

# THESE

Pour l'obtention du grade de

## **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National-Arrêté du 7 août 2006)

Ecole doctorale Bio-Santé

Présentée par :

***Coralie LAMICHE***

\*\*\*\*\*

### **Influence de la connexine 43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur le développement de métastases osseuses.**

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse: **Dr. Laurent CRONIER**

\*\*\*\*\*

Soutenue le 13 Décembre 2011

Devant la Commission d'Examen

## **JURY**

Dr. Joëlle Amédée	Directeur de Recherche, INSERM, Bordeaux	Rapporteur
Dr. Jacques-Antoine Haefliger	Directeur de Recherche, Hôpital Universitaire, Lausanne	Rapporteur
Dr. Franck Verrecchia	Directeur de Recherche, INSERM, Nantes	Examineur
Pr. Paule Séité	Professeur, Université de Poitiers	Examineur
Pr. Maria Lucia Zaidan Dagli	Professeur, Université de Sao Paulo	Examineur
Pr. Marc Mesnil	Professeur, Université de Poitiers	Examineur
Dr. Laurent Cronier	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur

# *Remerciements*

## Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC, UMR-CNRS 6187) dirigé par le professeur Frédéric Becq, dans l'équipe Physiopathologie de la Communication et de la Différenciation Cellulaires dirigée par le professeur Marc Mesnil. Je remercie tout d'abord le professeur Frédéric Becq pour son accueil au sein de l'Institut.

Je tiens à remercier le docteur Joëlle Amédée et le docteur Jacques-Antoine Haefliger d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que le professeur Paule Séité, le professeur Maria Lucia Zaidan Dagli ainsi que le docteur Franck Verrecchia d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le professeur Marc Mesnil d'une part d'examiner mon travail de thèse et d'autre part de m'avoir acceptée au sein de l'équipe. Merci pour la bonne humeur et pour les petites « vannes » mais également pour votre soutien durant ma dernière année de thèse.

Je remercie sincèrement le docteur Laurent Cronier (autrement dit : Chef) de m'avoir soutenue et supportée pendant ces trois années. Merci d'avoir toujours été disponible lors de mes nombreuses interrogations et d'avoir accepté mes choix. Je vous remercie d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir laissée une assez grande autonomie pour la gestion des expériences et des étudiants. Encore merci pour la correction du manuscrit (je sais ma rédaction est assez particulière) et pour votre esprit critique. J'ai énormément appris à vos côtés, notamment votre humour mais aussi à être plus à l'aise lors des présentations, la façon de mettre en avant les résultats... Merci pour tout, ces trois années ont été une fabuleuse expérience.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe PCDC et plus particulièrement :

Le docteur Norah Defamie pour sa bonne humeur et son rire communicatif. Le petit congrès à Ghent (ou gand ou gent) a été très sympathique. Merci également pour votre soutien et je pense que je n'oublierai jamais vos « A TABLE » si légendaires.

Le docteur Annie Claire Balandre ou maman Annie (ou père Fourras du PBS) pour sa gentillesse, sa générosité et également sa bonne humeur. Mon dicton est « un souci demandez à Annie ». Merci d'être là pour tout le monde et à n'importe quel moment de la journée. Encore désolé pour la carte vermeille.

Le docteur Arnaud Monvoisin pour son humour décapant (merci pour le surnom Sue Hellen), le professeur Patricia Arnaud pour son soutien, le docteur Corinne Chadéneau pour son amour de la radio nostalgie et pour son rire communicatif, le professeur Jean-Marc Muller pour sa compassion pour mes allergies et surtout pour ses « salut ça gaze !! », le Docteur Brigitte Vannier pour toutes ses expressions et comme vous dites « what the fuck !! », le professeur Paule Séité pour son soutien et sa joie de vivre, et enfin Gaël Espitolin pour ses calendriers originaux, sa bonne humeur, je te souhaite un bon rétablissement et garde le moral. Encore merci pour la bonne humeur lors des réunions, des apéritifs et des différents repas organisés.

Les différents thésards de PCDC : Je remercie Stéphanie pour ses nombreux CochaudShow durant la pause de midi, Mahmoud pour ton humour, Souheylette (souheyla) pour ta gentillesse, Aurélie (petit chou) pour ta gentillesse et vive le Limousin !!

Je remercie également les thésards (actuels ou anciens) qui sont devenus ou qui étaient mes amis : tout d'abord Jonathan (Jo, G.I Joe, Dieu, Grumpy) : Merci de m'avoir transmise une partie de ton savoir sur la biologie moléculaire (ce fut dur pour toi), de m'avoir supportée avec mes goûts particuliers pour la musique (vive nostalgie). Merci également pour ces nombreuses discussions. Je souhaite vraiment que tu perces dans ce métier !! Pierre-Olivier (PO, mono) pour son humour ravageur, les fous rires nerveux après avoir passé des heures enfermé en salle culture. Merci pour tes petits pas de danse digne de Fred Astaire et aussi pour les nombreux surnoms que tu m'as donné (dont le préfixe est Clamiche). Je te souhaite que du bonheur dans cette nouvelle expérience à Paris. Sylvain (Titou) pour ces cinq années de rire depuis le master, pour ton soutien, tes petites blagues et ta bonne humeur. On revient quand tu veux sur ton île !! Si toutefois tu ouvres un bar appelle nous.

Je remercie les étudiants qui ont passé un petit moment dans le bureau et notamment : Adrien (Pignon) : il a réussi à me supporter pendant deux stages et a toujours été à l'écoute. Merci pour tes apéros à base de foie gras. Bon courage pour ta thèse au Canada. Marie (mini-paille) pour ta gentillesse, ton humour, c'était comme une petite sœur dans le bureau. David (Davy Crocket) pour tes petites blagues et ta patience pour la filtration des colorants !! Profite bien à Toulouse. Paul : le plus zen des étudiants dont la philosophie est à prendre en compte. Elodie : même si tu n'as pas été dans le bureau, ton rire a résonné dans le couloir.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe PPCI qui m'a accueillie lors de mon stage de première et de deuxième année de master et principalement : le docteur Bruno Constantin pour m'avoir convaincue de faire une thèse. Le docteur Nadine Déliot (didine) pour son humour et les discussions autour d'une tasse de thé (vive l'histidine). Le docteur Christian Cognard pour son humour décalé. Sandra : la tornade noire du PBS, merci pour ta joie de vivre et ton côté « fufou ». Christophe pour sa gentillesse. Le docteur Clarisse Vandebrouck pour ses conseils et merci d'avoir accepté d'être ma tutrice. Le docteur Jocelyn Bescond pour ses discussions « rugbyistiques » et son amour de la Corrèze : vive les Coujes ! Les Professeurs Jean-François Faivre et Patrick Bois pour leur amour de la physiologie et leur bonne humeur. Arnaud : ce fut un plaisir d'avoir été à tes côtés représentante des doctorants : profite bien au Canada. Luc : merci pour tes informations sur les petits débrouillards et pour ton humour piquant. Rania : merci pour ta spontanéité ainsi que ton énergie (et tu en as beaucoup). Tristan : merci pour tes conseils sur l'invasion et courage ! Enfin et pas les moindre : Jessica et Ludivine (La Gezz et la Lu) : deux personnes qui m'ont soutenue lors de mes choix post-master, les fous rires et les moments partagés ont été très précieux durant ces deux stages. Vive kadokado, Annie Cordy et bien d'autres !! Encore merci les filles.

Je suis reconnaissant envers l'ensemble du département d'enseignement de physiologie animale qui m'a permis de partager leur expérience de l'enseignement supérieure.

Merci à Isabelle Courtin pour son aide technique lors des différents travaux pratiques.

Je remercie également les Brésiliens qui m'ont généreusement accueillie pendant deux mois et notamment Maria Lucia pour son extrême générosité et pour m'avoir enseigné l'art de la dissection des souris, merci de votre accueil. Merci à Greg, Daniel et Lucas pour leur gentillesse et leur joie de vivre et vive la cachaça (on remet ça quand vous voulez). Merci à Zila et Gisèle « the crazy girls » pour leur simplicité, leur accueil et leur aide. Enfin merci à Claudia pour son aide pour la manipulation des animaux et Yvonne pour sa disponibilité lors des cultures cellulaires et Marguiti pour s'occuper gentiment des coupes. Ce voyage au Brésil a été une belle expérience dont la dissection du tigre restera dans ma mémoire.

Un énorme merci à tous mes amis : certains ont été cités précédemment. Aurélie (Goudi) : merci d'être là pour moi, merci pour ta spontanéité, ta franchise et ton amitié sincère. Depuis cinq ans, on a passé d'excellents moments (surtout les délires en première année de master) : pourvu que ça dure. Encore félicitation pour la plus belle chose que tu es faite : Léana (poupette). Charlotte (Coucoune, Binoute) : Cela fait maintenant huit ans que tu me supportes et que tu me soutiens dans les choix que j'ai fait. Tu ne m'as jamais jugé et tu as toujours été franche avec moi. Mes années à Limoges avec toi : que de souvenir !! Je te souhaite une excellente carrière dans l'enseignement et n'oublie jamais que « tout se sait ».

Merci à tous les anciens Papiens : Céline pour ton accent québécois, ton extrême joie de vivre et ta gentillesse, Mathieu (coquin) ta joie de vivre, ta force et ton rire communicatif, Mathieu (Kokette) pour ta joie de vivre, Charlotte (Grande Cha) pour ton côté sportif et combattant et pour tes « je vous aime tous », Dorothee (Do) pour tes dorothades (il y en a beaucoup) vive les promeneurs de chien, Kévin (Kéké) pour ta gentillesse et ta générosité.

Merci à Arnaud (Arno) pour ton côté enfantin et ton humour (trop proche de Doudou), vous faites une belle famille avec Goudi et vive les Beach Boys. Merci à Julien (Ju) pour tes côtés écolo, tes charentaises et ton humour. Sandrine pour tes petits plats et ton extrême gentillesse. Anna (Monette) pour ta gentillesse, ton humour et ta simplicité : ravie pour ton poste à Montpellier avec Mannython.

Merci à toi Damien (Dab) pour ton humour et tes imitations de Florence Forestie. Merci Claudia pour les petites pauses café avec PO et ta bonne humeur communicative.

Un tendre remerciement à ma petite famille : mes parents qui me soutiennent depuis le début, qui ont toujours cru en moi et qui ont tout fait pour que je puisse arriver là où j'en suis. Je suis fière d'avoir de tels parents. Mon frangin qui lui aussi est là pour moi depuis le début, à ton contact j'ai toujours trois ans d'âge mental. Notre complicité est sans faille et permet d'avancer (un jour je redescendrai dans le sud). Merci d'être là pour moi. Mes deux oncles : Bernard qui a su me guider et m'a permis de relativiser. Merci également pour ton extrême générosité et pour les nombreux fous rires et délires. Dominique (Domi) pour les journées que l'on passait ensemble avant mon départ pour Poitiers. Ma grand-mère (mémé menou) qui a toujours été fière de moi, merci. Enfin, mes beaux-parents Dominique et Jean-Yves qui m'ont tout de suite accepté dans leur famille et me considèrent un peu comme leur fille, merci de votre soutien.

Grand merci à Clément, Doudou pour les intimes, qui me soutient chaque jour. Merci pour ton humour, ta générosité, ta gentillesse, ta tendresse... enfin les mots me manquent... Merci pour tout Doudou (heureusement que tu es un pro en informatique !!).

# *Sommaire*

## Sommaire

<b>Abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>Historique .....</b>	<b>12</b>
<b>I. Chapitre 1 : Connexines et communication intercellulaire jonctionnelle. ....</b>	<b>12</b>
1. Les connexines : une famille multigénique.....	12
1.1. Historique. ....	12
1.2. Nomenclature. ....	12
1.3. Les autres membres apparentés. ....	14
2. Topologie des Connexines. ....	16
3. Distribution tissulaire. ....	17
4. Jonctions communicantes.....	17
4.1. Structure du canal jonctionnel. ....	17
4.2. Compatibilité entre connexines. ....	19
4.3. Turn-over des connexines.....	19
4.4. La perméabilité jonctionnelle. ....	21
4.5. Partenaires protéiques des connexines. ....	22
4.6. Régulation de la communication jonctionnelle. ....	23
4.6.1. Régulation de l'expression des connexines. ....	23
4.6.2. Modulation de l'état d'ouverture des canaux jonctionnels.....	25
4.6.2.1. La sensibilité au calcium. ....	25
4.6.2.2. L'effet du voltage. ....	25
4.6.2.3. L'effet du pH. ....	25
4.6.2.4. L'état de la phosphorylation.....	26
5. Fonction physiologique de la communication jonctionnelle. ....	27
5.1. Les jonctions communicantes au cours du développement.....	27
5.2. Les jonctions communicantes et la différenciation cellulaire. ....	29
5.3. Les jonctions communicantes et la prolifération cellulaire.....	30

5.4. Fonctions d'hémicanaux des connexines. ....	31
5.5. Apport de l'étude des souris invalidées pour les connexines. ....	33
5.6. Physiopathologies liées à un dysfonctionnement des jonctions communicantes. ....	34
<b>II. Chapitre 2: Le cancer. ....</b>	<b>35</b>
1. Généralités. ....	35
1.1. Initiation et promotion. ....	36
1.2. La progression tumorale : développement de métastases. ....	39
2. Cancer de la prostate. ....	42
2.1. La prostate. ....	42
2.2. Epidémiologie du cancer de la prostate. ....	43
2.3. Le dépistage du cancer de la prostate. ....	43
2.4. Les stades évolutifs du cancer de la prostate et les traitements. ....	44
2.5. Facteurs de risque. ....	46
3. Connexines et cancer. ....	47
3.1. Connexines et tumeur primaire. ....	47
3.2. Connexines et progression tumorale. ....	49
3.3. Connexine et cancer de la prostate. ....	51
<b>III. Chapitre 3 : Métastases osseuses. ....</b>	<b>52</b>
1. Physiologie osseuse : le remodelage osseux. ....	52
1.1. Les principaux acteurs et fonctionnement du remodelage osseux. ....	53
1.2. Régulation de la différenciation ostéoclastique. ....	57
1.3. Régulation de la différenciation ostéoblastique. ....	58
1.3.1. Les facteurs de transcription. ....	58
1.3.2. Les facteurs solubles locaux. ....	59
1.3.3. Les facteurs solubles systémiques. ....	60
1.3.4. Les interactions cellulaires. ....	62
1.4. La communication jonctionnelle et le tissu osseux. ....	63
2. Les métastases osseuses. ....	65
2.1. Généralités. ....	65

2.2. Catégories de métastases osseuses. ....	68
2.2.1. <i>Métastases ostéolytiques.</i> ....	68
2.2.2. <i>Métastases ostéoblastiques.</i> .....	69
2.3. Ostéomimétisme. ....	70
2.4. Les métastases osseuses du cancer de la prostate.....	71
2.4.1. <i>Facteurs exprimés par les cellules cancéreuses prostatiques.</i> .....	72
2.4.2. <i>Facteurs présents dans le microenvironnement osseux.</i> ....	74
2.4.3. <i>Connexines et métastases osseuses.</i> ....	75
<b>Objectif de l'étude.....</b>	<b>77</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>79</b>
<b>I. Culture cellulaire.....</b>	<b>79</b>
1. Entretien des cellules.....	79
2. Congélation et décongélation.....	79
3. Obtention des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant la Cx43.....	81
<b>II. Culture primaire d'ostéoblastes de calvaria.....</b>	<b>81</b>
<b>III. RT-PCR quantitative.....</b>	<b>82</b>
1. Extraction des ARN totaux. ....	82
2. Transcription inverse.....	83
3. La PCR quantitative en temps réel.....	83
4. Analyse des résultats. ....	84
5. Validation des amorces murines. ....	84
<b>IV. Western blot.....</b>	<b>85</b>
<b>V. Mesure de la communication jonctionnelle. ....</b>	<b>86</b>
1. La technique de précharge (méthode qualitative).....	87
2. La technique du Gap-FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching (méthode quantitative).....	88

<b>VI. Mesure de l'adhérence aux protéines matricielles.....</b>	<b>89</b>
<b>VII. Mesure de l'invasion.....</b>	<b>89</b>
<b>VIII. Analyse de la viabilité cellulaire. ....</b>	<b>90</b>
1. Test au bleu de méthylène.....	90
2. Test XTT. ....	91
<b>IX. Test d'apoptose par marquage à l'annexine V. ....</b>	<b>91</b>
<b>X. Immunocytochimie de la Cx43 et de la cadhérine-11. ..</b>	<b>92</b>
<b>XI. Analyse protéomique du « sécrétome ».....</b>	<b>93</b>
<b>XII. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL).</b>	<b>93</b>
.....	
<b>XIII. Etude In vivo.....</b>	<b>94</b>
1. Injection intra-tibiale des cellules PC-3 et LNCaP surexprimant ou non la Cx43.....	95
2. Injection intra-cardiaque des cellules PC-3 surexprimant ou non la Cx43.....	96
<b>XIV. Tests statistiques.....</b>	<b>97</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>98</b>
<b>I. Caractérisation des lignées cancéreuses prostatiques suite à la surexpression de la Cx43. ....</b>	<b>98</b>
1. Validation de la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP. ....	98
2. Conséquences phénotypiques de la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques.....	103
<b>II. Impact <i>in vivo</i> des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur le développement de métastases osseuses. ....</b>	<b>109</b>

1. Etude du développement de métastases osseuses suite à l'injection intra-tibiale des lignées cancéreuses surexprimant ou non la Cx43 chez la souris BALB/c Nude. ....	109
2. Etude préliminaire de la dissémination des cellules PC-3 surexprimant ou non la Cx43 suite à l'injection intra-cardiaque chez la souris BALB/c Nude. ....	111
<b>III. Impact <i>in vitro</i> des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur le phénotype des ostéoblastes.</b> .....	<b>113</b>
1. Evaluation de la communication hétérocellulaire. ....	113
2. Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur la prolifération des ostéoblastes. ....	114
3. Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur la différenciation des ostéoblastes. ....	115
3.1. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline. ....	115
3.2. Effet sur l'expression génique de marqueurs de différenciation ostéoblastique. ....	116
<b>IV. Etude préliminaire de l'expression de la cadhérine-11 dans les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43.</b> .....	<b>122</b>
<b>Discussion.</b> .....	<b>124</b>
<b>Conclusion et perspectives.</b> .....	<b>137</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>142</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>190</b>

## *Abréviations*

## Abréviations

### A

ADNc : Acide DésoxiriboNucléique complémentaire

ADP : Adénosine DiPhosphate

AM : AcétoxyMéthylester

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AP-1 : Activator Protein 1

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATF4 : Activating Transcriptor Factor 4

ATP : Adénosine TriPhosphate

### B

$\beta$ 2M : Béta-2-Microglobuline

BMP : Bone Morphogenic Protein

BMU : Basic Multicellular Unit

BSA : Bovin Serum Albumin

BSP : Bone SialoProtein

### C

Ca<sup>2+</sup> : ion Calcium

Cbfa1 : Core binding factor alpha 1

CD : Cluster de Différenciation

CIJG : Communication Intercellulaire par Jonction Gap

CIP : Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases

Cl<sup>-</sup> : ion Chlorure

CMTX : maladie de Charcot-Marie-Tooth liée au chromosome X

CO<sub>2</sub> : Dioxygène

CRE : cAMP Responsive Element

Ct: Cycle Threshold

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

Cx: Connexine

CXCR4 : C-X-C chemokine Receptor 4

CxRE : Connexin Response Element

Ⓓ

Da: Dalton

DC-STAMP: Dendritic Cell Specific TransMembrane Protein

DHT: DiHydroTestostérone

DiIC<sub>18</sub>(3): 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

DKK1: Dickkopf-related protein 1

Dlx-5: Distal-less homeobox 5

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

dNTP: désoxy Nucléotide TriPhosphate

DO: Densité Optique

DTT: DiThioThreitol

Ⓔ

ECL: Enhanced ChemiLuminescence

EDTA: EthyleneDiamine Tetraacetic Acid

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epithelial Mesenchymal Transition

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

ESL-1: E-Selectin Ligand 1

ET-1: Endothéline 1

Ⓕ

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFBP1: Fibroblast Growth factor Binding Protein 1

FITC: Fluorescein IsoThioCyanate

Ⓖ

g: gravité

GAPDH: GlycérAldéhyde 3-Phosphate DéHydrogénase

Gap-FRAP: Gap Fluorescence Recovery After Photobleaching

GDF15: Growth/Differentiation Factor 15

GFP: Green Fluorescent Protein

GMPc: Guanosine MonoPhosphate cyclique

GTP: Guanosine TriPhosphate

## H

h: heure

hCG: Human Chorionic Gonadotropin

HEK: Human Embryonic Kidney

HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique

HIF-1: Hipoxia Inductible Factor 1

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

## I

IGF: Insuline-like Growth Factor

IL: Interleukine

INF $\gamma$ : Interféron gamma

Inx: Innexine

IP3: Inositol 1,4,5-triPhosphate

## K

K<sup>+</sup>: ion potassium

KCl: Chlorure de potassium

kDa: kiloDalton

KO: Knock Out

## L

LNCaP: Lymph Node Cancer Prostate

LTR: Long Terminal Repeat

## M

MAGUK: Membrane-Associated GUanylate Kinase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor

