) 639-640.
- [82] L. Lin, Y. Wang, G. Bergman, G.J. Kelloff, R.A. Lubet, M. You, Detection of differentially expressed genes in mouse lung adenocarcinomas, Exp. Lung Res. 27 (2001) 217–229.
- [83] A. Vultur, E. Tomai, K. Peebles, A.M. Malkinson, N. Grammatikakis, P.G. Forkert, L. Raptis, Gap junctional intercellular communication in cells isolated from urethane-induced tumors in A/J mice, DNA Cell Biol. 22 (2003) 33–40.
- [84] J.L. Avanzo, M. Mesnil, F.J. Hernandez-Blazquez, I.I. Mackowiak, C.M. Mori, T.C. da Silva, S.C. Oloris, A.P. Garate, S.M. Massironi, H. Yamasaki, M.L. Dagli, Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43, Carcinogenesis 25 (2004) 1973–1982.
- [85] M.J. Neveu, C.A. Sattler, G.L. Sattler, J.R. Hully, E.L. Hertzberg, D.L. Paul, B.J. Nicholson, H.C. Pitot, Differences in the expression of connexin genes in rat hepatomas in vivo and in vitro, Mol. Carcinog. 11 (1994) 145–154.
- [86] Y. Fujikura, H. Ohta, T. Hirai, T. Fukumoto, Immunohistochemical analysis of rat liver using a monoclonal antibody (HAM8) against gap junction, Anat. Rec. 235 (1993) 335-341.
- [87] A. Hirai, T. Yano, K. Nishikawa, K. Suzuki, R. Asano, H. Satoh, K. Hagiwara, H. Yamasaki, Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell line, Am. J. Nephrol. 23 (2003) 172–177.
- [88] T.J. King, L.H. Fukushima, T.A. Donlon, A.D. Hieber, K.A. Shimabukuro, J.S. Bertram, Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa

cell lines: implications for tumor progression, Carcinogenesis 21 (2000) 311-315.

- [89] T. Yano, F.J. Hernandez-Blazquez, Y. Omori, H. Yamasaki, Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32, Carcinogenesis 22 (2001) 1593-1600.
- [90] D. Ségrétain, X. Decrouy, J. Dompierre, D. Escalier, N. Rahman, C. Fiorini, B. Mograbi, J.P. Siffroi, I. Huhtaniemi, P. Fenichel, G. Pointis, Sequestration of connexin43 in the early endosomes: an early event of Leydig cell tumor progression, Mol. Carcinog. 38 (2003) 179–187.
- [91] C. Roger, B. Mograbi, D. Chevallier, J.F. Michiels, H. Tanaka, D. Segretain, G. Pointis, P. Fenichel, Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease, J. Pathol. 202 (2004) 241–246.
- [92] R.A. McMasters, R.L. Saylors, K.E. Jones, M.E. Hendrix, M.P. Moyer, R.R. Drake, Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation, Hum. Gene Ther. 9 (1998) 2253-2261.
- [93] R. Govindarajan, S. Zhao, X.H. Song, R.J. Guo, M. Wheelock, K.R. Johnson, P.P. Mehta, Impaired trafficking of connexins in androgenindependent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alphacatenin, J. Biol. Chem. 277 (2002) 50087–50097.
- [94] E.M. Hendrix, S.J. Mao, W. Everson, W.J. Larsen, Myometrial connexin 43 trafficking and gap junction assembly at term and in preterm labor, Mol. Reprod. Dev. 33 (1992) 27–38.
- [95] C. Batias, J.P. Siffroi, P. Fenichel, G. Pointis, D. Segretain, Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium, J. Histochem. Cytochem. 48 (2000) 793-805.
- [96] N. Defamie, B. Mograbi, C. Roger, L. Cronier, A. Malassine, F. Brucker-Davis, P. Fenichel, D. Segretain, G. Pointis, Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells, Carcinogenesis 22 (2001) 1537–1542.
- [97] X. Guan, R.J. Ruch, Gap junction endocytosis and lysosomal degradation of connexin43-P2 in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with DDT and lindane, Carcinogenesis 17 (1996) 1791–1798.
- [98] B. Mograbi, E. Corcelle, N. Defamie, M. Samson, M. Nebout, D. Segretain, P. Fenichel, G. Pointis, Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen lindane involves activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway, Carcinogenesis 24 (2003) 1415–1423.
- [99] A.W. de Feijter, D.F. Matesic, R.J. Ruch, X. Guan, C.C. Chang, J.E. Trosko, Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells, Mol. Carcinog. 16 (1996) 203-212.