MDP: Méthylène DiPhosphate

$\mu$ g: microgramme

$\mu$ L: microLitre

$\mu$ m: micromètre

Mg : Magnésium

mg: milligramme  
miRNA : microRNA  
mL : milliLitre  
mm: millimètre  
mM : milliMolaire  
min : minute  
MMP: Matrix MétalloProtéinase  
Msx2: Homeobox msh like 2

**N**

Na<sup>+</sup> : ion sodium  
NaCl : Chlorure de sodium  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Monosodium phosphate  
nM : nanoMolaire  
NOG: Noggin  
NOV: Nephroblastoma overexpressed

**O**

OCN : OstéoCalciNe  
ODDD : OculoDentoDigital Displasia  
OPG : OstéoProtéGérine  
OPN : OstéoPontine

**P**

PAL : Phosphatase ALcaline  
Panx : Pannexine  
PAR-1 : Protease-Activated Receptor 1  
PBS: Phosphate Buffer Saline  
PC-3: Prostate Cancer 3  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PDGF: Platelet-Derivated Growth Factor  
PDZ : PSD-95, disc-large et ZO-1  
PET : PolyEthylene Terephthalate  
PGE2 : Prostaglandine 2  
PKA : Protéine Kinase A  
PKC : Protéine Kinase C

PLAT: Tissu type PLasminogene Activator  
PLAU: Urokinase type PLasminogene Activator  
PSA : Prostate Specific Antigen  
PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1  
PTH : ParaTHormone  
PTHrP : ParaThyroid-Hormone-related Peptide

## R

RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor NF-kB Ligand  
RB: Retinoblastoma Protein  
RE: Réticulum Endoplasmique  
RIPA: RadioImmunoPrecipitation Assay  
RT-qPCR: Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction

## S

SDF-1: Stromal cell-Derivated Factor 1  
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
sec: secondes  
SIBLING: Small Integrin Binding LIgand N-linked Glycoprotein  
siRNA: small interference RNA  
Skp2: S-phase Kinase associated Protein 2  
SP-1: Specific Protein 1  
SP-3: Specific Protein 3  
SPECT-CT: Single Photon Emission Computed Tomography- X ray Computed Tomography  
Src: Sarcoma Tyrosine kinase  
SVF: Sérum de Veau Foetal

## T

TBS : Tris Buffer Saline  
Tc : Technétium  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor béta  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRAMP: Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate  
TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase  
TSP1: ThromboSPondine 1

U

UNG: Uracil N-Glycosylase

uPA: Urokinase-type Plasminogen Activator

UTR: UnTranslated Region

V

V: Volt

VDR: Vitamin D Receptor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Z

ZO: Zonula Occludens

*Historique*

# Historique

## **I. Chapitre 1 : Connexines et communication intercellulaire jonctionnelle.**

### **1. Les connexines : une famille multigénique.**

#### ***1.1. Historique.***

En 1936, Hober a été le premier à émettre l'hypothèse de l'existence de canaux intercellulaires, permettant le passage de molécules hydrophiles de part et d'autre de la membrane plasmique (Hober, 1936). Mais, ce fut en 1952 que Weidmann a mis en évidence la présence de zones de moindre résistance électrique dans des cellules cardiaques (Weidmann, 1952). Par la suite, des études électrophysiologiques effectuées en 1959 par Furshpan et Potter ont permis de découvrir la présence de synapses électriques impliquées dans la transmission de signaux électriques chez les crustacés (Furshpan, 1959). Quelques années plus tard, des études en microscopie électronique ont montré que ces zones de faible résistance électrique correspondaient à des zones d'apposition membranaire. La présence d'autres transferts membranaires de même nature dans différents tissus non excitables a été également démontrée dans des epithelia (Loewenstein et al., 1965) ou dans le foie de souris. Mais ce n'est qu'en 1967 que les structures impliquées dans ces phénomènes ont été identifiées grâce à l'observation de coupes ultrafines de myocarde de souris mettant en évidence la présence d'un espace extracellulaire de 2 à 3 nm compris entre les deux membranes plasmiques d'où le terme de Gap Junction ou Jonction Gap (gap signifiant espace) (Revel and Karnovsky, 1967).

Ce n'est qu'en 1975 que le terme de jonction communicante émergea en référence à la fonction de ces structures (Simionescu et al., 1975).

#### ***1.2. Nomenclature.***

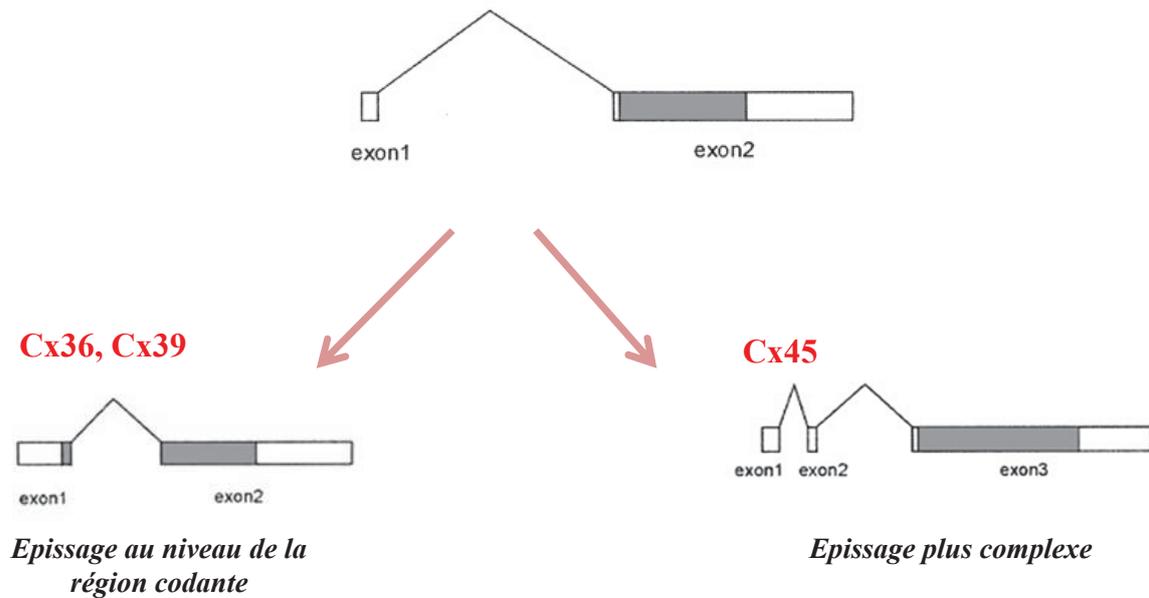
En 1986, la première séquence codante de connexine (Cx) a été identifiée. Il s'agit alors de la séquence d'une connexine présente dans le foie murin (Kumar and Gilula, 1986) et

Souris			Humain		
<i>Connexine</i>	<i>Masse moléculaire (kDa)</i>	<i>Classe</i>	<i>Connexine</i>	<i>Masse moléculaire</i>	<i>Classe</i>
			hCx25	25,892	N.D
mCx26	26,411	$\beta$	hCx26	26,200	$\beta$
mCx29	28,981	N.D	hCx30,2	30,313	
mCx30	30,366	$\beta$	hCx30	30,396	$\beta$
mCx30,3	30,388	$\beta$	hCx30,3	30,419	$\beta$
mCx31	30,901	$\beta$	hCx31	30,817	$\beta$
mCx31,1	31,394	$\beta$	hCx31,1	31,088	$\beta$
mCx30,2	30,219	$\beta$	hCx31,9	31,933	$\beta$
mCx32	32,003	$\beta$	hCx32	32,024	$\beta$
mCx33	32,860	$\alpha$			
mCx36	36,085	N.D	hCx36	36,248	N.D
mCx37	37,596	$\alpha$	hCx37	37,413	
mpCx40	40,413	$\alpha$	hCx40	40,380	
mCx39	39,996	N.D	hCx40,1	40,140	N.D
mCx43	43,004	$\alpha$	hCx43	43,008	$\alpha$
mCx45	45,665	$\gamma$	hCx45	45,482	$\gamma$
mCx43	46,302	$\alpha$	hCx46	46,655	$\alpha$
mCx47	46,603		hCx47	47,427	
mCx50	49,597	$\alpha$	hCx50	48,173	$\alpha$
			hCx58	58,842	N.D
mCx57	57,114	$\alpha$	hCx62	61,871	$\alpha$

(Modifié d'après Willecke et al., 2002)

**Tableau 1 : Comparatif des connexines murines et humaines.**

**Structure classique d'un gène codant  
pour les connexines**



(Modifiée d'après Söhl et Willecke., 2003)

Figure 1 : Exemple de mécanismes d'épissage alternatif de gènes de connexines, cas du gène de la Cx36, de la Cx39 et de la Cx45.

humain (Paul, 1986). Puis, rapidement, d'autres connexines sont isolées dans le cœur de rongeur ou dans le foie.

Devant la découverte de nombreuses connexines, dans le but de les distinguer, une nomenclature est imposée. Pour cela, la nomenclature utilisée fait référence à la masse moléculaire prédite à partir de l'ADNc précédée du préfixe Cx. Ainsi, la première connexine découverte dans le foie de souris a été nommée Cx32 (32 kDa) alors que la seconde est la Cx26 (26 kDa). Concernant celle découverte dans le cœur, elle prend le nom de Cx43 (43 kDa).

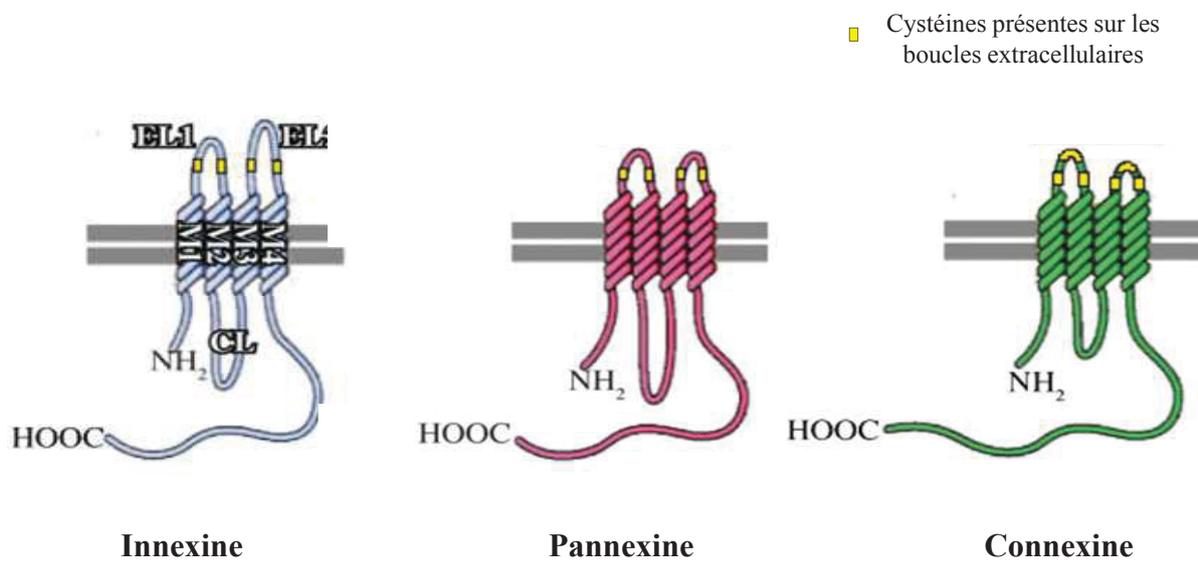
Si des connexines présentent des masses moléculaires très voisines, la différence entre elles va se faire par l'ajout d'un chiffre décimal. De plus, la discrimination entre des connexines homologues entre espèces va être réalisée par l'ajout en préfixe de la lettre correspondant à l'espèce.

Une autre nomenclature, moins utilisée, repose sur la phylogénie des connexines. En effet, des analyses de structure des gènes codant pour les connexines ont mis en évidence de fortes similitudes. Les connexines dériveraient d'une seule séquence originale, ayant subi des duplications amenant à l'apparition de trois sous-groupes nommés  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Dans cette nomenclature, chaque connexine est représentée par Cx suivi de la sous-classe et du numéro d'ordre de découverte. Par exemple la Cx32, découverte la première et appartenant au sous-groupe  $\beta$ , sera nommée Cx  $\beta$ 1 (Tableau 1).

De ce fait, les connexines appartiennent à une famille multigénique de vingt et un membres chez l'Homme. La plupart des gènes codant les connexines montrent une structure similaire présentant environ 40% d'homologie entre eux : un premier exon contenant l'extrémité 5' non traduite (5' UTR) suivi d'un intron de longueur variable et enfin un exon contenant le reste de la partie 5' UTR, la séquence codante ainsi que l'extrémité 3'UTR. Il existe quelques exceptions correspondant, par exemple, à différentes régions 5' UTR qui peuvent être épissées ou à la région codante qui peut être interrompue par des introns notamment pour la Cx36 ou encore la Cx45 (Condorelli et al., 1998; Sohl and Willecke, 2003) (Figure 1).

### ***1.3. Les autres membres apparentés.***

Pendant longtemps, la structure et la fonction des jonctions communicantes n'ont été étudiées que chez les vertébrés. Hors, il s'avère que des structures analogues sont présentes



(D'après D'hondt et al., 2009)

**Figure 2 : Représentation schématique de la structure des innexines, des pannexines et des connexines avec la localisation des cystéines au niveau des boucles extracellulaires.**

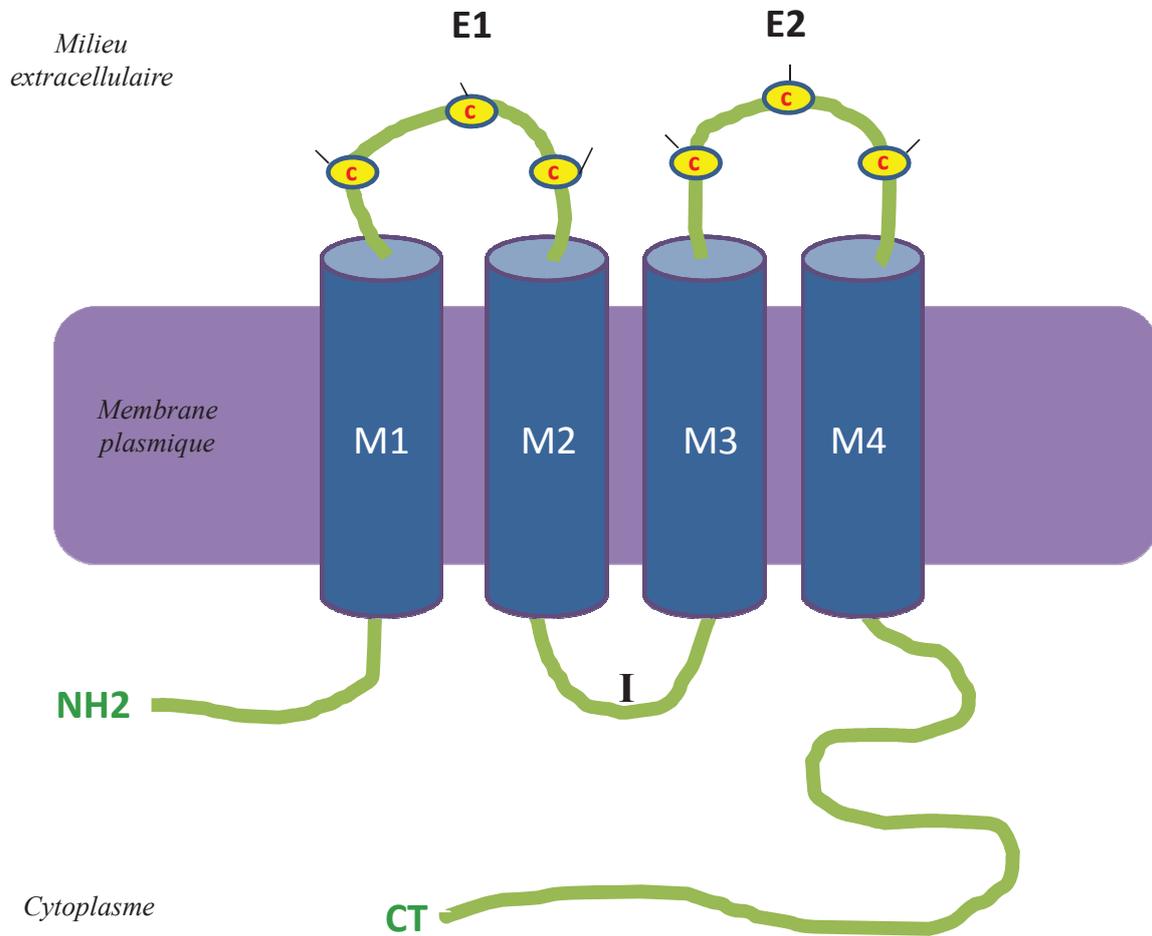
EL1: boucle extracellulaire 1; EL2: boucle extracellulaire 2; CL: boucle intracellulaire

également chez les invertébrés et sont dénommées innexines (Inx) pour rappeler leur distribution (**i**nvertébrés) et leur rôle dans la communication intercellulaire analogue à celui des connexines des vertébrés.

Les premières innexines ont été mises en évidence chez la drosophile (26 gènes) et *Caenorhabditis elegans* (8 gènes) (Curtin et al., 1999; Phelan et al., 1998) et sont également présentes chez d'autres invertébrés (Phelan and Starich, 2001). Certaines d'entre elles auraient la capacité de former des jonctions communicantes comme par exemple Inx1, Inx2 (Stebbing et al., 2000) qui participeraient à la morphogénèse des tissus épithéliaux chez la drosophile (Phelan, 2005).

Il existe des homologues d'innexines dans le génome des vertébrés nommées pannexines (Pan) (Baranova et al., 2004; Panchin et al., 2000). Trois gènes humains *panx1*, *panx2* et *panx3* ont été identifiés. Bien qu'il n'y ait pas de similarité de séquences en acides aminés entre les innexines/pannexines et les connexines, elles possèdent la même structure (Figure 2). En effet, chacune possède quatre domaines transmembranaires avec des domaines N- et C-terminaux intracellulaires. Mais les innexines et les pannexines diffèrent des connexines notamment par le nombre de cystéines présentes au niveau des boucles extracellulaires. En effet, les connexines en possèdent trois alors que les innexines et les pannexines en ont deux. Elles ont également la capacité de former des innexons/pannexons, hexamères d'innexines/pannexines, pour générer la formation de la jonction communicante et des héli-canaux.

Concernant les pannexines, il s'est avéré que la Panx2 est généralement localisée dans le système nerveux central (Penuela et al., 2008) et favoriserait la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones (Swayne et al., 2010) alors que la Panx1 est ubiquitaire. La fonctionnalité de la Panx1 a été testée sur des ovocytes de Xénope mettant en évidence une conductance plus faible que celle des connexines (Bruzzone et al., 2003). Elle exercerait un rôle de suppresseur de tumeur, notamment dans les cellules de gliomes de rat C6 (Lai et al., 2007). Récemment, il a été montré que la Panx1 pourrait être exprimée par les myocytes cardiaques et la formation des jonctions communicantes serait activée par la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique (Billaud et al., 2011; Kienitz et al., 2011). Quant à la Panx3, elle aurait un rôle dans les processus de différenciation des chondrocytes, des



**Figure 3 : Topologie d'une connexine.**

Les domaines N et C terminaux sont localisés dans le cytoplasme. Une boucle intracellulaire I ainsi que les deux boucles extracellulaire E1 et E2 font la liaison entre les 4 domaines transmembranaires. Sur chaque boucle extracellulaire, 3 cystéines sont présentes, permettant la formation de pont disulfure.

kératinocytes ou encore des ostéoblastes (Bond et al., 2011; Celetti et al., 2010; Iwamoto et al., 2010).

Les connexines, les innexines ainsi que les pannexines appartiennent donc à une super-famille.