- [100] X. Dang, B.W. Doble, E. Kardami, The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth, Mol. Cell. Biochem. 242 (2003) 35–38.
- [101] R.M. Mège, F. Matsuzaki, W.J. Gallin, J.I. Goldberg, B.A. Cunningham, G.M. Edelman, Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 (1988) 7274–7278.
- [102] L.S. Musil, B.A. Cunningham, G.M. Edelman, D.A. Goodenough, Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines, J. Cell Biol. 111 (1990) 2077-2088.
- [103] T. Enomoto, H. Yamasaki, Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding nontransformed BALB/c 3T3 cells, Cancer Res. 44 (1984) 5200–5203.
- [104] H. Yamasaki, M.C. Hollstein, M. Mesnil, N. Martel, A.M. Aguelon, Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells, Cancer Res. 47 (1987) 5658–5664.
- [105] H. Yamasaki, F. Katoh, Further evidence for the involvement of gapjunctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/c 3T3 cells, Cancer Res. 48 (1988) 3490-3495.
- [106] P.P. Mehta, J.S. Bertram, W.R. Loewenstein, Growth inhibition of

transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells, Cell 44 (1986) 187-196.

- [107] G.S. Goldberg, K.D. Martyn, A.F. Lau, A connexin 43 antisense vector reduces the ability of normal cells to inhibit the foci formation of transformed cells, Mol. Carcinog. 11 (1994) 106–114.
- [108] D.B. Alexander, H. Ichikawa, J.F. Bechberger, V. Valiunas, M. Ohki, C.C. Naus, T. Kunimoto, H. Tsuda, W.T. Miller, G.S. Goldberg, Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and SRC activity, Cancer Res. 64 (2004) 1347-1358.
- [109] M. Mesnil, J.M. Fraslin, C. Piccoli, H. Yamasaki, C. Guguen-Guillouzo, Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions, Exp. Cell Res. 173 (1987) 524–533.
- [110] O. Mandelboim, G. Berke, M. Fridkin, M. Feldman, M. Eisenstein, L. Eisenbach, CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma, Nature 369 (1994) 67-71.
- [111] G. Berke, V. Krutovskikh, H. Yamasaki, Connexin 37 gene is not mutated in lung carcinomas 3LL and CMT, Cancer Lett. 195 (2003) 67–72.
- [112] T. Saito, A. Barbin, Y. Omori, H. Yamasaki, Connexin 37 mutations in rat hepatic angiosarcomas induced by vinyl chloride, Cancer Res. 57 (1997) 375-377.
- [113] T. Saito, V. Krutovskikh, M.J. Marion, K.G. Ishak, W.P. Bennett, H. Yamasaki, Human hemangiosarcomas have a common polymorphism but no mutations in the connexin37 gene, Int. J. Cancer 86 (2000) 67–70.
- [114] V. Krutovskikh, N. Mironov, H. Yamasaki, Human connexin 37 is polymorphic but not mutated in tumours, Carcinogenesis 17 (1996) 1761-1763.
- [115] N.M. Mironov, M.A. Aguelon, G.I. Potapova, Y. Omori, O.V. Gorbunov, A.A. Klimenkov, H. Yamasaki, Alterations of (CA)n DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer, Cancer Res. 54 (1994) 41–44.
- [116] M.V. Dubina, N.A. Iatckii, D.E. Popov, S.V. Vasiliev, V.A. Krutovskikh, Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer, Oncogene 21 (2002) 4992–4996.
- [117] Y. Omori, V. Krutovskikh, N. Mironov, H. Tsuda, H. Yamasaki, Cx32 gene mutation in a chemically induced rat liver tumour, Carcinogenesis 17 (1996) 2077–2080.
- [118] K. Yamakage, Y. Omori, M.L. Zaidan-Dagli, M.P. Cros, H. Yamasaki, Induction of skin papillomas, carcinomas, and sarcomas in mice in which the connexin 43 gene is heterologously deleted, J. Invest. Dermatol. 114 (2000) 289–294.
- [119] M. Broghammer, P. Leistenschneider, M. Baus-Loncar, N. Blin, M.M. Sasiadek, C.M. Pusch, Reduced expression of connexin31.1 in larynx cancer is not caused by GJB5 mutations, Cancer Lett. 214 (2004) 225–229.
- [120] H. Lahlou, M. Fanjul, L. Pradayrol, C. Susini, S. Pyronnet, Restoration of functional gap junctions through internal ribosome entry sitedependent synthesis of endogenous connexins in density-inhibited cancer cells, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 4034–4045.
- [121] A. Hudder, R. Werner, Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene, J. Biol. Chem. 275 (2000) 34586-34591.
- [122] A. Schiavi, A. Hudder, R. Werner, Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site, FEBS Lett. 464 (1999) 118–122.
- [123] J. Bergoffen, S.S. Scherer, S. Wang, M.O. Scott, L.J. Bone, D.L. Paul, K. Chen, M.W. Lensch, P.F. Chance, K.H. Fischbeck, Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, Science 262 (1993) 2039-2042.
- [124] V.V. Ionasescu, C. Searby, R. Ionasescu, I.M. Neuhaus, R. Werner, Mutations of the noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy, Neurology 47 (1996) 541-544.
- [125] H.L. Wang, T. Wu, W.T. Chang, A.H. Li, M.S. Chen, C.Y. Wu, W. Fang, Point mutation associated with X-linked dominant Charcot–Marie– Tooth disease impairs the P2 promoter activity of human connexin-32 gene, Mol. Brain Res. 78 (2000) 146–153.

- [126] P.J. Ainsworth, C.F. Bolton, B.C. Murphy, J.A. Stuart, A.F. Hahn, Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene, Hum. Genet. 103 (1998) 242–244.
- [127] L.D. Koffler, M.J. Fernstrom, T.E. Akiyama, F.J. Gonzales, R.J. Ruch, Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1α, Arch. Biochem. Biophys. 407 (2002) 160–167.
- [128] A. Kalkuhl, K. Kaestner, A. Buchmann, M. Schwarz, Expression of hepatocyte-enriched nuclear transcription factors in mouse liver tumours, Carcinogenesis 17 (1996) 609–612.
- [129] P. Flodby, D.Z. Liao, A. Blanck, K.G. Xanthopoulos, I.P. Hallstrom, Expression of the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, HNF-1, and HNF-4 in preneoplastic nodules and hepatocellular carcinoma in rat liver, Mol. Carcinog. 12 (1995) 103-109.
- [130] W. Wang, Y. Hayashi, T. Ninomiya, K. Ohta, H. Nakabayashi, T. Tamaoki, H. Itoh, Expression of HNF-1 alpha and HNF-1 beta in various histological differentiations of hepatocellular carcinoma, J. Pathol. 184 (1998) 272-278.
- [131] Y. Omori, M. Mesnil, H. Yamasaki, Connexin 32 mutations from Xlinked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects, Mol. Biol. Cell 7 (1996) 907-916.
- [132] G. Richard, F. Rouan, C.E. Willoughby, N. Brown, P. Chung, M. Ryynanen, E.W. Jabs, S.J. Bale, J.J. DiGiovanna, J. Uitto, L. Russell, Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome, Am. J. Hum. Genet. 70 (2002) 1341–1348.
- [133] A. Hotz-Wagenblatt, D. Shalloway, Gap junctional communication and neoplastic transformation, Crit. Rev. Oncog. 4 (1993) 541–558.
- [134] M. Mesnil, H. Yamasaki, Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis, Mol. Carcinog. 7 (1993) 14-17.
- [135] M.L. Nicholson, A.J. Flower, A. Simpson, P.K. Donnelly, P.S. Veitch, P.R. Bell, Ganciclovir for severe cytomegalovirus infection in transplant recipients, Lancet 2 (1988) 1501–1502.
- [136] Z.Q. Zhang, W. Zhang, N.Q. Wang, M. Bani-Yaghoub, Z.X. Lin, C.C. Naus, Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43, Carcinogenesis 19 (1998) 1889–1894.
- [137] M.M. Saunders, M.J. Seraj, Z. Li, Z. Zhou, C.R. Winter, D.R. Welch, H.J. Donahue, Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication, Cancer Res. 61 (2001) 1765–1767.
- [138] P.D. Lampe, B.P. Nguyen, S. Gil, M. Usui, J. Olerud, Y. Takada, W.G. Carter, Cellular interaction of integrin alpha3beta1 with laminin 5 promotes gap junctional communication, J. Cell Biol. 143 (1998) 1735-1747.
- [139] G. Carystinos, A. Bier, G. Batist, The role of connexin-mediated cellcell communication in breast cancer metastasis, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 6 (2001) 431–440.
- [140] T. Braüner, D.F. Hülser, Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids, Invasion Metastasis 10 (1990) 31–48.
- [141] S.H. Graeber, D.F. Hulser, Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells, Exp. Cell Res. 243 (1998) 142–149.
- [142] A. Ito, N. Morita, D. Miura, Y. Koma, T.R. Kataoka, H. Yamasaki, Y. Kitamura, Y. Kita, H. Nojima, A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells, Carcinogenesis 25 (2004) 2015–2022.