## **2. Topologie des Connexines.**

A partir de 1987, l'organisation topologique des connexines a commencé à être étudiée par l'utilisation de techniques biochimiques combinant des protéolyses limitées et des anticorps dirigés contre les cibles spécifiques (Zimmer et al., 1987). Grâce à cette approche, différentes études ont pu être effectuées sur d'autres types de connexines comme la Cx26, la Cx43 ou la Cx32 (Goodenough et al., 1988; Milks et al., 1988; Zhang and Nicholson, 1994). Ceci a permis de mettre en évidence que toutes les connexines présentaient une topologie commune avec des domaines plus ou moins conservés (Figure 3) :

- Tout d'abord, elles sont caractérisées par quatre domaines transmembranaires hydrophobes fortement conservés, avec une conformation en hélice- $\alpha$  correspondant à M1, M2, M3 et M4 et formés de vingt acides aminés. Par l'analyse de la séquence protéique, il s'avère que le domaine transmembranaire M3 semble former le pore lorsque les connexines s'assemblent entre elles. En effet, ce domaine possède de nombreux aminés hydrophiles qui formeraient la lumière du pore (Milks et al., 1988).
- Les séquences amino- et carboxy terminales sont intracellulaires. Les extrémités NH<sub>2</sub> présentent des séquences très conservées avec approximativement vingt acides aminés alors que les domaines C-terminaux diffèrent en séquence et en longueur, ce qui explique les variations de poids moléculaire des différentes connexines. La Cx43, par exemple, possède cent cinquante six acides aminés alors que la Cx26 ne possède que seize acides aminés (Evans et al., 2006). La partie C-terminale est également le site potentiel de nombreuses phosphorylations (Saez et al., 1998) comme il a été montré pour la Cx43 (Laird et al., 1991; Musil et al., 1990), la Cx26 faisant figure d'exception.
- Elles possèdent également deux boucles extracellulaires nommées E1 et E2 possédant respectivement trente et un et trente quatre acides aminés ainsi qu'une boucle intracellulaire I, très conservées. Chaque boucle extracellulaire possède

<b>Connexine</b>	<b>Localisation dans les différents tissus</b>
Cx23	Pas exprimé
Cx25	Génome humain
Cx26	Glande mammaire, peau, cochlée, foie, endomètre, cellule gliale, épithélium respiratoire, tubules séminifères, pancréas
Cx30	Peau, cerveau, cochlée, épithélium respiratoire, glande exocrine
Cx31,3	Oligodendrocytes, muscle squelettique, foie, pancréas, rein
Cx30,3	Peau
Cx31	Peau, épithélium respiratoire, cochlée, placenta
Cx31,1	Peau
Cx31,9	Cerveau, cœur
Cx32	Foie, peau, cellules de schwann, oligodendrocytes, endomètre, cellules glandulaires
Cx33	Testicule
Cx36	Rétine, cellules bêta pancréatiques, neurones du système nerveux central
Cx37	Muscle lisse vasculaire, endothélium, ovaires, peau
Cx40	Peau, système nerveux, endothélium, cœur
Cx40,1	Localisé dans aucun tissu (juste présent dans le génome humain)
Cx43	Connexine la plus exprimée, présentes dans 34 tissus différents et 46 types cellulaires: blastocystes, peau, cornée, fibroblastes, ostéoblastes, reins, glandes mammaires, cellules musculaires cardiaques, cellules épithéliales pulmonaires, kératinocytes, hypophyse antérieure, parathyroïdes, thyroïde, pancréas, surrénales, testicules, ovaires, myomètre, muscle lisse, cellules endothéliales, cristallin, astrocytes, cellules épithéliales rénales tubulaires, macrophages, tissu conjonctif, placenta
Cx45	Cellules épithéliales pancréatiques, cœur, neurone, oligodendrocytes, astrocytes, système vasculaire, peau, ostéoblastes, rétine, utérus
Cx46	Cristallin, épithélium alvéolaire
Cx47	Cerveau, moelle épinière, oligodendrocytes
Cx50	Cristallin
Cx58	Localisé dans aucun tissu (juste présent dans le génome humain)
Cx62	Cellules horizontales de la rétine

(Modifié d'après Rackauskas et al., 2010)

**Tableau 2 : Distribution tissulaire des connexines chez l'Homme.**

trois cystéines, localisées dans des séquences pratiquement invariables, responsables de la formation de ponts disulfures interboucles et intracaténaïres (Dupont et al., 1989; John and Revel, 1991; Rahman et al., 1993).

Jusqu'à aujourd'hui, aucune connexine découverte n'a fait exception concernant son organisation topologique.

### **3. Distribution tissulaire.**

Les connexines sont exprimées dans tous les tissus, exceptés dans le muscle squelettique adulte, les érythrocytes et les spermatozoïdes matures. Certaines connexines ont une répartition étendue alors que d'autres sont restreintes à un ou deux tissus. Comme exemple, la Cx30.3 n'est présente qu'au niveau de la peau ou la Cx33 exprimée seulement dans les testicules, alors que la Cx26 ou la Cx45 ont des répartitions plus larges. La connexine exprimée de manière ubiquitaire est la Cx43 qui est présente dans 34 tissus et 46 types cellulaires (Tableau 2).

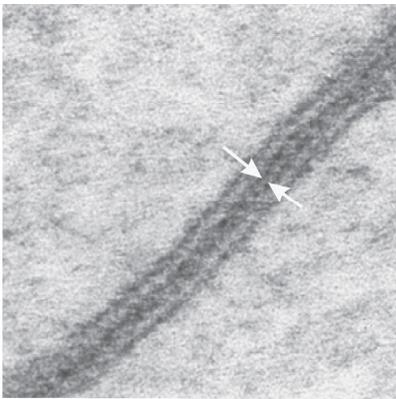
Il s'avère également qu'un même tissu puisse exprimer plusieurs types de connexines localisées dans la même plaque jonctionnelle, c'est le cas pour les hépatocytes qui expriment la Cx26 et la Cx32 (Nicholson et al., 1987) ou dans des plaques jonctionnelles distinctes comme la Cx32 et la Cx43 au niveau des thyrocytes (Guerrier et al., 1995). De plus, il peut exister un profil d'expression spatio-temporelle des connexines dans un même tissu ou type cellulaire. Par exemple, il a été montré que la Cx40 était fortement exprimée durant la période fœtale dans le cœur des souris avec une diminution d'expression après la naissance. Cette même connexine a également une variation d'expression entre le ventricule droit et le ventricule gauche (Van Kempen et al., 1996).

### **4. Jonctions communicantes.**

#### ***4.1. Structure du canal jonctionnel.***

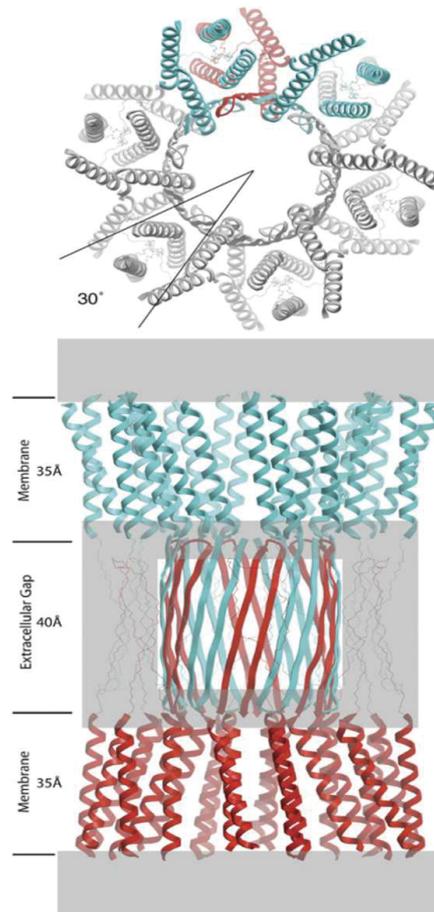
Les jonctions communicantes permettent l'échange intercellulaire de molécules de taille inférieure à 1 kDa telles que des nutriments, des métabolites, des ions, des seconds messagers (Loewenstein, 1981). Cet échange se nomme Communication Intercellulaire par Jonctions Gap (CIJG). Des analyses de microscopie électronique et des études en diffraction

**A**



(D'après Goodenough et Paul, 2009)

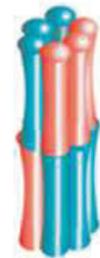
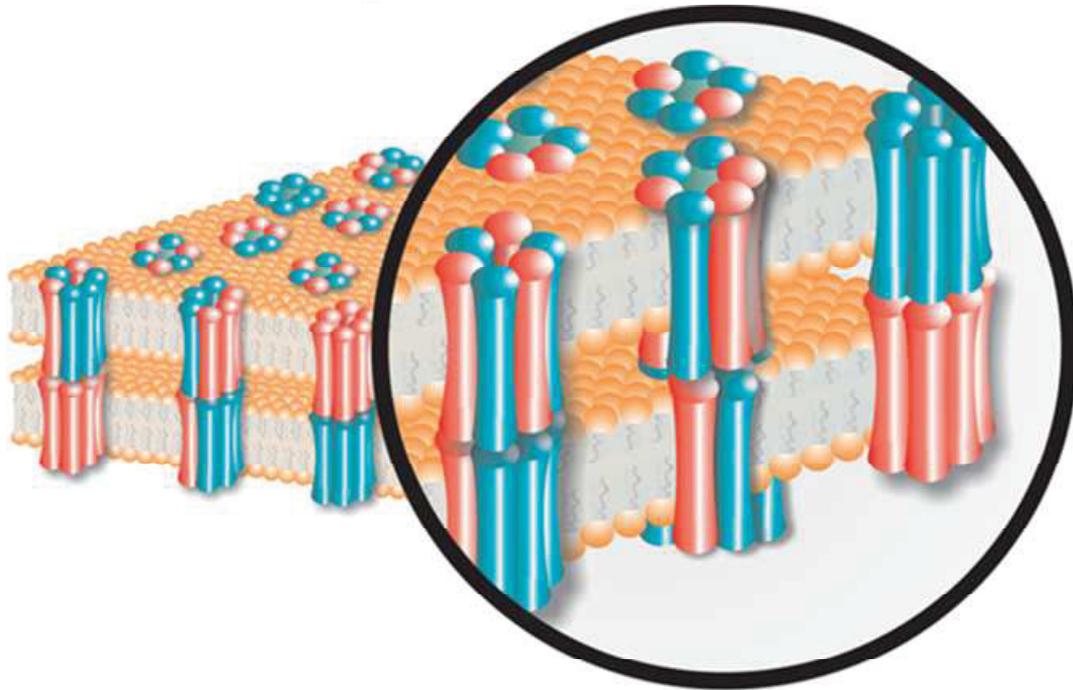
**B**



(D'après Yeager et Harris 2007)

#### Figure 4 : Structure du canal jonctionnel.

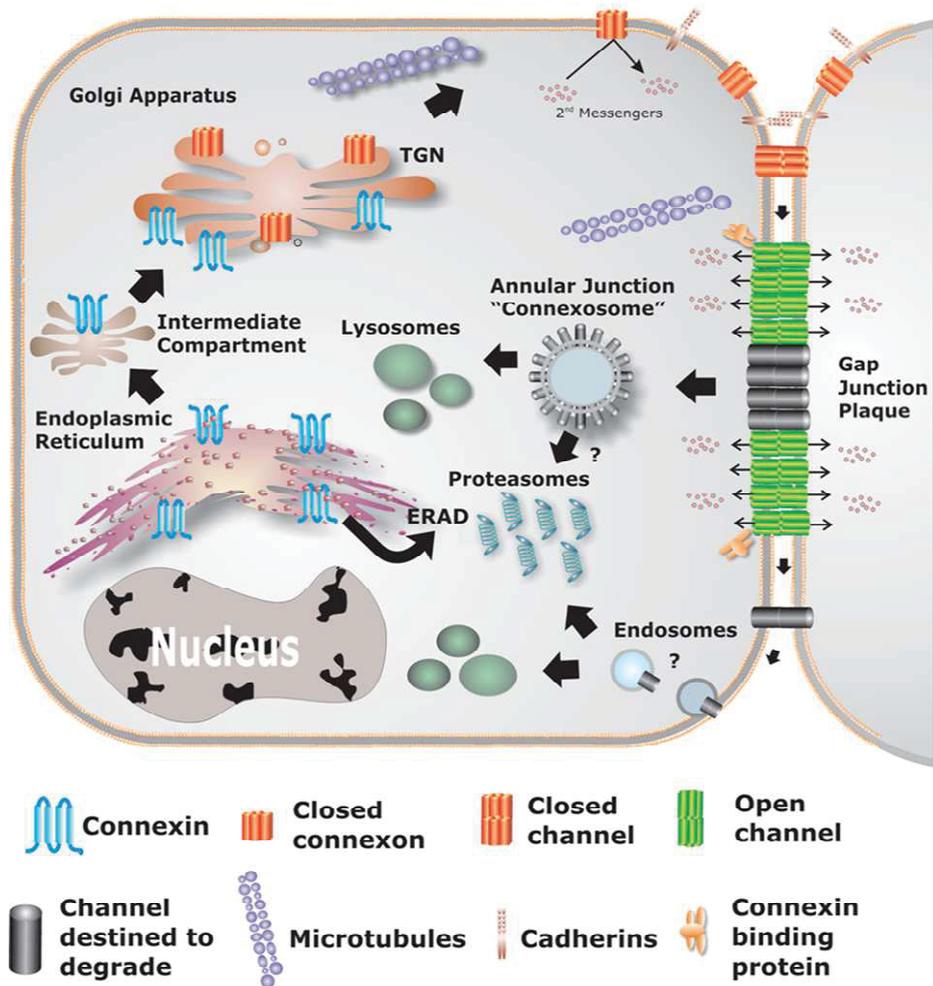
**A)** Structure d'une plaque jonctionnelle observée en microscopie électronique. **B)** Conception moléculaire des canaux jonctionnels. En haut, représentation permettant de visualiser la rotation à 30° entre deux connexons qui s'apparient. Deux sous-unités d'un connexon en bleu sont au-dessus d'une sous-unité de connexon en rouge. En bas, assemblage des deux connexons. Les zones grisées désignent des pièces de la structure qui sont les plus incertaines, en particulier l'organisation entre l'assemblage transmembranaire et l'espace extracellulaire.



<b>Connexon</b>	Homomérique	Homomérique	Hétéromérique
<b>Canal</b>	Homotypique	Hétérotypique	Hétérotypique

(Modifiée d'après Laird, 2006)

Figure 5 : Illustration des possibilités d'association des connexines au sein d'un connexon et des connexons au sein d'un canal jonctionnel.



(D'après Laird, 2006)

**Figure 6 : Le cycle de vie des connexines.**

Après avoir été traduites, les connexines sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Si elles sont correctement repliées, elles seront épargnées par le système de contrôle qualité ERAD (ER Associated Degradation) et l'oligomérisation pourra se terminer au sein du trans-Golgi. Des vésicules de transport pourront ensuite délivrer les connexons à la membrane *via* les microtubules. Puis, les connexons pourront fonctionner en tant qu'hémicanaux ou diffuser latéralement dans des sites spécifiques afin de s'apparier avec des connexons présents à la membrane plasmique de la cellule adjacente. Les nouveaux canaux jonctionnels seront localisés à la périphérie de la plaque jonctionnelle alors que les plus anciens seront au centre. Un fragment ou la totalité de la plaque jonctionnelle est ensuite internalisé dans une structure à double membrane appelée connexosome où la dégradation est effectuée dans les lysosomes ou dans les protéasomes.

optique ont permis de comprendre l'organisation structurale du canal jonctionnel (Unger et al., 1999; Yeager and Nicholson, 1996) (Figure 4). En effet, la formation de ces canaux est due à l'assemblage de six connexines d'une même cellule donnant naissance à un connexon. Deux cellules adjacentes vont former un canal jonctionnel par l'interaction de deux connexons. L'interaction optimale entre deux connexons est possible par un décalage de 30° d'un connexon par rapport à l'autre autour de l'axe central du canal (Perkins et al., 1998; Unger et al., 1997). De plus, l'appariement des connexons fait également intervenir les boucles extracellulaires E1 et E2 qui s'organisent en feuillets  $\beta$  antiparallèles de manière à délimiter le domaine intercellulaire (Foote et al., 1998) (Figure 4B).

#### ***4.2. Compatibilité entre connexines.***

L'assemblage de six connexines identiques génère un connexon homomérique alors qu'un connexon hétéromérique correspond à l'assemblage d'au moins deux connexines différentes. De même, l'assemblage de deux connexons identiques va correspondre à la formation de canaux jonctionnels homotypiques alors qu'un canal jonctionnel hétérotypique correspond à la formation de connexons différents (Kumar and Gilula, 1996) (Figure 5).

Différentes combinaisons peuvent être possibles, par exemple, l'interaction entre la Cx26 et la Cx32 dans le foie (Diez et al., 1999) ou la Cx43 et la Cx46 dans la rétine (Hoang et al., 2010). Il s'avère que la formation de canaux hétéromériques ou homomériques modifient la perméabilité sélective du canal. En effet, il a été montré que des canaux homomériques pour la Cx26 ou la Cx32 étaient moins perméables à l'AMPc que des canaux hétéromériques Cx26/Cx32 (Ayad et al., 2006).

Des études de co-expression de connexines dans des cellules de mammifères ou dans des ovocytes de Xénope ont permis d'approfondir les connaissances sur l'interaction entre les connexines. Il a été montré, par exemple, que la Cx43 ne forme pas de canaux hétéromériques avec la Cx26 (Gemel et al., 2004).

Il semble que les connexines aient la possibilité de s'associer lorsqu'elles appartiennent à la même sous classe (White et al., 1995).

#### ***4.3. Turn-over des connexines.***

Les connexines ont une demi-vie moyenne de 1.5 à 5 heures (Beardslee et al., 1998; Fallon and Goodenough, 1981; Laing and Beyer, 1995; Laird et al., 1991) et sont pré-programmées pour être continuellement synthétisées puis dégradées (Figure 6).

La majorité des connexines suivent la voie classique de sécrétion. En effet, elles sont traduites dans le réticulum endoplasmique et pour la majorité, l'oligomérisation y est effectuée (Ahmad et al., 1999; Falk et al., 1994). L'oligomérisation des connexines est un événement progressif commençant tout d'abord dans le réticulum endoplasmique, puis dans le compartiment intermédiaire (ERGIC), pour se terminer dans l'appareil de Golgi. Mais pour la Cx43 et la Cx46, elles ont été trouvées sous forme monomérique au niveau du trans-Golgi (Koval et al., 1997; Musil and Goodenough, 1993). Bien que les connexines ne soient pas glycosylées, il se pourrait qu'elles soient sous la protection de protéines chaperonnes jusqu'à ce qu'elles atteignent leur état stable et définitif. De plus, le fait qu'elles possèdent des cystéines au sein de leurs domaines extracellulaires suggèrent qu'elles soient sous la surveillance de protéines disulfides isomérases (John and Revel, 1991). Quant à la Cx26, elle semble emprunter une voie particulière et plus rapide. En effet, elle irait directement du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Ahmad and Evans, 2002; Zhang et al., 1996a).

Une fois sorties du réseau golgien, les connexines, oligomérisées sous forme de connexons, utiliseraient différentes voies de transport avant d'être acheminées à la membrane plasmique. Certaines études font ressortir le rôle des microtubules (Johnson et al., 2002; Thomas et al., 2001b) même si leur intervention n'est pas clairement définie. Une fois insérés dans la membrane plasmique, les connexons diffuseraient librement dans la bicouche lipidique avec l'aide de la N-cadhérine et la E-cadhérine, protéines jouant un rôle dans l'adhérence cellulaire (Govindarajan et al., 2010; Jongen et al., 1991; Meyer et al., 1992; Wei et al., 2005). Les connexons sont insérés dans la membrane sous forme d'hémicanaux et rencontrent au hasard un connexon d'une cellule voisine et diffusent sous forme de canal entier jusqu'à la zone jonctionnelle. Ceci a pu être mis en évidence grâce à l'utilisation de Cx-GFP qui ont permis de montrer la présence de connexines dans des zones non jonctionnelles (Gaietta et al., 2002; Li et al., 1996).

Il a été montré par l'utilisation de la Cx43 marquée par la GFP et la technique de gap-FRAP que les canaux jonctionnels nouvellement formés étaient localisés à la périphérie de la plaque jonctionnelle, alors que les plus anciens se situaient au centre (Lauf et al., 2002).

L'internalisation des jonctions communicantes a été très étudiée. Il a été montré tout d'abord par microscopie électronique la formation d'une structure vésiculaire à double membrane appelé jonction annulaire. Il a été proposé que cette vésicule possédait une partie

ou l'ensemble de la jonction communicante lors de l'internalisation (Archard and Denys, 1979; Marquart, 1977; Sasaki and Garant, 1986). Aujourd'hui le terme de jonction annulaire est remplacé par « connexosome ». En fait, par des études en immunogold et en immunofluorescence, il s'est avéré que cette structure originale était enrichie en connexines (Jordan et al., 2001; Murray et al., 1997; Nagy et al., 1997).

La dégradation des connexines et des jonctions communicantes semble suivre le même procédé que celui utilisé pour des protéines transmembranaires finissant leur parcours au niveau du lysosome. Mais, certaines études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de protéasomes ou des cellules déficientes en ubiquitine-E1 retardait la dégradation de la Cx43 (Laing and Beyer, 1995). Il semblerait que la Cx43 soit mono-ubiquitinylée, servant de signal d'internalisation contrairement à la poly-ubiquitinylation, permettant l'adressage directement au niveau du protéasome (Leithe and Rivedal, 2004). La dégradation des connexines peut donc faire intervenir deux systèmes. Celui faisant intervenir les lysosomes semble être la voie privilégiée pour les connexines présentes à la membrane plasmique alors que celui faisant intervenir les protéasomes participerait à la dégradation rapide des connexines déficientes présentes au niveau du réticulum endoplasmique (VanSlyke and Musil, 2005).

#### ***4.4. La perméabilité jonctionnelle.***

De nombreuses études ont montré que les propriétés de couplage des canaux jonctionnels variaient suivant le type de connexines exprimé par les cellules en contact. Toutes les connexines n'ont pas les mêmes niveaux de conductance et également le même type de régulation. L'utilisation de traceurs fluorescents a permis d'estimer un diamètre du pore qui serait compris entre 1.6 et 2 nm chez les mammifères et également de mettre en évidence que les canaux jonctionnels sont spécifiquement perméables à certaines molécules selon les connexines qui le composent. Ceci va donc dépendre de la taille, de la forme mais aussi de la charge des molécules concernées (Dermietzel et al., 1990; Elfgang et al., 1995; Loewenstein, 1981; Steinberg et al., 1994; Veenstra, 1996; Veenstra, 2001). En effet, il a été montré par exemple que les canaux formés de la Cx32 étaient plus perméables à l'adénosine qu'au glutamate ou que ceux formés de la Cx43 étaient plus perméables à l'ATP qu'au glutamate (Goldberg et al., 2002).

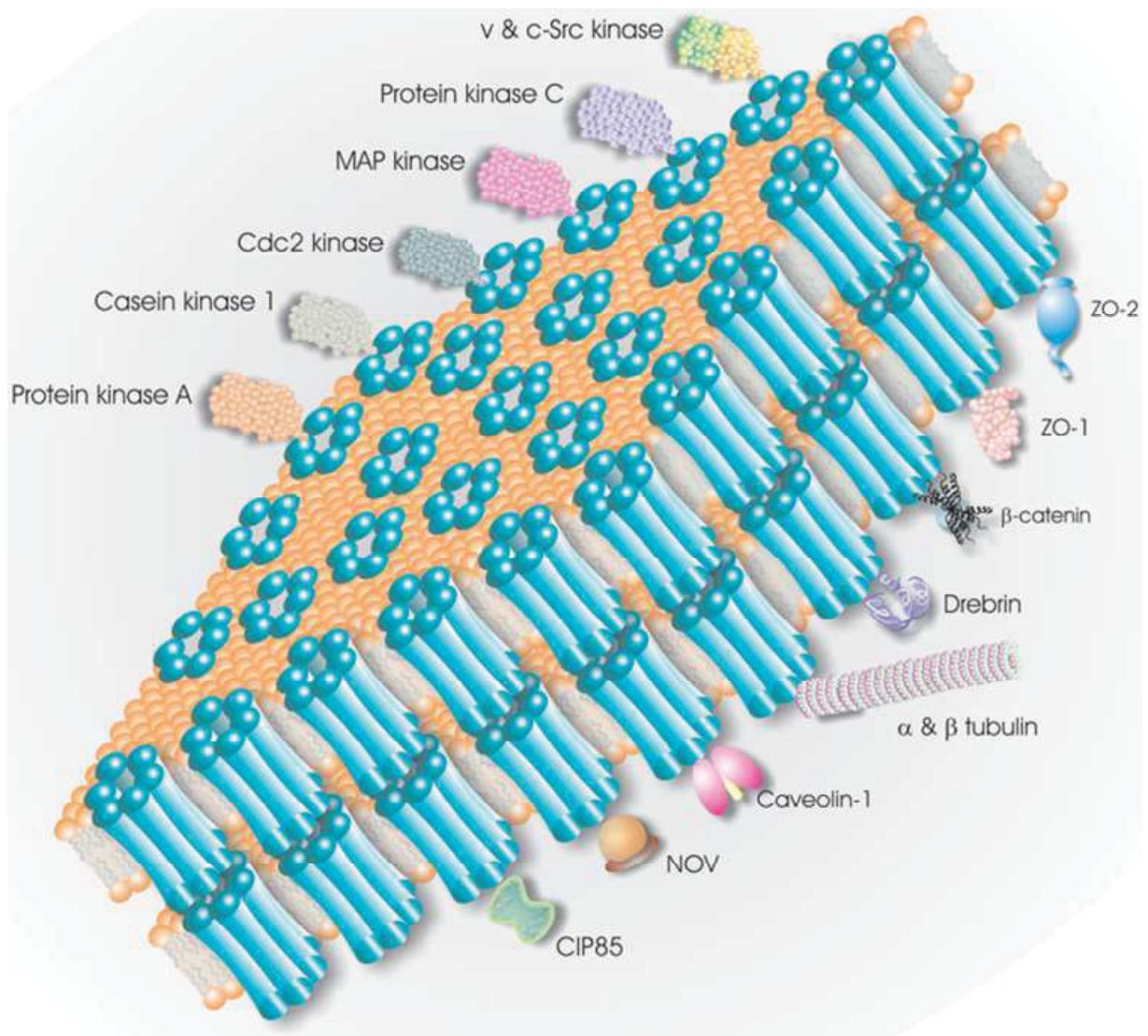
Donc, parmi les molécules hydrophiles capables de passer à travers les jonctions communicantes ayant des tailles inférieures à 1 kDa se trouvent les seconds messagers tels

que les nucléotides cycliques AMPc et GMPc mais également les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ . D'autres métabolites tels que les nucléotides ATP, ADP et GTP peuvent également y transiter (voir pour revue (Goodenough and Paul, 2009)). Il s'avère également que des siRNA ainsi que des miRNA peuvent passer au travers des jonctions communicantes (Lim et al., 2011; Wolvetang et al., 2007).

#### ***4.5. Partenaires protéiques des connexines.***

Les protéines partenaires des connexines peuvent jouer un rôle primordial dans la régulation de la communication intercellulaire et dans la stabilité des jonctions communicantes. De nombreuses protéines interagissent avec les connexines :

- Les protéines membranaires associées aux jonctions serrées telles que les occludines et les protéines appartenant à la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK) telles que ZO-1 et ZO-2. ZO-1 se lie à de nombreuses connexines telles que la Cx43, la Cx32, la Cx45, la Cx46, la Cx50 (Giepmans et al., 2001c; Kojima et al., 2001; Nielsen et al., 2003; Singh and Lampe, 2003) et participe à la stabilité des jonctions communicantes. De plus, certains domaines de ZO-1 pourraient permettre de faire le lien entre les connexines et certaines kinases et phosphatases. Les connexines pourraient se lier au domaine PDZ de ZO-1. En effet, si le domaine PDZ est muté, une diminution de l'interaction entre la Cx45 et ZO-1 est observée (Kausalya et al., 2001). ZO-1 interviendrait également dans l'adressage de la Cx43 à la membrane plasmique. En effet, le blocage de l'interaction ZO-1/Cx43 dans les cellules Hela et les cardiomyocytes modifie le turnover des jonctions communicantes (Hunter et al., 2005).
- Les protéines ayant un rôle dans l'adhérence des cellules : il s'avère que ces protéines, les caténines ainsi que la N-cadhérine et la E-cadhérine participeraient à la bonne conformation des jonctions communicantes. En effet, des cellules cancéreuses de l'utérus exprimant faiblement la E-cadhérine présentent une faible communication intercellulaire et la surexpression de la E-cadhérine augmente la présence de la Cx43 à la membrane co-localisée avec la E-cadhérine (Jongen et al., 1991). De plus, leur implication dans la transduction de signaux pourrait suggérer un rôle dans la régulation du couplage intercellulaire.



(D'après Laird, 2006)

**Figure 7 : Les différents partenaires de la Cx43 au niveau de son domaine C-terminal.**

NOV: Nephroblastoma OVerexpressed; CIP85: Connexin43 Interacting Protein 85

- Les enzymes : la majorité des connexines ont des domaines de phosphorylation au niveau de leur domaine C-terminal suggérant une interaction avec des protéines kinases. Les kinases v- et c-Src, PKC, PKA ainsi que les MAP kinases participent à la phosphorylation des connexines jouant ainsi un rôle dans l'état d'ouverture des canaux jonctionnels.
- D'autres protéines peuvent également se lier aux connexines : les cavéolines interagiraient avec la Cx43 au niveau des radeaux lipidiques (Schubert et al., 2002). Elles participeraient à l'adressage de la Cx43 à la membrane plasmique. Comme décrit précédemment les ubiquitines en se fixant aux connexines participeraient à la dégradation des jonctions communicantes. Enfin, dans les cellules cos-7, il a été montré que les  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubulines pourraient interagir avec l'extrémité carboxyle de la Cx43 tandis que les microtubules se fixeraient à un motif présent dans le quatrième domaine transmembranaire (Giepmans et al., 2001b; Giepmans et al., 2001c).

Dans ce paragraphe ont été citées de manière non exhaustive les protéines les plus connues interagissant avec les connexines. Les principales protéines partenaires de la Cx43 sont représentées dans la figure 7.

#### ***4.6. Régulation de la communication jonctionnelle.***

Aujourd'hui le nombre de facteurs connus pour modifier la CIJG est très vaste. Cette régulation peut se faire à différents niveaux, transcriptionnels, traductionnels, post-traductionnels ou directement sur l'ouverture des canaux jonctionnels.

##### ***4.6.1. Régulation de l'expression des connexines.***

La majorité des connexines possèdent dans la structure de leur gène un promoteur P1 localisé à 300 paires de bases environ de l'exon1. A l'intérieur de cette région existent de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription qui varient en fonction du modèle cellulaire et du type de connexines étudié. SP1 est un facteur de transcription important pour la régulation de la transcription de nombreux gènes codant pour des connexines, telles que la Cx26, la Cx32, la Cx40 et la Cx43 (Bai et al., 1993; Echetebeu et al., 1999; Teunissen et al., 2002; Tu et al., 1998). Concernant le gène codant pour la Cx43, il existe quatre sites possibles de fixation pour SP1 et SP3 (Teunissen et al., 2003). Un autre

facteur classique de transcription AP-1, composé de deux protéines jun et fos, peut également influencer la transcription des gènes codant pour les connexines. Un ou plusieurs sites de fixation pour ce facteur ont été identifiés dans le gène codant pour la Cx43 chez l'Homme, la souris et le rat (Oyamada et al., 2005). Il a été montré qu'AP-1 permettait d'augmenter notamment l'expression de la Cx43 des cellules musculaires lisses utérines (Geimonen et al., 1996).

D'autres facteurs peuvent évidemment moduler l'expression des connexines. L'AMPc est connu pour moduler la CIJG mais également la formation des jonctions communicantes. Elle permet une redistribution rapide de la Cx43 dans la membrane cellulaire mais également de stimuler l'expression de gène codant pour la Cx43. En effet, l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) en augmentant les taux intracellulaires d'AMPc, induit l'expression de cette même connexine dans les cytotrophoblastes (Cronier et al., 1994; Cronier et al., 1997). De plus, elle induit la transcription du gène codant la Cx43 dans des cellules d'hépatomes (Mehta et al., 1992).

Des hormones modulent également l'expression des gènes de connexines. En effet, des études ont montré une augmentation des taux d'ARNm et du niveau de protéines codant pour la Cx43 dans l'utérus avant la parturition. Le gène de la Cx43 dans le myomètre est sous le contrôle des hormones stéroïdiennes : les œstrogènes augmentent son expression alors que la progestérone la diminue (Petrocelli and Lye, 1993). De plus, les hormones thyroïdiennes ainsi que la PTH (ParaTHormone) sont capables d'augmenter le niveau d'expression de la Cx43. La PTH induit également une augmentation de l'activité du promoteur de la Cx43 dans des lignées cellulaires d'ostéosarcomes de rat (Mitchell and Lye, 2001). Néanmoins, il apparaît que le gène codant la Cx43 possède dans la partie proximale de son promoteur la séquence CRE (cAMP Responsive Element) où l'AMPc peut se fixer pour activer l'expression de gènes sous l'effet, par exemple, de la PTH ou des prostaglandines (Civitelli et al., 1994; Civitelli et al., 1998; Yu et al., 1994).

Le contrôle transcriptionnel apparaît donc être un facteur important pour réguler l'expression des connexines.

#### 4.6.2. Modulation de l'état d'ouverture des canaux jonctionnels.

##### 4.6.2.1. *La sensibilité au calcium.*

La fermeture des canaux par les ions calciques joue un rôle important dans la protection des cellules lors des dépolarisations membranaires. La sensibilité des jonctions communicantes varie en fonction du type de connexines et également du type cellulaire. Les connexons peuvent laisser transiter cet ion lorsque les concentrations ne dépassent pas 200 nM mais lorsque les valeurs sont supérieures, cela induit une fermeture des canaux (Cotrina et al., 1998; Peracchia, 2004). Un effet direct de cet ion sur les connexines supposerait l'existence de sites spécifiques de très hautes affinités pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Mais certaines études suggèrent, par l'utilisation de bloqueurs, l'implication de la calmoduline, protéine liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur cette protéine entraînant un changement de conformation lui permettant par la suite de se lier aux canaux. Une telle interaction a été démontrée pour de nombreuses connexines telles que la Cx43, la Cx37 (Sotkis et al., 2001) la Cx38, la Cx32, la Cx44 et la Cx50 (Peracchia et al., 1996; Peracchia et al., 2000; Zhang et al., 2006).

##### 4.6.2.2. *L'effet du voltage.*

La sensibilité au voltage est particulièrement importante pour le couplage intercellulaire entre les cellules excitables. La conductance jonctionnelle peut être sensible au potentiel de membrane ou au potentiel transjonctionnel correspondant à la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane jonctionnelle. Les canaux formés de Cx43 sont relativement moins sensibles au changement de voltage, à la différence des canaux constitués de la Cx45. Des études menées sur la Cx26 et la Cx32 ont montré que les acides aminés de la partie N-terminale déterminent l'ouverture du canal. Ainsi pour la Cx43 ou la Cx45, les canaux se ferment pour des potentiels négatifs, à l'inverse de la Cx26 ou la Cx30 qui se ferment pour des valeurs positives (Rackauskas et al., 2010).

##### 4.6.2.3. *L'effet du pH.*

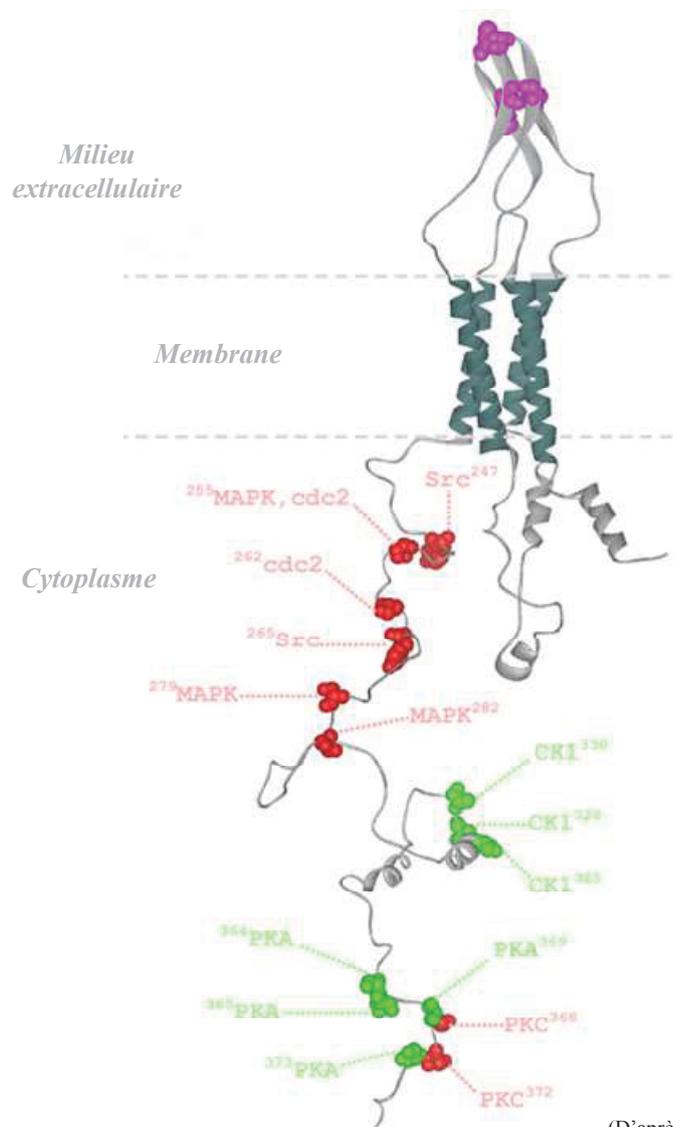
L'acidification du milieu intracellulaire diminue la communication par les jonctions communicantes mais la sensibilité au pH intracellulaire varie d'une connexine à l'autre. En effet, la Cx43 et la Cx32 sont moins sensibles au pH intracellulaire que la Cx50 et la Cx57. Après surexpression de la Cx32 dans l'ovocyte de Xénope, un pH de 6.5 est nécessaire pour

faire baisser sa conductance de 50% tandis que pour la Cx50, un pH de 7.2 suffit (Liu et al., 1993; Palacios-Prado et al., 2009). La protonation directe ou indirecte des canaux reste encore à être élucidée. En effet, quelques études seulement montrent un effet direct des protons sur la fermeture des canaux jonctionnels. Une fermeture des canaux formés de la Cx46 exprimés dans des ovocytes de Xénope est observée rapidement après une exposition à des pH acides (Trexler et al., 1999). Mais la plupart des études concluent que les protons affecteraient l'ouverture des canaux indirectement par protonation d'intermédiaires tel que la taurine (Harris, 2001; Morley et al., 1996).

#### *4.6.2.4. L'état de la phosphorylation.*

La plupart des connexines sont des phosphoprotéines hormis la Cx26 qui possède un domaine C-terminal trop court. Il est possible d'identifier un grand nombre de sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases, comme le plus souvent sur la partie C-terminale qui contient de multiples résidus thréonine, tyrosine et sérine. L'activation des protéines kinases ou phosphatases modifie la communication cellulaire en modulant le temps moyen d'ouverture du canal ainsi que sa probabilité d'ouverture. De plus, la phosphorylation modifie la charge nette de la partie C-terminale qui à son tour peut moduler la sensibilité du canal au voltage et au pH (Rackauskas et al., 2010). Ainsi, l'activation de la PKA augmente l'insertion de la Cx43 à la membrane plasmique alors que la phosphorylation par la PKC ou les MAP kinases activent son internalisation (Lampe and Lau, 2000; TenBroek et al., 2001). La phosphorylation des connexines par la PKA est souvent associée à une activation du canal contrairement à la phosphorylation par la PKC. La PKA étant une enzyme régulée par l'AMPc, une augmentation des taux d'AMPc conduit à une augmentation de la CIJG pour la Cx35, la Cx36 (Kothmann et al., 2007), la Cx43 (Atkinson et al., 1995; Matsumura et al., 2006; Ponsioen et al., 2007; TenBroek et al., 2001) et la Cx50 (Liu et al., 2011). La diminution de la CIJG suite à la phosphorylation par la PKC a été montré pour la Cx32, la Cx26, la Cx40 et la Cx43 ; (voir pour revue : (Goodenough and Paul, 2009)).

D'autres protéines kinases peuvent également moduler l'activité des connexines. Ainsi, la phosphorylation de la Cx43 par la tyrosine kinase Src inhibe l'interaction entre la Cx43 et ZO-1 dans des cardiomyocytes amenant à une diminution de la communication jonctionnelle (Toyofuku et al., 2001).



(D'après Pahuja, 2007)

**Figure 8 : Les différents sites de phosphorylation de la partie C-terminale de la Cx43.**

Les sites de phosphorylation marqués en vert permettent une augmentation de la communication jonctionnelle alors que les sites de phosphorylation, marqués en rouge, diminuent la communication jonctionnelle.

Les kinases c- et v-Src sont associées à une diminution de la communication intercellulaire lorsqu'elles phosphorylent la Cx43 (Filson et al., 1990; Giepmans et al., 2001a; Loo et al., 1995; Toyofuku et al., 1999). De plus, l'activation de la voie des MAP kinases par divers facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor) conduit à une interruption de la communication intercellulaire par phosphorylation de la Cx43 alors que l'activation de Rhoa accroît la communication jonctionnelle médiée également par la Cx43 (Derangeon et al., 2008; Saez et al., 2005). Enfin, les kinases dépendantes des cyclines ainsi que les récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase peuvent elles aussi phosphoryler les connexines; (voir pour revue :Lampe and Lau, 2004). Les principaux sites de phosphorylation de la Cx43 sur son domaine C-terminal sont représentés figure 8.