- [143] M.A. Pollmann, Q. Shao, D.W. Laird, M. Sandig, Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture, Breast Cancer Res. 7 (2005) R522–R534.
- [144] A. Ito, F. Katoh, T.R. Kataoka, M. Okada, N. Tsubota, H. Asada, K. Yoshikawa, S. Maeda, Y. Kitamura, H. Yamasaki, H. Nojima, A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis, J. Clin. Invest. 105 (2000) 1189–1197.

- [145] M.E. El-Sabban, B.U. Pauli, Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium, Invasion Metastasis 14 (1994–95) 164–176.
- [146] M.E. El-Sabban, R.A. Merhi, H.A. Haidar, B. Arnulf, H. Khoury, J. Basbous, J. Nijmeh, H. de The, O. Hermine, A. Bazarbachi, Human Tcell lymphotropic virus type 1-transformed cells induce angiogenesis and establish functional gap junctions with endothelial cells, Blood 99 (2002) 3383–3389.
- [147] A. Bazarbachi, R. Abou Merhi, A. Gessain, R. Talhouk, H. El-Khoury, R. Nasr, O. Gout, R. Sulahian, F. Homaidan, H. de The, O. Hermine, M.E. El-Sabban, Human T-cell lymphotropic virus type I-infected cells extravasate through the endothelial barrier by a local angiogenesis-like mechanism, Cancer Res. 64 (2004) 2039–2046.
- [148] J. Cai, W.G. Jiang, R.E. Mansel, Gap junctional communication and the tyrosine phosphorylation of connexin 43 in interaction between breast cancer and endothelial cells, Int. J. Mol. Med. 1 (1998) 273-278.
- [149] T. Shibata, H. Nagayasu, J. Hamada, S. Konaka, M. Hosokawa, T. Kawano, H. Kitajo, M. Arisue, Inhibitory effects of malotilate on in vitro invasion of lung endothelial cell monolayer by human oral squamous cell carcinoma cells, Tumour Biol. 21 (2000) 299–308.
- [150] D. Stuhlmann, N. Ale-Agha, R. Reinehr, H. Steinbrenner, M.C. Ramos, H. Sies, P. Brenneisen, Modulation of homologous gap junctional intercellular communication of human dermal fibroblasts via a paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells, Carcinogenesis 24 (2003) 1737-1748.
- [151] J.T. Chen, Y.W. Cheng, M.C. Chou, T. Sen-Lin, W.W. Lai, W.L. Ho, H. Lee, The correlation between aberrant connexin 43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in nonsmall cell lung cancer, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 4200–4204.
- [152] P. Kapoor, M.M. Saunders, Z. Li, Z. Zhou, N. Sheaffer, E.L. Kunze, R.S. Samant, D.R. Welch, H.J. Donahue, Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells, \u03c4 n. J. Cancer 111 (2004) 693-697.
- [153] O. Mandelboim, E. Vadai, M. Fridkin, A. Katz-Hillel, M. Feldman, G. Berke, L. Eisenbach, Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides, Nat. Med. 1 (1995) 1179–1183.
- [154] O. Mandelboim, E. Bar-Haim, E. Vadai, M. Fridkin, L. Eisenbach, Identification of shared tumor-associated antigen peptides between two spontaneous lung carcinomas, J. Immunol. 159 (1997) 6030-6036.
- [155] K.D. Martyn, W.E. Kurata, B.J. Warn-Cramer, J.M. Burt, E. TenBroek, A.F. Lau, Immortalized connexin43 knockout cell lines display a subset of biological properties associated with the transformed phenotype, Cell Growth Differ. 8 (1997) 1015–1027.
- [156] C.C. Naus, J.F. Bechberger, Y. Zhang, L. Venance, H. Yamasaki, S.C. Juneja, G.M. Kidder, C. Giaume, Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43, J. Neurosci. Res. 49 (1997) 528–540.
- [157] R. Dermietzel, Y. Gao, E. Scemes, D. Vieira, M. Urban, M. Kremer, M.V. Bennett, D.C. Spray, Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins, Brain. Res. Brain. Res. Rev. 32 (2000) 45-56.
- [158] A. Romualdi, H. Niessen, F. Dombrowski, K. Willecke, T. Ott, Quantitative analysis of gap-junctional intercellular communication in precision-cut mouse liver slices, Cell Tissue Res. 307 (2002) 315-320.
- [159] D.A. Iacobas, M. Urban-Maldonado, S. Iacobas, E. Scemes, D.C. Spray, Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes, Physiol. Genomics 15 (2003) 177–190.
- [160] D.A. Iacobas, E. Scemes, D.C. Spray, Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction, Neurochem. Int. 45 (2004) 243–250.