## **5. Fonction physiologique de la communication jonctionnelle.**

La diversité des connexines ainsi que leur répartition dans l'organisme et la variété de leur régulation suggèrent qu'elles participent à des fonctions physiologiques très variées. En effet, dans les tissus excitables, les jonctions communicantes par l'échange d'ions participent à la synchronisation des activités électriques et à la propagation du potentiel d'action. Elles permettent donc la transmission de l'influx nerveux par les synapses électriques ou encore la synchronisation des contractions cardiaques (Duffy et al., 2006; White and Bruzzone, 2000). Dans les tissus non excitables, elles interviennent par exemple dans la nutrition des tissus faiblement vascularisés tels que le cristallin ou encore dans la propagation de vagues calciques dans des épithélia sécréteurs (Clair et al., 2001; Goodenough, 1992).

La CIJG joue également un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le contrôle de la prolifération, la migration la différenciation cellulaire. Quelques exemples des fonctions du couplage jonctionnel vont être décrits ci-après.

### ***5.1. Les jonctions communicantes au cours du développement.***

Les jonctions communicantes ont un rôle important dans le développement et la morphogenèse des organes. En effet, il a été montré un couplage jonctionnel au sein des cellules du blastoderme de poulet correspondant à la membrane primitive de l'embryon (Sheridan, 1966). De plus, l'introduction d'anticorps spécifiques de connexines lors du développement de souris induit un défaut dans le développement (Becker and Davies, 1995).

Il s'est avéré que le gène codant pour la Cx43 est exprimé dès le stade deux cellules chez la souris. Au stade huit cellules, d'autres types de connexines apparaissent telles que la Cx30.3, la Cx31, la Cx31.1, la Cx40, la Cx43 et la Cx45 (Davies et al., 1996). La communication jonctionnelle aurait un rôle lors de la pré-implantation de l'embryon (Houghton, 2005) et serait également impliquée dans l'asymétrie droite-gauche correspondant à la localisation et à la géométrie des organes (Levin, 2005). Certains auteurs considèrent également que les jonctions communicantes participent à la mise en place de gradients morphogénétiques en compartimentant l'embryon (Lo and Gilula, 1979; Risek and Gilula, 1991). Ce principe a été étudié chez le Xénope où la Cx38 est remplacée lors des phases de la neurulation par la Cx32, la Cx43 et la Cx43.4 qui seront présentes dans les futures structures neuronales (Landesman et al., 2003).

Par ailleurs, lors de la formation du placenta humain, la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste, permettant les échanges entre la mère et le fœtus, nécessite la présence d'une communication jonctionnelle fonctionnelle (Cronier et al., 2003).

La place importante des connexines lors de la morphogenèse suggère qu'un défaut de la communication jonctionnelle peut amener à des malformations importantes dans le développement. Par exemple, les souris invalidées pour le gène codant pour la Cx43 présentent des malformations cardiaques létales lors de la naissance ainsi que des malformations osseuses. Ces malformations cardiaques seraient dues à un défaut de migration des cellules de la crête neurale (Reaume et al., 1995).

De même, les souris à la fois Cx43<sup>+/-</sup> et Cx37<sup>-/-</sup> présentent des malformations des vaisseaux lymphatiques accompagnées de lymphoedème (accumulation de liquide lymphatique dans les tissus conjonctifs) et de chylothorax (fuite de la lymphe vers l'espace pleural). Les souris meurent quelques semaines après la naissance (Kanady et al., 2011). De plus, la présence de la Cx26 au niveau des cellules de l'ectoderme participe au développement des capillaires lymphatiques. Des souris invalidées pour le gène codant la Cx26 meurent entre le 16<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> de gestation dû à de sévères lymphoedèmes (Dicke et al., 2011).

## ***5.2. Les jonctions communicantes et la différenciation cellulaire.***

Les connexines sont présentes dans la plupart des tissus de l'organisme. La distribution des connexines reflète les fonctions multiples auxquelles elles peuvent participer. Elles possèdent ainsi un rôle prépondérant dans la différenciation de nombreux tissus tels que l'os, le muscle, la peau.

Pour cette dernière, il a été montré un changement d'expression de connexines durant la formation de l'épiderme. Chez les rongeurs, l'épiderme exprime tout d'abord au stade foetal principalement la Cx43 et la Cx45. Au fur et à mesure de la différenciation du tissu, une augmentation d'expression de la Cx26 et de la Cx31 est observée au détriment de la Cx43 ; voir pour revue : (Richard, 2000). Concernant l'épiderme humain, deux types de connexines sont exprimés, la Cx26 et la Cx43. Le nombre de jonctions communicantes varie en fonction des couches de l'épiderme et au cours de la différenciation des kératinocytes. Le couplage semble donc être corrélé à la différenciation des kératinocytes (Arita et al., 2002).

D'autres types cellulaires permettent également de montrer l'importance du couplage jonctionnel dans le processus de différenciation. En effet, les cellules musculaires squelettiques non différenciées présentent un fort couplage. Puis, lors de la différenciation des cellules musculaires myoblastiques en myotubes, le couplage jonctionnel est diminué. En effet l'inhibition du couplage altère l'expression de facteurs myogéniques tels que la myogénine. De plus, la surexpression de la Cx43 dans des rhabdomyosarcomes permet de rétablir la fusion et la différenciation des cellules musculaires (Constantin and Cronier, 2000; Mege et al., 1994; Proulx et al., 1997).

La fusion des trophoblastes lors de leur différenciation en syncytiotrophoblaste nécessite également un couplage fonctionnel (Cronier et al., 1994). L'utilisation d'une stratégie antisens contre la Cx43, connexine prédominante des trophoblastes, diminue le couplage entre les cellules, provoquant une diminution de la capacité des trophoblastes à fusionner (Frendo et al., 2003).

Enfin, la communication jonctionnelle a également un rôle fondamental durant la différenciation ostéoblastique. Dans ce modèle cellulaire sont exprimées trois connexines : la Cx43, la Cx45 et la Cx46. Il a été montré par l'utilisation de nucléotides antisens contre la

Cx43, l'apparition d'une malformation des membres (Minkoff et al., 1999). Les souris invalidées pour le gène codant la Cx43 présentent des retards d'ossification au niveau cranio-facial, des côtes, des vertèbres et des membres (Lecanda et al., 2000).

### ***5.3. Les jonctions communicantes et la prolifération cellulaire.***

De nombreuses études se sont intéressées au rôle de la communication jonctionnelle durant le processus de prolifération cellulaire. Le niveau d'expression des connexines varie lors des différentes phases du cycle cellulaire. Tout d'abord, il a été montré une augmentation transitoire de la communication jonctionnelle dans des hépatocytes lors de la phase G1 du cycle cellulaire suivie d'une diminution drastique lors de la phase S (Fladmark et al., 1997). De plus, pour des cellules du néocortex de souris, l'expression de la Cx43 augmente lors de la phase S et diminue lors de la phase G2. Cela correspond à un couplage important lors de la phase de synthèse de l'ADN avec une diminution du couplage lors de la phase de mitose (Bittman and LoTurco, 1999). La plupart des études montrent une relation inverse entre la prolifération cellulaire et le couplage jonctionnel. Par exemple, pour les cellules de Sertoli, durant la période néonatale, la Cx43 apparaît être essentielle pour le contrôle de la prolifération. En effet, la Cx43 participerait à la régulation du nombre de cellules germinales afin d'éviter une prolifération anarchique (Gilleron et al., 2009).

Les connexines semblent également moduler la prolifération cellulaire grâce à l'interaction avec certains facteurs. En effet, la  $\beta$ -caténine en interagissant avec la Cx43 ne pourra pas jouer son rôle de facteur de transcription afin d'induire la prolifération des cellules (Ai et al., 2000). D'autres études suggèrent que les connexines pourraient jouer un rôle direct sur l'expression des gènes. Par exemple, dans des cellules HEK293, il a été montré que la co-expression de la N-cadhérine avec la Cx43 diminuait la prolifération cellulaire associée à une augmentation de l'expression de p21, un inhibiteur de la protéine kinase cdc2 (Kamei et al., 2003).

D'autre part, l'interruption de la CIJG est associée à une croissance anormale dans le processus de carcinogenèse. En effet, certaines cellules épithéliales néoplasiques présentent une diminution d'expression de connexines associée à une diminution du couplage jonctionnel. La ré-expression de la Cx32 et de la Cx43 dans des cellules de carcinome hépatique s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de la protéine p27 aux

propriétés anti-oncogéniques (King and Bertram, 2005; Koffler et al., 2000). Cette augmentation d'expression de p27 semble être accompagnée d'un accroissement de la dégradation de Skp2 une protéine participant à la régulation de l'ubiquitination de p27 (Zhang et al., 2003d). De plus, la ré-expression de connexines induit parfois une phase G du cycle cellulaire plus longue, c'est le cas de la Cx43 dans des cellules d'ostéosarcomes ou encore de la Cx31.1 dans des cellules tumorales pulmonaires (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2001).

Enfin, de nombreuses études montrent une corrélation positive entre la CIJG et l'activité apoptotique des cellules. Les jonctions communicantes permettraient le transfert de signaux impliqués dans les processus de mort cellulaire programmée, favorisant ainsi l'entrée ou non en apoptose (Ripps, 2002). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la communication tel que l'acide 18- $\beta$ -glycyrrhétinique peut prévenir l'apoptose (de Pina-Benabou et al., 2005; Decrock et al., 2009). De plus, la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP accroît la sensibilité apoptotique au TNF $\alpha$  (Wang et al., 2007a). Mais, en fonction du type de connexine et du type de modèle étudié, il s'avère que la CIJG puisse diminuer lors de l'apoptose ou la bloquer. En effet, l'induction de l'apoptose dans des cellules épithéliales de foie de lapin provoque une diminution de la CIJG liée à une hyperphosphorylation de la Cx43 (Prochazka et al., 2007). De plus, la Cx43 inhibe l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes induit par les bisphosphonates (Plotkin et al., 2008). Concernant, les cellules bêta du pancréas, l'expression de la Cx36 est diminuée en présence de TNF $\alpha$  et d'INF $\gamma$  favorisant l'apoptose (Allagnat, 2011).

Le rôle de la communication jonctionnelle dans les processus de différenciation cellulaire et dans le développement peut être illustré par l'étude de souris invalidées pour les connexines ou par l'étude de pathologies humaines liées à des mutations de connexines.

#### ***5.4. Fonctions d'hémicanaux des connexines.***

La formation des connexons a lieu depuis le réticulum endoplasmique jusqu'au Golgi. Comme décrit précédemment, les connexons s'insèrent ensuite dans la membrane plasmique au niveau de zones non jonctionnelles. L'existence de connexons seuls dans ce type de zones a fait émerger une nouvelle notion : l'existence de connexons qui pourraient servir de canaux transmembranaires avant la formation des jonctions communicantes. Le rôle de ces canaux

serait la libération de petites molécules comme l'ATP ou le glutamate et le passage de courants ioniques : voir pour revue (Saez et al., 2010).

La présence d'hémicanaux a été montrée tout d'abord sur des cellules rétiniennees cultivées seules qui étaient capables de générer un courant en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi de mettre en évidence l'ouverture temporaire de ces canaux sous certaines conditions (DeVries and Schwartz, 1992). En effet, l'ouverture de ces canaux serait bloquée par la présence de cations divalents dans le milieu extracellulaire mais également par des potentiels transmembranaires hyperpolarisants (Ebihara, 2003). Ces deux conditions agissent en synergie pour prévenir l'ouverture des canaux dans les conditions physiologiques. Il a été montré que pour des concentrations externes calciques très faibles, les hémicanaux formés de Cx43 dans les astrocytes s'ouvraient, libérant notamment du glutamate et de l'ATP. La libération de glutamate à de faibles concentrations calciques apparaît notamment lors d'ischémies du cerveau (Harris and Symon, 1984; Stout et al., 2002; Ye et al., 2003). Cette libération d'ATP par les astrocytes serait responsable de la propagation de vagues calciques de cellules à cellules (Stout et al., 2002). Cela permettrait aux cellules qui communiquent très peu de propager les vagues calciques en réponse à des stimuli ou à du stress. Les hémicanaux formés par la Cx43 exprimés par les ostéocytes permettraient aussi de transmettre les stimuli de la mécano-transduction participant aux échanges entre les cellules de l'os pour la formation osseuse (Burra et al., 2010; Cherian et al., 2005).

L'ouverture des hémicanaux formés par la Cx43 est également sensible à la phosphorylation. La déphosphorylation par la phosphatase alcaline favorise l'état d'ouverture alors que la phosphorylation par les MAP kinases favorise l'état fermé (Kim et al., 1999).

De plus, sur des myocytes ventriculaires, des hémicanaux formés de Cx43 semblent être activés lors d'ischémies cardiaques permettant des efflux d'ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  et générant ainsi des arythmies (Johansen et al., 2011; Kondo et al., 2000). En plus de former des hémicanaux, il semble que la Cx43 soit transloquée dans la membrane interne de mitochondries des cardiomyocytes pour y jouer un rôle protecteur (Halestrap, 2006; Miro-Casas et al., 2009).

Lors d'une élévation de la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules HeLa, il a été montré une augmentation de l'activité des hémicanaux formés de Cx43 (Schalper et al., 2008). Il a également été mis en évidence également que la présence d'oxyde

nitrique (monoxyde d'azote) activait l'ouverture des hémicanaux formés par la Cx43 au niveau des astrocytes (Retamal et al., 2006). Enfin, un stress des fibroblastes de rein ralentit la dégradation des hémicanaux (VanSlyke and Musil, 2005). Ces quelques exemples mettent en évidence que ces canaux sont activés que sous certaines conditions et non en conditions restreintes où ils restent fermés. Leur perméabilité aux métabolites jouerait donc un rôle dans le fonctionnement cellulaire principalement en conditions pathologiques.

Les pannexines peuvent également former des hémicanaux comme la Panx3 qui participe à la libération de l'ATP lors de la différenciation des ostéoblastes (Ishikawa et al., 2011). Quant à la Panx1, elle est responsable de la mort des neurones après hypoxie par libération d'ATP (Orellana et al., 2011).

La caractérisation des hémicanaux doit être effectuée de manière très rigoureuse afin de ne pas aboutir à des interprétations erronées car leur fonctionnement, étudié en culture cellulaire, peut interférer avec celui d'autres canaux membranaires (Bader and Weingart, 2006; Spray et al., 2006).

### **5.5. Apport de l'étude des souris invalidées pour les connexines.**

Les invalidations des gènes de la Cx26, de la Cx43 et de la Cx45 conduisent à la mort soit *in utero* pour la Cx26 et la Cx45 soit périnatale pour la Cx43. Les souris invalidées pour la Cx26 présentent un retard de croissance dû à un défaut de transfert de nutriments vers le fœtus, tels que le glucose, entre les différentes couches de syncytiotrophoblastes dans le placenta (Gabriels and Paul, 1998). Les souris invalidées pour la Cx45 présentent, quant à elles, des anomalies cardiaques (Kruger et al., 2000; Kumai et al., 2000). Concernant l'invalidation pour la Cx43, les souriceaux meurent à cause d'une malformation cardiaque sévère. Cette malformation est provoquée par un défaut de migration des cellules de la crête neurale lors du développement (Reaume et al., 1995; Yancey et al., 1992). Les souriceaux présentent également une diminution de la taille des gonades, un défaut de l'hématopoïèse et des retards d'ossifications cranofaciaux (Lecanda et al., 2000; Lo et al., 1997; Montecino-Rodriguez et al., 2000).

Toutes les invalidations de gènes de connexines n'entraînent pas forcément la mort des souriceaux. En effet, les souris invalidées pour la Cx32 ont une apparence normale (Nelles et al., 1996). L'analyse histologique révèle la présence d'une neuropathie périphérique mais la conduction nerveuse n'est que faiblement altérée (Anzini et al., 1997). Mais, ces souris présentent de sévères anomalies hépatiques où la libération du glucose depuis les stocks de glycogène est diminuée de 78% (Nelles et al., 1996). En plus des problèmes de mobilisation du glucose, les souris sont plus susceptibles de développer des cancers hépatiques (Temme et al., 1997).

Les souris invalidées pour les gènes codant pour la Cx46 et la Cx50 développent des cataractes mais les caractéristiques de la croissance du cristallin ainsi que la morphologie varient. Pour les souris invalidées pour le gène codant pour la Cx46, une protéolyse aberrante est observée pour des protéines du cristallin, telles que la  $\gamma$ -cristalline, les rendant ainsi insolubles. Dans ce cas, le développement de la cataracte est progressif. Mais pour les souris invalidées pour le gène de la Cx50, la cataracte est plus précoce et rapide après la naissance et est accompagnée d'une diminution de la taille du cristallin (Gong et al., 1997; Simon and Goodenough, 1998).

Les souris invalidées pour les connexines ont permis d'étudier plus facilement certaines pathologies humaines.

### ***5.6. Physiopathologies liées à un dysfonctionnement des jonctions communicantes.***

Des études portant sur des mutations humaines ou sur des souris invalidées pour certaines connexines ont permis de comprendre la fonction physiologique des jonctions communicantes.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth portée par le chromosome X (CMTX) est une neuropathie résultant d'une démyélinisation progressive suivie d'une dégénération des nerfs périphériques. Dans cette pathologie, 270 mutations différentes ont été démontrées sur le gène codant pour la Cx32 aboutissant à l'absence de jonctions communicantes ou à l'altération de leurs propriétés fonctionnelles. L'absence de ces jonctions communicantes induit la dégénérescence des cellules de Schwann par déficit d'apports en nutriments (Bergoffen et al., 1993; Krutovskikh and Yamasaki, 2000; VanSlyke et al., 2000; Zhou and Griffin, 2003).

Il a été montré que des mutations sur quatre connexines différentes (la Cx26, la Cx30, la Cx30.3 et la Cx31) peuvent engendrer une perte auditive neurosensorielle. En effet, il existe une centaine de mutations présentes sur la Cx26 provoquant des surdités. La Cx26 interviendrait en particulier au niveau l'organe de Corti en participant au recyclage du potassium (Inoshita et al., 2008; Kikuchi et al., 2000). Comme pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth, les mutations se répartissent sur l'ensemble du gène codant la connexine (Gerido and White, 2004; Laird, 2006). En plus des problèmes de surdités, les mutations de la Cx26 peuvent être parfois associées à des kératodermies palmo-plantaires caractérisées par des lésions hyperkératosiques des paumes et des plantes d'où l'hypertrophie de la couche cornée de l'épiderme (Richard, 2005). Les mutations de la Cx26 peuvent être classées en deux catégories : soit la connexine est présente à la membrane mais n'est pas fonctionnelle (mutation R75W, G59A), soit elle est séquestrée dans un organite (mutation D66H) (Cohen-Salmon et al., 2002; Kudo et al., 2003; Maestrini et al., 1999).

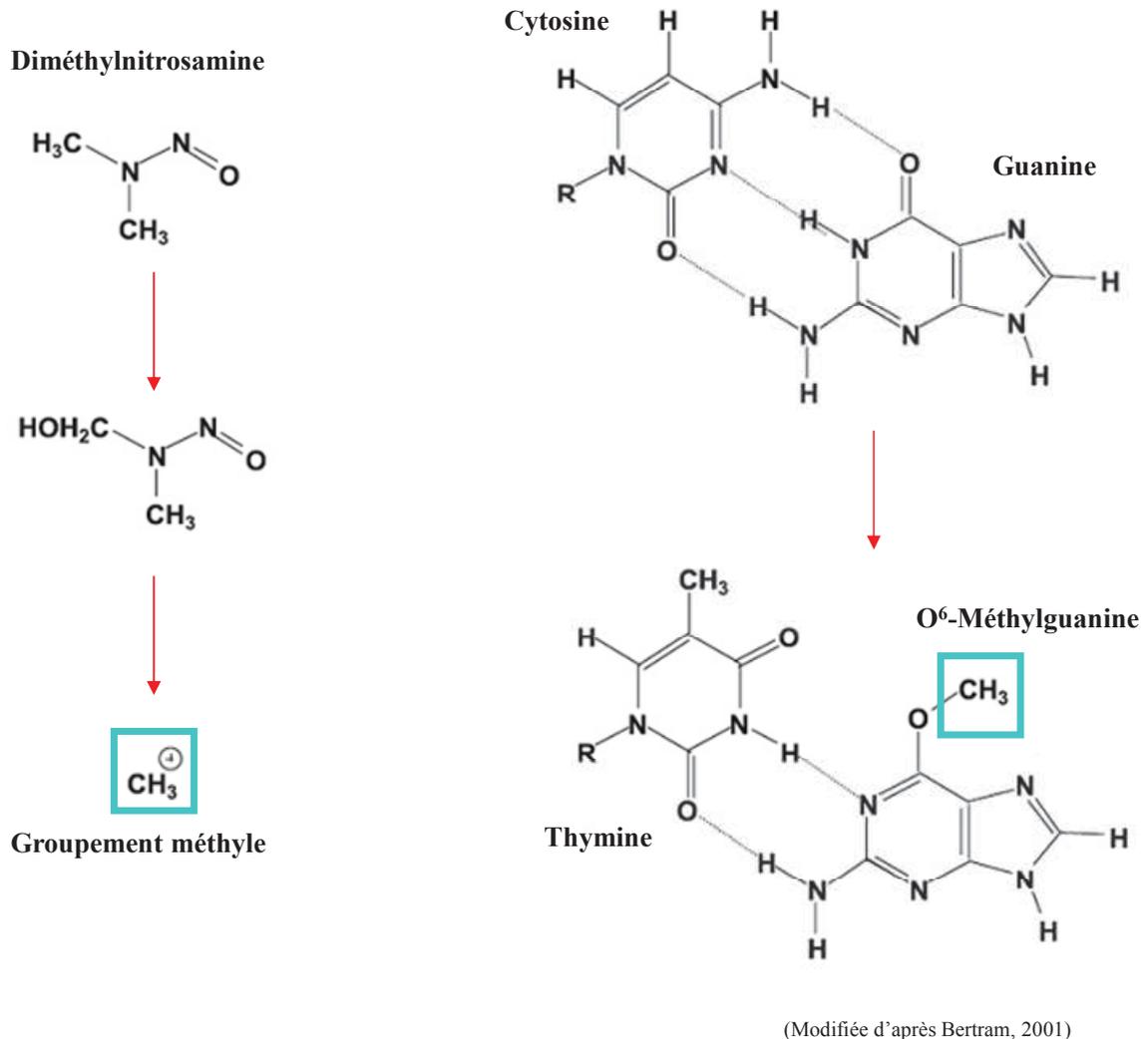
D'autres mutations sont associées à des cataractes. La Cx43, la Cx46 et la Cx50 sont exprimées dans le cristallin permettant d'interconnecter les cellules fibreuses et de maintenir l'homéostasie tissulaire de cet organe très faiblement vascularisé (White, 2002). Des mutations ponctuelles, particulièrement dans les boucles extracellulaires et les domaines transmembranaires de la Cx50 et de la Cx46 ont été identifiées comme responsables de cataractes héréditaires (Xia et al., 2006).

Une autre pathologie, nommée dysplasie oculodentodigitale (ODDD), est liée à une mutation autosomique dominante sur le gène codant la Cx43 (Paznekas et al., 2003). Les patients atteints par cette pathologie présentent une syndactylie, des malformations craniofaciales, des pertes d'auditions, des défauts du cristallin, de la cornée mais n'ont pas un pronostic vital défavorable (Loddenkemper et al., 2002; Paznekas et al., 2003).

## **II. Chapitre 2: Le cancer.**

### **1. Généralités.**

En France, le cancer est la première cause de mortalité juste devant les maladies cardiovasculaires. En 2010, environ 350 000 nouveaux cas ont été détectés, se répartissant en



**Figure 9 : Activation métabolique d'un composé le diméthylnitrosamine et la formation d'un adduit de l'ADN.**

L'activation métabolique par le cytochrome P450 dans le foie du diméthylnitrosamine résulte de la formation d'un adduit de l'ADN,  $\text{CH}_3^+$ , qui en se liant à la guanine, va donner naissance à la O<sup>6</sup>-méthylguanine. Au lieu de trois liaisons hydrogènes réalisées avec la cytosine, deux liaisons vont être effectuées avec la thymidine. Lors de la prochaine réplication, l'adénine remplacera la O<sup>6</sup>-méthylguanine donnant naissance à une mutation ponctuelle.

203 000 cas chez l'homme et 154 000 cas chez la femme. Pour cette même année, 156 000 personnes sont décédées d'un cancer représentant environ 33% des causes de mortalité.

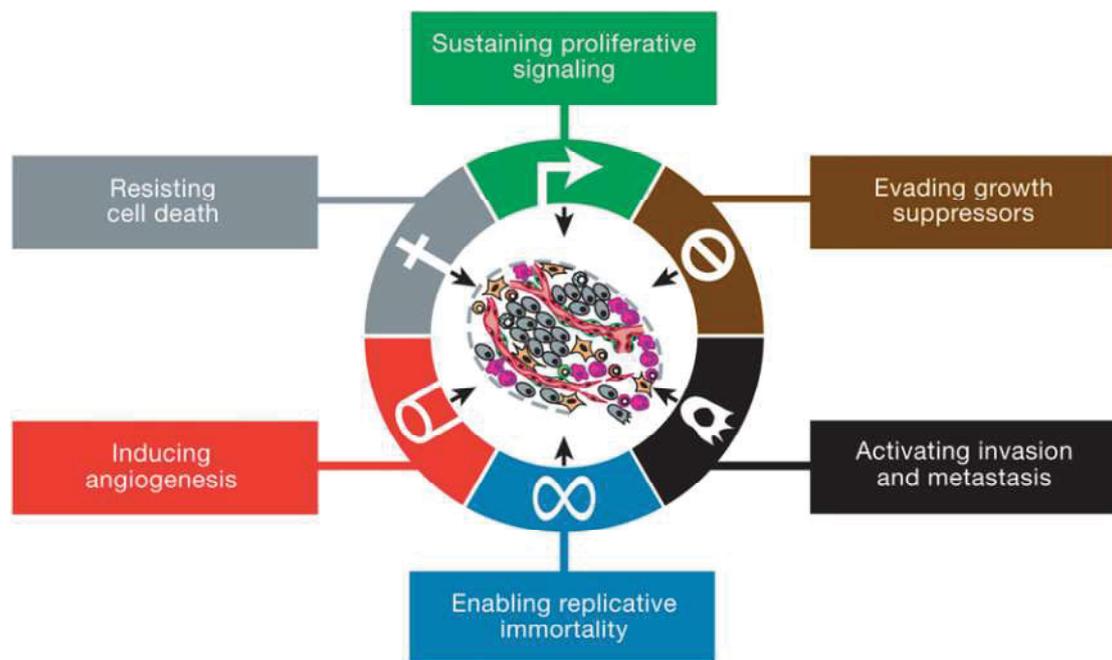
Chez l'homme, le cancer de la prostate est le plus fréquemment détecté avec 71 500 nouveaux cas en 2010, suivi par le cancer du poumon (27 000 cas) et le cancer colorectal (21 000 cas). En termes de mortalité, le cancer de la prostate (8 800 décès) se situe après le cancer du poumon (21 100 décès) et le cancer colorectal (9 200 décès).

Chez la femme, les trois cancers les plus fréquents sont celui du sein (52 500 cas), le cancer colorectal (19 000 cas) et le cancer du poumon (10 000 cas). Le cancer du sein se situe en tête de la mortalité, avec 11 300 décès en 2010, mais le taux de mortalité diminue en France depuis près de 15 ans.

La carcinogenèse est un terme général qui indique le développement d'une néoplasie correspondant à une prolifération cellulaire accrue. Ce processus est induit par différents facteurs chimiques, biologiques, physiques et génétiques. Le temps entre le premier contact avec l'agent carcinogène et le développement de lésions néoplasiques peut être très long. Durant cette période, des études ont montré qu'il y avait deux étapes distinctes : l'initiation et la promotion. Lorsque la tumeur s'est développée, s'en suit une autre étape, correspondant à la progression tumorale bien décrite par Foulds dès 1954.

### ***1.1. Initiation et promotion.***

L'initiation, qui est la première étape dans le développement d'une tumeur, correspond à un changement irréversible et permanent d'une cellule (Boutwell, 1964). En effet, elle correspond à l'apparition de mutations sur l'ADN générées par des initiateurs. Ces mutations peuvent soit survenir spontanément à la suite d'erreurs de réplication ou de recombinaison, soit être induites par des agents génotoxiques physiques, chimiques ou viraux. Les initiateurs, une fois présents dans l'organisme, vont être métabolisés par les enzymes, leur permettant de se lier de manière covalente à l'ADN. Les conséquences de ces mutations seront d'autant plus importantes qu'elles surviendront sur des gènes impliqués plus spécifiquement dans les processus de régulation, de croissance et de différenciation cellulaires tels que les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Vogelstein and Kinzler, 1993; Yuspa, 1994), mais aussi d'autres gènes cibles comme ceux responsables des systèmes de surveillance et de réparation des dommages induits à l'ADN. Un exemple est décrit dans la figure 9 où le



(D'après Hanahan et Weinberg, 2011)

**Figure 10 : Schéma représentant les différentes caractéristiques acquises par les cellules après mutations génétiques.**

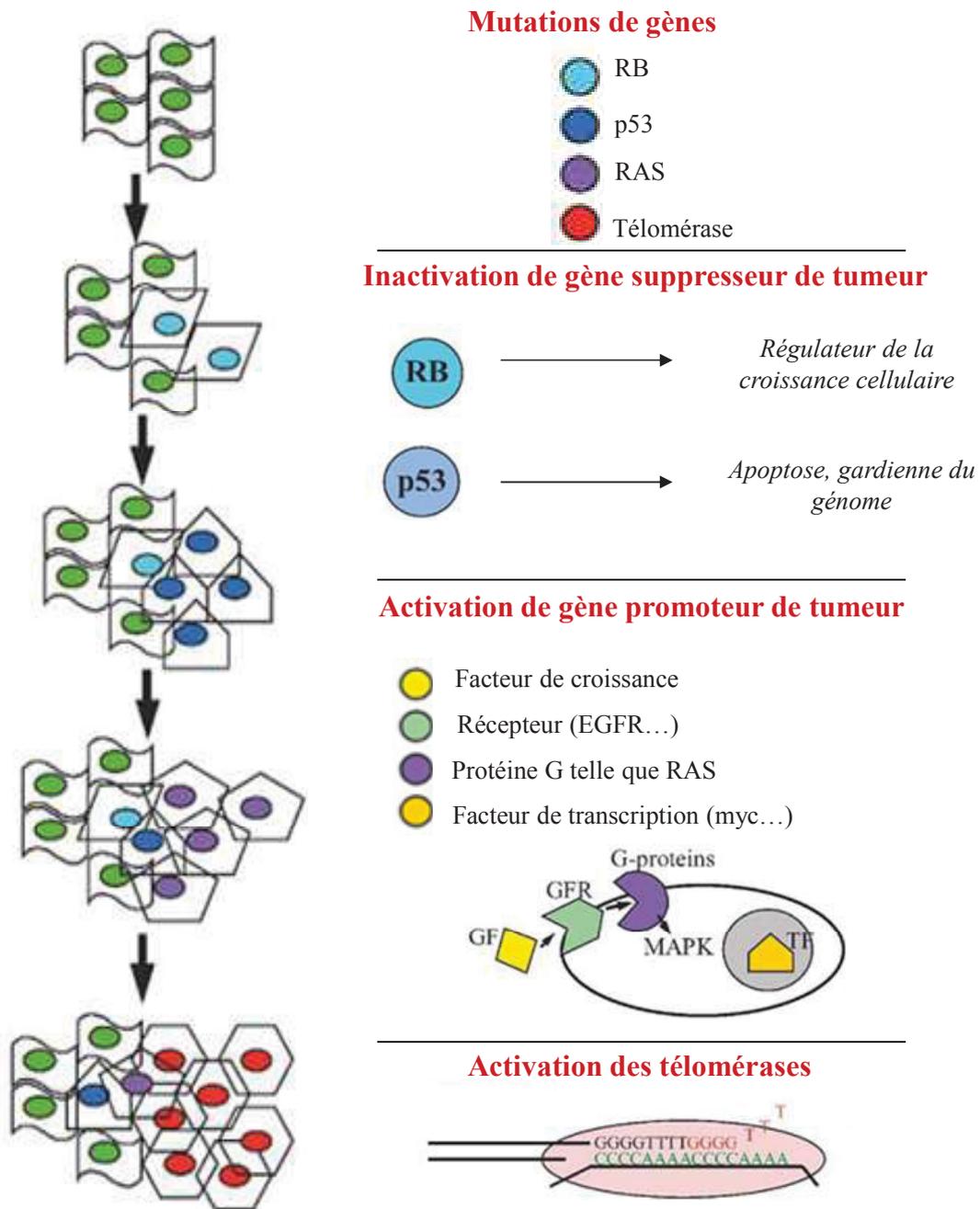
cytochrome P450 dans le foie va métaboliser le diméthylnitrosamine générant un adduit de l'ADN et créant ainsi une mutation ponctuelle.

D'autres facteurs peuvent générer des mutations. Les radiations ionisantes peuvent causer des dommages au niveau de l'ADN en induisant des cassures simple ou double brins alors que les ultraviolets induisent des réactions chimiques au niveau de l'ADN (Hall and Angele, 1999).

L'équipe de Cahill est arrivé à la conclusion que les cellules peuvent acquérir au minimum cinq mutations pour se transformer en cellules cancéreuses (Cahill et al., 1999).

Ces événements mutationnels constituent une étape précoce mais critique puisqu'ils provoquent un changement irréversible d'une cellule normale en une cellule au patrimoine génétique définitivement modifié ou cellule initiée. Les mutations de gènes peuvent modifier des voies importantes (Figure 10) :

- Le développement d'une indépendance aux facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire : les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de proliférer de manière anarchique par la production accrue de facteurs de croissance se fixant sur leur récepteur, résultant d'une stimulation autocrine. Il a été montré que des cellules de gliomes ou de sarcomes augmentaient leur expression en PDGF (Westermarck, 1995). Elles peuvent également augmenter l'expression des récepteurs à la membrane plasmique tels que les récepteurs à l'EGF ou au PDGF (Pedraza-Farina, 2006). Un des proto-oncogènes le plus étudié est *ras*. Il a été retrouvé suractivé dans par exemple 90% des cancers pancréatiques ou dans 50 % des cancers du côlon (Bos, 1989) et déclenche une cascade de signalisation modulant la prolifération cellulaire suite à l'activation des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance.
- Le développement d'un état réfractaire aux signaux inhibant la prolifération : les deux protéines les plus étudiées sont la protéine RB (Retinoblastoma protein) et la protéine p53. Cette dernière est appelée gardienne du génome car elle est activée lors de lésions de l'ADN et possède la capacité d'interrompre le cycle cellulaire pour permettre une réparation de l'ADN ou d'induire l'apoptose des cellules. L'inhibition de contact est également supprimée dans les cellules cancéreuses générant une prolifération anarchique (Hanahan and Weinberg, 2011).



(Modifiée d'après Dixon et Kopras, 2004)

**Figure 11 : Quelques exemples d'altérations génétiques dans le cancer.**

Le cancer est caractérisé par une succession de mutations de gènes et par une expansion clonale des mutants. Les mutations inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs participant à la régulation de la croissance ou de l'apoptose (p53, RB) et activent des pro-oncogènes (Ras, myc). La stimulation des télomérases permet aux cellules de proliférer indéfiniment.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor protein , GF: Growth Factor, GFR: Growth Factor Receptor, TF: Transcription Factor, MAPK: MAP Kinase, RB: Retinoblastoma protein.

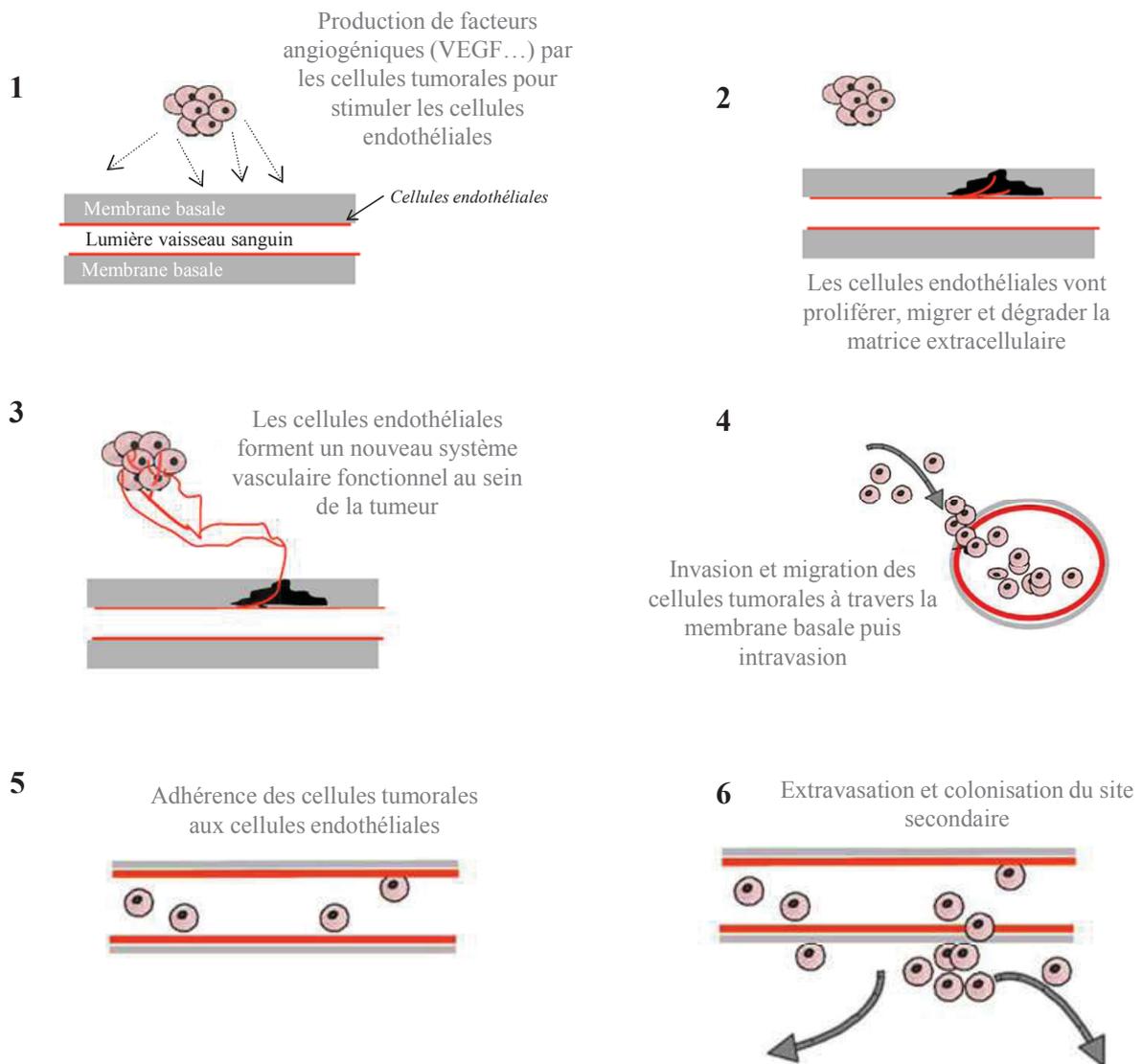
- Le développement d'une résistance à l'apoptose : des mutations peuvent également s'effectuer sur des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2. Cette protéine va inhiber l'activation de protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak empêchant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (un des éléments clefs du déclenchement de l'apoptose)(Adams and Cory, 2007).
- Le développement d'une capacité de réplication illimitée due à une activation des télomérases : ces enzymes permettent de conserver la longueur du chromosome en ajoutant une structure spécifique à chaque extrémité : le télomère (Blasco, 2005; Shay and Wright, 2000) et ainsi de permettre aux cellules de se répliquer indéfiniment.

Quelques exemples d'altérations génétiques dans le cancer sont résumés figure 11.

L'étape de promotion va permettre d'amplifier la cellule mutée et de donner naissance à plusieurs cellules ayant ces mutations. Cette étape peut être continuellement modulée par des facteurs environnementaux. L'expansion clonale des cellules initiées est dépendante de l'influence de mécanismes épigénétiques, favorisant la prolifération cellulaire (Foster, 1997) ou capables d'altérer les communications intercellulaires (Yamasaki et al., 1995). Les promoteurs n'ont aucun effet quand les cellules n'ont pas été préalablement soumises à un initiateur. A la différence des initiateurs, ils ne lient pas de manière covalente à l'ADN mais agissent sur les récepteurs des cellules afin d'activer les cascades de signalisation permettant d'initier la prolifération cellulaire. La plupart des promoteurs sont spécifiques d'un tissu. Cependant, le risque de la croissance tumorale due aux promoteurs est dépendant de la durée d'exposition et de la dose (Bailleul et al., 1989).

Une différence fondamentale distingue l'étape d'initiation de l'étape de promotion : la réversibilité. L'étape d'initiation est déclenchée par un événement irréversible ce qui n'est pas le cas pour la promotion dont l'évolution peut être réversible.

Les cellules cancéreuses vont de plus en plus proliférer et ceci sera accompagné de remaniements d'ordre génétique comprenant des mutations géniques additionnelles ainsi que des réarrangements accompagnés ou non de pertes de séquences ou de matériel au niveau des gènes ou des chromosomes.



(Modifié d'après Brooks et al., 2010)

**Figure 12 : Les différentes étapes du processus métastatique.**

1) Lorsque les cellules cancéreuses de la tumeur primaire subissent des pressions trop importantes (hypoxie, manque de nutriments), elles vont sécréter des facteurs angiogéniques. 2) En réponse, les cellules endothéliales vont proliférer, migrer pour rejoindre la tumeur primaire. 3) Les cellules endothéliales vont former un nouveau réseau vasculaire au sein de la tumeur primaire. 4) Les cellules tumorales peuvent par la suite migrer et passer au travers de l'endothélium vasculaire pour rejoindre la circulation sanguine. 5) Lorsque les cellules tumorales arrivent au niveau des capillaires sanguins, elles peuvent se lier aux cellules endothéliales et réaliser le processus d'extravasation. 6) Les cellules tumorales ayant survécu au stress sanguin vont pouvoir coloniser un nouveau tissu.

Ces événements vont progressivement entraîner une instabilité génétique majeure aboutissant à des changements phénotypiques des cellules tumorales :

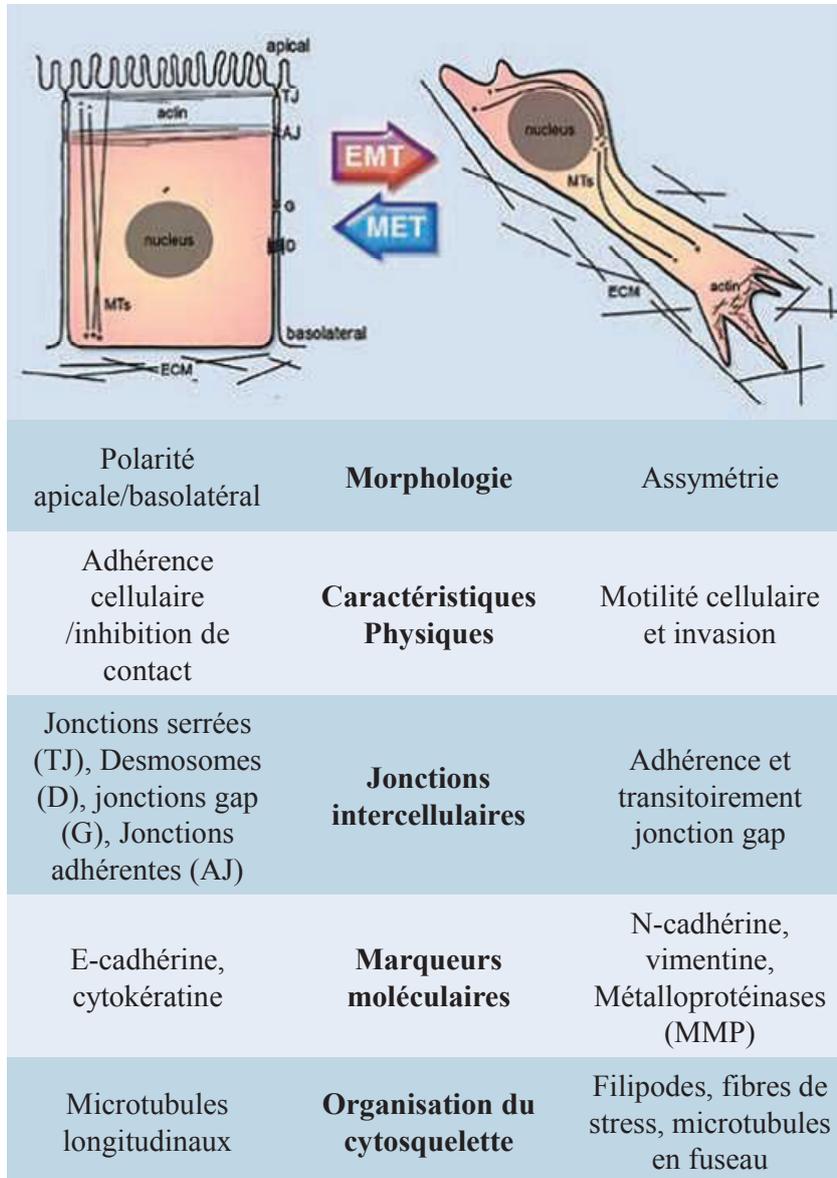
- Hétérogénéité de la taille des cellules.
- Anomalie du noyau : il est volumineux, avec des nucléoles visibles et la présence d'une hyperploïdie.
- Anomalie cytoplasmique avec augmentation du rapport cytoplasme/noyau.
- Anomalie de la membrane cytoplasmique : perte de l'inhibition de contact et modification des antigènes de surface.

Ceci aura pour conséquence l'expansion de clones cellulaires malins amenant à l'apparition de tumeurs primaires (Melnick et al., 1993).

### ***1.2. La progression tumorale : développement de métastases.***

La progression tumorale est souvent associée au développement de métastases correspondant à la colonisation des cellules tumorales dans un autre organe. Néanmoins certaines cellules cancéreuses, comme par exemple, les cellules de gliome, peuvent induire l'angiogenèse et envahir le tissu environnant responsable du décès du patient (Buckner et al., 2007).

Le développement de métastases reste la cause de 90% des décès pour la majorité des cancers. Le processus métastatique est enclenché lorsque les cellules cancéreuses subissent des pressions trop importantes. En effet, dans le microenvironnement tumoral des facteurs peuvent limiter le développement tumoral tels que des espèces réactives oxygénées, la faible quantité de nutriments ou d'oxygène ainsi que la présence du système immunitaire. Par exemple, l'hypoxie représente une pression de sélection importante qui empêche les cellules de se développer. En réponse à cela, les cellules cancéreuses expriment un facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor 1) qui va activer des gènes participant à l'angiogenèse et au métabolisme anaérobique. Un des facteurs dont l'expression est régulée par HIF-1 est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ainsi, le VEGF, une fois sécrété, va pouvoir aller se fixer sur ses récepteurs exprimés par les cellules endothéliales vasculaires (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2009). Le VEGFR2, majoritairement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, est fonctionnellement le plus important et permet la prolifération, l'invasion, la migration, la survie et l'activation de ces cellules ainsi que l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux (Mac Gabhann and Popel, 2008). Cette néovascularisation va d'une part entretenir la tumeur primaire et d'autre part permettre aux



(Modifiée d'après Christiansen et Rajasekaran, 2006)

**Figure 13 : Récapitulatif de la transition épithélio-mésenchymateuse : les différences morphologiques, moléculaires et phénotypiques entre les cellules épithéliales et les cellules tumorales invasives.**

MT: Microtubules, ECM: Extracellular Matrix.

cellules de métastaser (Figure 12). La lymphangiogénèse, correspondant au développement *de novo* de capillaires lymphatiques, est également un mécanisme impliqué dans les métastases localisées au niveau des ganglions lymphatiques. Les capillaires intercellulaires sont beaucoup plus lâches que l'endothélium sanguin, facilitant ainsi le passage des cellules tumorales à l'intérieur du vaisseau.

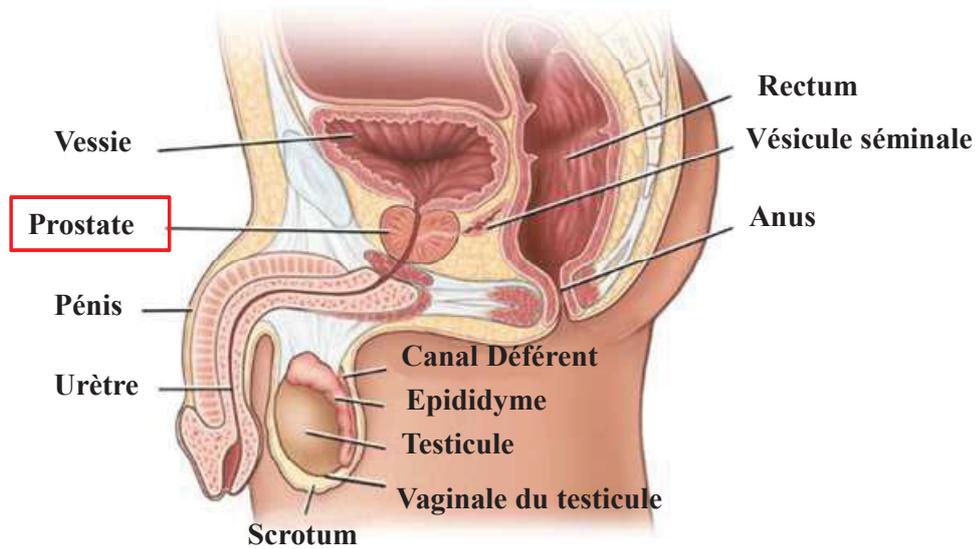
Dans la plupart des carcinomes, les cellules cancéreuses deviennent malignes et invasives en perdant l'expression de marqueurs de différenciation épithéliaux au profit de marqueurs de cellules mésenchymateuses (Figure 13). Ce processus est appelé transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) et a d'abord été identifié durant les différentes étapes du développement embryonnaire et également lors de la fibrose des organes tels que le cœur, le poumon et les intestins (Burdsal et al., 1993; Zeisberg et al., 2007a; Zeisberg et al., 2007b). Les altérations génétiques et épigénétiques décrites précédemment participent également à ce processus. Cette transition est une étape majeure pour permettre aux cellules cancéreuses de métastaser. Les mécanismes moléculaires de l'EMT impliqués sont nombreux et variés. Un des marqueurs moléculaires des cellules épithéliales est la E-cadhérine. Cette protéine transmembranaire est localisée dans les jonctions adhérentes et au niveau de la membrane basale, jouant un rôle important dans les interactions cellules-cellules. Les cellules mésenchymateuses n'expriment pas la E-cadhérine et sont caractérisées par des capacités d'adhérence plus faibles. Pour les cellules cancéreuses, la perte d'expression de la E-cadhérine augmenterait donc leur capacité d'invasion (Behrens et al., 1989). De plus, par l'absence de jonctions serrées, les cellules cancéreuses perdent leur polarité apicale et basolatérale et ont une morphologie plus allongée facilitant leur motilité. Leurs filopodes sont enrichis en intégrines permettant d'interagir avec les matrices extracellulaires pour faciliter leur migration (Anderson and Van Itallie, 1995; Li et al., 2005). Parmi les intégrines impliquées se trouvent notamment les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha3\beta1$  participant principalement à l'adhérence des cellules dans les vaisseaux sanguins (Felding-Habermann et al., 2001; Wang et al., 2004). Des protéinases, telles que les métalloprotéinases (MMP), permettant la dégradation de la matrice extracellulaire, voient également leur expression augmenter. Les principales MMP impliquées dans ces processus sont les MMP-2, MMP-9, MMP-13 et MMP-14 (Kessenbrock et al., 2010) et leur expression varient en fonction du type de matrice à dégrader. Par exemple la MMP-13 et la MMP-14 sont des collagénases, la MMP-13 est très exprimée dans les cellules tumorales métastasants dans l'os (Mak et al., 2010).

D'autres marqueurs sont caractéristiques d'une EMT tels que la vimentine, la  $\gamma$ -actinine, la  $\beta$ -filamine et la sécrétion de fibronectine et des précurseurs de collagène. L'augmentation de l'expression de ces molécules facilite la formation de pseudopodes et le remodelage du cytosquelette (LaGamba et al., 2005). De nombreuses kinases telles que Src, Ras et les MAP kinases ont également un rôle important (Christiansen and Rajasekaran, 2006). En effet, l'activation de Src accroît l'agressivité et l'invasion des cellules et participe à la dégradation de la E-cadhérine (Palacios et al., 2005). Des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  qui en se liant à son récepteur génère des cascades de signalisation dépendante de la protéine Ras et Smad qui permettra l'activation de gènes impliquées dans l'EMT (Derynck and Zhang, 2003; Xie et al., 2004). Les protéines G monomériques de la famille Rho, constituant un sous-ensemble de la superfamille des GTPases Ras, sont également impliquées dans l'EMT. Par exemple, Rhoc et Rhoa sont impliquées dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques PC-3 alors que Rac1 favorise la diapédèse (Sequeira et al., 2008).

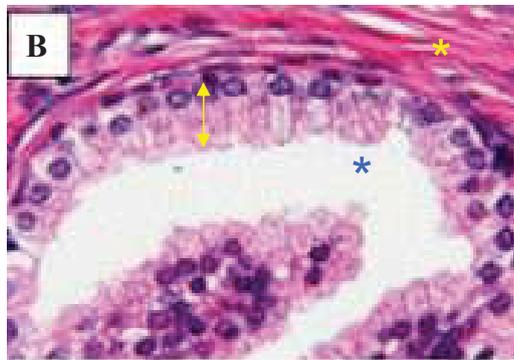
Grâce à cette EMT, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de s'insinuer entre les cellules endothéliales pour rejoindre la circulation sanguine et détruire la membrane basale et les matrices extracellulaires grâce à la sécrétion de MMPs. Ce processus est appelé intravasation. Une fois dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses doivent supporter des dommages physiques liés aux forces hémodynamiques et à l'attaque du système immunitaire. Pour survivre, elles peuvent se lier aux plaquettes sanguines qui leur serviront de bouclier (Nash et al., 2002). Lorsqu'elles arrivent au niveau des capillaires, les cellules invasives adhèrent avec l'endothélium ce qui stimule la rétraction des cellules endothéliales permettant aux cellules cancéreuses de le traverser (Auerbach et al., 1987; Tsuji et al., 2006). Ce processus est appelé l'extravasation. Enfin, elles vont adhérer à la membrane basale *via* les intégrines et la dégrader grâce aux MMPs pour développer une nouvelle tumeur appelée micrométastase ne dépassant pas 2 mm de diamètre. Par la suite, les cellules vont proliférer et s'adapter au site secondaire générant des macrométastases (Brooks et al., 2010).

Cette description des différents mécanismes impliqués dans la carcinogénèse est très simplifiée. Le cancer est une pathologie très complexe dont les facteurs impliqués varient d'un cancer à l'autre ne permettant pas de faire une généralisation.

A



(Image modifiée issue du site de l'Université médicale de la Caroline du sud)



(D'après Montironi et al., 2006)

**Figure 14 : Représentation et localisation de la prostate.**

A) Représentation de l'appareil génital masculin. B) Coupe histologique de prostate humaine. La double flèche jaune correspond à l'épithélium glandulaire, l'astéris jaune correspond aux faisceaux musculaires lisses et l'astéris bleu détermine une lumière de la glande prostatique.

## **2. Cancer de la prostate.**

### ***2.1. La prostate.***

La prostate appartient au système génital masculin comprenant aussi les deux testicules, la verge, les canaux déférents, les vésicules séminales et l'urètre (Figure 14A). La principale fonction de la prostate est de participer à la production du liquide séminal, une partie des constituants du sperme. Le développement de la prostate se fait principalement sous l'influence de la testostérone sécrétée principalement par les cellules de Leydig présentes au niveau du testicule. La testostérone est la pro-hormone précurseur de la dihydrotestostérone (DHT) qui est la principale hormone active au niveau prostatique.

La prostate est composée d'un épithélium glandulaire et d'un stroma fibromusculaire (Figure 14B). L'épithélium glandulaire est le lieu privilégié pour l'apparition des carcinomes. Tout d'abord la couche basale est constituée de cellules souches et d'une population de cellules engagées dans une voie de différenciation présentant un phénotype intermédiaire entre les cellules souches et les cellules totalement différenciées. Ces cellules se répartissent entre des cellules intermédiaires basales et des cellules intermédiaires sécrétrices en fonction de leur état de différenciation. Les cellules souches n'expriment pas le récepteur aux androgènes et sont responsables de la régénération de l'épithélium glandulaire prostatique suite à la privation androgénique. La couche luminale est composée de cellules épithéliales totalement différenciées. Les cellules sécrétrices produisent les composants du liquide prostatique, expriment le récepteur aux androgènes et engendrent la sécrétion d'une protéase, la PSA (Prostate Specific Antigen) de manière androgéno-dépendante. Les cellules neuroendocriniennes, quant à elles, sécrètent de la chromogranine et de la sérotonine (Rizzo et al., 2005).

Le stroma est composé de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules dendritiques, de cellules nerveuses et de lymphocytes. Les cellules stromales, les cellules musculaires lisses et les macrophages expriment toutes le récepteur aux androgènes.

La communication entre le stroma et l'épithélium prostatique est très importante pour la régulation de la croissance, le développement et la réponse aux hormones de la prostate

(Feldman and Feldman, 2001). En effet, des signaux paracrines sont envoyés par les cellules stromales pour induire la différenciation et la spécificité des cellules épithéliales. De même, les cellules épithéliales sécrètent des facteurs de croissance tels que l'IGF-I et l'IGF-II favorisant la prolifération des cellules stromales sous-jacentes.

## ***2.2. Epidémiologie du cancer de la prostate.***

Le cancer de la prostate est le premier cancer en termes d'incidence en France et la deuxième cause de décès (après le cancer du poumon) chez l'homme. Il est la quatrième cause de décès par cancer pour l'ensemble de la population. L'incidence la plus élevée est observée aux Etats-Unis et au Canada et la plus basse pour les pays asiatiques. Les pays d'Europe se situent à un taux intermédiaire. En France, l'incidence est de 56,4 nouveaux cas pour 100 000 personnes.

Ce cancer est rare avant 50 ans mais son incidence croît fortement et plus de 75% des nouveaux cas sont diagnostiqués après 65 ans. Le cancer de la prostate est par conséquent un problème de santé publique important dans les pays développés où l'espérance de vie est la plus longue.

## ***2.3. Le dépistage du cancer de la prostate.***

Le cancer de la prostate aux premiers stades de la maladie est très souvent asymptomatique. Les signes cliniques d'une obstruction urinaire généralement tardive sont provoqués par l'évolution locale de la maladie. Les principales manifestations sont généralement urinaires avec une gêne à l'écoulement urinaire, une infection urinaire, une hématurie ou une dilatation des cavités urinaires supérieures dues à la compression de l'uretère.

Le dépistage se fait principalement par le toucher rectal, examen réalisé chez l'homme de plus de 50 ans. Au cours de cet examen, le praticien est à la recherche d'une induration, signe potentiel d'un cancer. Cependant, cette induration de la prostate peut être aussi la conséquence de phénomènes non cancéreux.

A cette fin, l'examen clinique est combiné à un dosage de la PSA (Prostate Specific Antigen), le marqueur actuellement le plus utilisé. Le taux de PSA dépend de plusieurs facteurs que sont le volume de la prostate, la masse tumorale mais aussi la différenciation

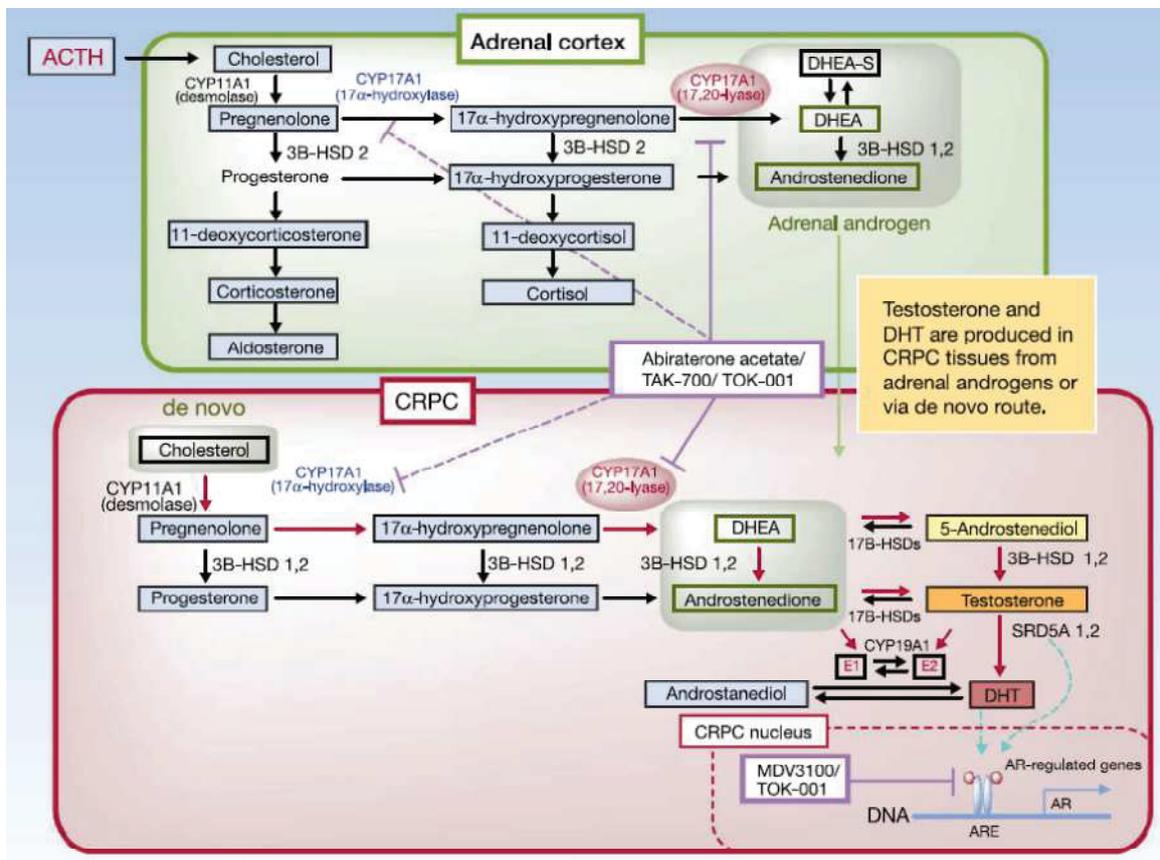
prostatique. En effet, un taux de PSA faible peut correspondre à une prostate normale tout comme à une néoplasie prostatique très différenciée donc très agressive, d'où l'importance d'associer le dosage de la PSA aux examens cliniques. La valeur seuil de la PSA au-dessus de laquelle des biopsies prostatiques sont indiquées est de 4 ng/mL.

Les deux autres marqueurs de la progression tumorale utilisés sont la phosphatase acide prostatique et la kallikréine humaine de type 2 dont l'élévation serait associée à la présence d'un cancer prostatique très agressif.

#### ***2.4. Les stades évolutifs du cancer de la prostate et les traitements.***

Le diagnostic d'un cancer de la prostate est toujours confirmé par un examen histologique de biopsies prostatiques. Ces biopsies permettent de le localiser et de pouvoir définir son type histologique ainsi que le score de Gleason. Ce score a été élaboré dans les années 1960 par Donald F Gleason et est basé sur la structure histologique du réarrangement des cellules cancéreuses après coloration à l'éosine/hématoxyline. Ce score histologique va de 2 à 10, correspondant à une tumeur de plus en plus indifférenciée et agressive. Le classement clinique, quant à lui, est calculé en fonction du TNM (Tumeur, Nodule, Métastases) indiquant le degré d'extension du cancer au niveau des tissus avoisinants. De plus, cette classification oriente le choix du traitement du cancer de la prostate. Elle est divisée en différents stades :

- Le stade T1 correspond à des cancers non palpables et non visibles à l'imagerie ou lors de biopsies de prostate réalisées à la suite d'une augmentation du taux de PSA découverte au cours d'un examen de dépistage. On distingue le stade T1a quand la tumeur représente moins de 5 % du tissu de résection et le stade T1b quand elle représente plus de 5 % du tissu de résection. Le dernier stade T1c est identifié par biopsie sur élévation de la PSA.
- Le stade T2 correspond à des tumeurs confinées à la glande prostatique mais macroscopiquement identifiables et parfois palpables. Le stade T2a est déterminé quand un lobe est atteint alors que le stade T2b correspond à une atteinte des deux lobes.
- Le stade T3 - 4 correspond au cancer ayant franchi la capsule prostatique T3a ou ayant envahi la vésicule séminale T3b. A ce stade, l'exérèse de la prostate n'est plus suffisante.
- Le stade T4 correspond à une propagation du cancer aux structures adjacentes telles que la vessie, l'urètre ou le rectum.



(D'après Yamaoka et al., 2010)

**Figure 15 : Voies de synthèse des androgènes dans les tissus et les glandes surrénales dans le cas d'un cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC).**

Chez des patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration, les récepteurs aux androgènes sont susceptibles d'être activés par les androgènes convertis à partir des androgènes de la surrénale ou synthétisés par voie intratumorale *de novo*. Malgré la castration, les androgènes, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione, sont synthétisés par la 17,20-lyase dans les glandes surrénales, d'où ils peuvent être transportés vers les tissus cancéreux prostatiques résistants et convertis en testostérone et en dihydrotestostérone (DHT). La DHEA et l'androstènedione peuvent également être synthétisées à partir du cholestérol au sein de la tumeur et être converties en testostérone et en DHT par la voie *de novo*. La testostérone et la DHT peuvent alors stimuler les récepteurs aux androgènes qui à leur tour conduisent à l'activation des gènes. La 17,20-lyase activée est essentielle pour la biosynthèse des androgènes.

3B-HSD: déshydrogénase; 17B-HSD: 17 bêta hydroxystéroïde deshydrogénase ; SRD5A: réductase 5α; E1: estrone; E2: estradiol; CYP19A1: aromatasase.

- Le stade N est caractérisé par l'envahissement des ganglions lymphatiques.
- Le stade M correspond à l'apparition de métastases à distance ou non, localisées principalement dans l'os, site privilégié du cancer de la prostate.

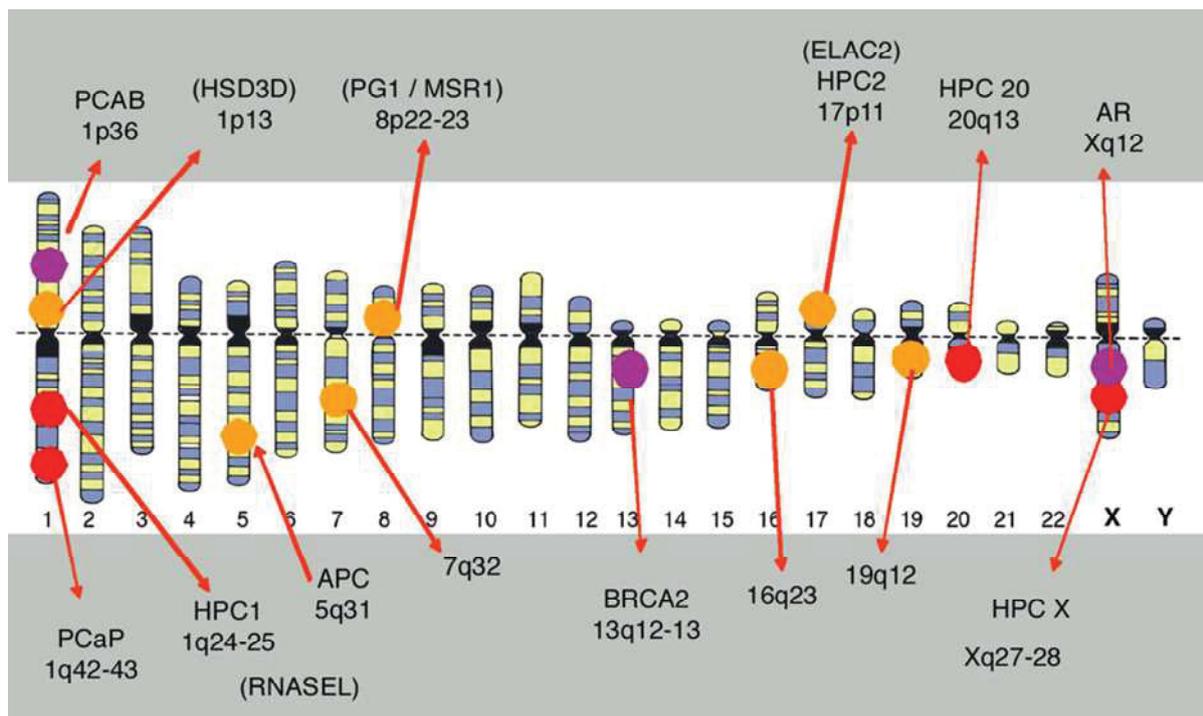
En fonction du stade d'avancement du cancer, les praticiens vont adapter leur traitement. La prostatectomie totale consiste à enlever toute la prostate, et les vésicules séminales qui sont des glandes accessoires appendues à la prostate. L'intervention est réalisée quand le cancer est restreint à la prostate.

La radiothérapie utilise des rayons à haute énergie et des particules (électrons, protons) pour détruire les cellules cancéreuses lorsque les cellules ont atteint les tissus voisins.

Le traitement hormonal est utilisé chez les patients dont le cancer s'étend au-delà des limites de la prostate, ou a récidivé après un traitement initial. Ce traitement va permettre de diminuer le taux des androgènes comme la testostérone. Ceci est effectué soit par castration chirurgicale, soit par recours à des anti-androgènes.

Enfin, la chimiothérapie est utilisée dans le cancer de la prostate quand celui-ci a évolué et qu'il ne répond plus au traitement hormonal (échappement hormonal). Elle réduit la croissance tumorale et peut diminuer les douleurs liées au cancer. En effet, lors de la privation des cellules aux androgènes, les cellules cancéreuses peuvent s'adapter à ce nouvel environnement et devenir résistantes aux hormones (Figure 15). De nombreuses études se sont intéressées à ce phénomène et des hypothèses ont émergé. La première suppose que les récepteurs aux androgènes des cellules cancéreuses prostatiques seraient hypersensibles et une faible concentration en androgènes suffirait à les activer pour permettre la prolifération des cellules. Cet effet pourrait être lié à une mutation du gène codant pour l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase responsable de la transformation de la testostérone en DHT la rendant plus active (Pienta and Bradley, 2006). De plus, des études portant sur des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques ont étudié l'expression des récepteurs aux androgènes. Il s'avère qu'il existe différents variants de ce type de récepteur en fonction de la lignée étudiée et qu'ils seraient activés sans présence d'androgènes ; voir pour revue : (Dutt and Gao, 2009). D'autres facteurs peuvent activer la voie du récepteur aux androgènes tels que les interleukines (IL) 4 et 6. L'activation de la voie dépendante du récepteur aux androgènes serait liée à Stat3 (Chen et al., 2000; Hobisch et al., 1998).

La deuxième suggère que les cellules tumorales prostatiques peuvent également convertir des androgènes produits par la glande surrénale ou réaliser une synthèse *de novo* à partir du cholestérol. En effet, l'expression d'enzymes stéroïdiennes exprimées normalement



(D'après Fournier et al., 2007)

Figure 16 : Localisations chromosomiques des gènes de prédisposition du cancer de la prostate.

dans les testicules ou les glandes surrénales est augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques. Ceci a été mis en évidence notamment pour la 17 $\beta$ HSD5 qui permet la transformation de la DHEA en 5-androstenediol, précurseur de la testostérone (Mohler et al., 2004; Montgomery et al., 2008; Stanbrough et al., 2006). Ceci permettrait d'activer des gènes régulés par les récepteurs aux androgènes.

### ***2.5. Facteurs de risque.***

Il existe des formes dites familiales comportant au moins deux cas de cancer de la prostate dans 20% des cas environ (Valeri et al., 1999). Parmi ces formes familiales, certaines sont liées à l'exposition des membres de la famille à un carcinogène commun, alors que d'autres sont véritablement des formes héréditaires. Cette transmission héréditaire peut se faire selon un mode autosomique dominant mais aussi sur un mode lié au sexe. Dans les années 1990, des gènes de prédisposition du cancer de la prostate ont été mis en évidence tels que le gène nommé PCaP situé dans la région télomérique du bras long du chromosome 1 (1q42.2-43) (Berthon et al., 1998) et depuis de nouveaux loci ont été trouvés sur d'autres chromosomes (Fournier et al., 2004) (Figure 16).

Par ailleurs, les facteurs hormonaux ont été également suspectés. En effet, en 1940, les travaux d'Huggins et Clark ont permis de comprendre l'implication des androgènes dans la progression tumorale du cancer de la prostate (Huggins and Clark, 1940). Une des fonctions importantes du récepteur aux androgènes est d'activer l'expression de gènes cibles qui contrôlent la différenciation et la prolifération des cellules prostatiques. La présence de testostérone métabolisée en DHT par la prostate stimule la prolifération cellulaire lors du développement du cancer de la prostate. A l'opposé, l'activation du récepteur  $\beta$  des œstrogènes régulerait négativement les récepteurs des androgènes (Fournier et al., 2004).

De nombreuses études ont également évalué l'implication des facteurs de croissance. Ainsi, le FGF produit par les fibroblastes prostatiques a été le premier facteur de croissance mis en évidence dans le cancer de la prostate (Jacobs et al., 1988). L'expression de l'ARNm du FGFb est plus élevée dans l'adénome que dans la prostate normale (Mori et al., 1990), de même pour le TGF $\beta$ . Il existe 4 gènes codant pour les récepteurs au FGF dont deux qui subissent des épissages alternatifs impliqués dans le passage de l'hormonosensibilité à l'hormonorésistance (Yan et al., 1992).

Concernant le TGF $\beta$ , son expression est augmentée après castration chez le rat (Kyprianou and Isaacs, 1988). Il participerait à l'apoptose des cellules épithéliales et inhiberait les effets de l'EGF dont l'expression est fortement augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques (Fowler et al., 1988; Kyprianou et al., 1990). Mais l'implication de l'EGF dans le cancer de la prostate reste encore très controversée.

### **3. Connexines et cancer.**

Pendant de nombreuses années, les connexines ont été considérées uniquement comme des suppresseurs de tumeur liés à un défaut d'expression. Mais, depuis quelques années, de nouvelles données ont émergé suggérant un rôle beaucoup plus complexe des connexines dans la progression tumorale.

#### ***3.1. Connexines et tumeur primaire.***

En 1966, Loewenstein et Kanno ont suggéré l'implication des connexines dans la tumorigénèse (Loewenstein and Kanno, 1966). De nombreuses études se sont alors intéressées à leur rôle au niveau de la tumeur primaire. Il s'avère que l'expression des connexines est diminuée dans les lignées cancéreuses dérivant de tumeur, accompagnée parfois d'une délocalisation cytoplasmique. Ceci a été mis en évidence par exemple dans des carcinomes mammaires chez le chien. L'analyse de l'expression de la Cx26 et la Cx43 a permis de montrer par immunohistochimie une diminution d'expression de ces connexines accompagnée d'une délocalisation dans le cytoplasme lorsque les cellules épithéliales mammaires devenaient cancéreuses (Torres et al., 2005). Des analyses de tumeurs issues de cancer de l'estomac chez l'homme ont également montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la Cx32 et la prolifération cellulaire par le marquage des coupes au Ki67, un marqueur de prolifération. La Cx32 est localisée dans la membrane pour les cellules épithéliales normales alors qu'elle présente une localisation cytoplasmique dans les cellules cancéreuses de l'estomac. De plus, le marquage du Ki67 est plus intense dans les cellules cancéreuses (Jee et al., 2011).

Certains promoteurs de tumeur influencent la CIJG soit en agissant sur les promoteurs de tumeur comme le phénobarbital qui diminue le niveau d'expression de la Cx32 dans des hépatocytes (Mesnil et al., 1993), soit en agissant sur l'internalisation des connexines comme le polychlorobiphényle (Krutovskikh et al., 1995). De plus, les oncogènes qui permettent la

croissance de la tumeur primaire inhibent la communication jonctionnelle en diminuant l'expression des canaux à la membrane.

La régulation de la croissance est un des rôles attribués à la CIJG. Le rôle principal de la CIJG est de permettre l'échange de molécules entre les cellules afin de participer à la régulation de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, la diminution de la CIJG permet aux cellules cancéreuses d'échapper par exemple aux signaux apoptotiques et de pouvoir proliférer de manière anarchique. La surexpression de la Cx43 a permis de diminuer la prolifération cellulaire de nombreuses lignées cancéreuses. En effet, il a été montré une diminution de la prolifération de lignées de glioblastomes *in vitro* et *in vivo* suite à l'injection des cellules dans des souris Nude (Huang et al., 1998b). Ce même effet a été également montré dans des cellules cancéreuses mammaires suite à la surexpression de la Cx26 et la Cx43. Mais les auteurs ont également montré que l'impact de la surexpression des connexines sur la prolifération tumorale ne passerait pas forcément par l'établissement de la CIJG. Suite à la surexpression de la Cx43 dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231, cette connexine reste localisée dans le cytoplasme (Qin et al., 2002).

De plus, il a été montré que la surexpression de mutants de la Cx26 au niveau du troisième domaine transmembranaire ou de la boucle extracellulaire E1 (R143W et C60F) diminuait la prolifération des cellules Hela sans rétablissement de la CIJG (Duflot-Dancer et al., 1997). D'autres études ont essayé de comprendre comment les connexines pouvaient moduler la croissance tumorale sans CIJG fonctionnelle. La transfection de la partie C-terminale de la Cx43 ou de la Cx43 entière induit dans les deux cas une diminution de la prolifération dans des lignées d'ostéosarcomes (Zhang et al., 2003c). La partie C-terminale de la Cx43 induit également une diminution de la prolifération des cellules Hela et semble être retrouvée dans le noyau de ces cellules (Dang et al., 2003) en agissant probablement sur la régulation de certains gènes ayant un rôle dans la prolifération cellulaire.

De ce fait, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des connexines dans le contrôle de la signalisation cellulaire. La surexpression de la Cx43 dans des cellules cancéreuses pulmonaires induit une prolongation de la phase G1 du cycle cellulaire par une augmentation du niveau d'expression de p27 et une diminution de la cycline D1 (Koffler et al., 2000). De plus, la surexpression de cette même connexine dans des cellules C6 de gliomes provoque une augmentation de l'expression du facteur NOV, une protéine connue pour diminuer la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, les connexines peuvent également moduler l'expression d'oncogènes. La réintroduction de la Cx32 dans une lignée de cellules tumorales rénales inhibe l'activité de Her-2 une glycoprotéine impliquée dans la prolifération cellulaire (Fujimoto et al., 2004).

Une diminution de l'expression de connexines semble donc être nécessaire à l'expansion clonale des cellules cancéreuses.

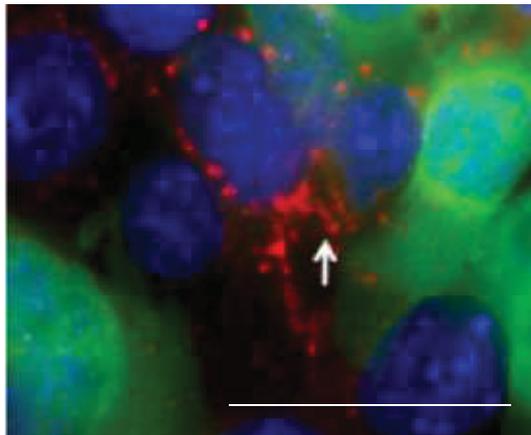
### ***3.2. Connexines et progression tumorale.***

Depuis quelques années, il apparaît que les connexines semblent aussi avoir un rôle plus complexe dans le processus tumoral et notamment durant la progression tumorale.

Tout d'abord, il s'avère que les connexines participent à la migration et à l'adhérence des cellules dans des situations non pathologiques. En effet, les souris invalidées pour le gène codant la Cx43 présentent des défaillances cardiaques dues à un défaut de migration des cellules de la crête neurale lors du développement (Reaume et al., 1995; Xu et al., 2006). De plus, il a été montré que si l'interaction entre la N-cadhérine et la Cx43 était perturbée dans les cellules NIH3T3 alors celles-ci avaient des difficultés à migrer (Wei et al., 2005). Il s'avère également que l'établissement d'une CIJG avec les cellules endothéliales facilitait l'extravasation des leucocytes et des monocytes (Eugenin et al., 2003). Enfin l'interaction des connexines avec des protéines des jonctions serrées laisse penser qu'elles participeraient également à l'adhérence cellulaire.

Dès 1990, Brauner et Hulser ont mis en évidence que des cellules tumorales établissant une communication intercellulaire (C6, EMT6/Ro) envahissaient plus rapidement des fragments de cœur que des cellules tumorales non communicantes (Hela) (Brauner and Hulser, 1990).

La capacité d'invasion des cellules de gliomes C6 est également augmentée suite à la surexpression de la Cx43 et serait associée à l'établissement d'une CIJG fonctionnelle avec les astrocytes (Oliveira et al., 2005). L'augmentation des capacités invasives de ces cellules est également liée à une augmentation de la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 participant à la dégradation de la matrice extracellulaire (Zhang et al., 2003b). De plus, des analyses de tumeurs mammaires issues de tumeurs primaires ou de métastases dans les ganglions lymphatiques ont montré une augmentation d'expression de la Cx26 et de la Cx43



(D'après Elzarrad et al., 2008)

**Figure 17 : Immunolocalisation de la Cx43 à l'interface entre des cellules tumorales mammaires et des cellules endothéliales en co-culture.**

Les cellules tumorales mammaires ont été transfectées avec la GFP afin de les différencier des cellules endothéliales. La flèche cible un marquage ponctiforme de la Cx43 entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales.

Barre d'échelle: 10  $\mu$ m.

dans les cellules cancéreuses ayant envahi le ganglion lymphatique (Kanczuga-Koda et al., 2006). Ce type d'observation a été également retrouvé sur des tumeurs de l'estomac caractérisé par une perte d'expression de la Cx43 dans les tumeurs primaires suivies d'une réexpression dans les cellules ayant métastasé dans les ganglions lymphatiques (Tang et al., 2010). Enfin, il a été montré que des lignées tumorales de mélanomes ayant métastaser dans le coussinet chez la souris, présentaient une augmentation d'expression de la Cx26 (Ito et al., 2004).

Néanmoins, il apparaît que, dans certains cas, la localisation cytoplasmique de certaines connexines soit un indicateur d'un comportement invasif des cellules cancéreuses. En effet, la Cx32 accroît la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses hépatiques HUH7 lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme (Li et al., 2007).

Récemment, de nouvelles données tendent à montrer que les connexines sont impliquées dans les processus invasifs et métastatiques. Les connexines semblent intervenir lors des processus de migration et d'invasion des cellules, mais également lors de l'interaction avec les cellules endothéliales et du développement de la métastase. Les exemples suivants permettent d'illustrer le rôle potentiel des connexines dans ces phénomènes tardifs.

La surexpression de la Cx43 dans une lignée cancéreuse mammaire permet l'augmentation de l'adhérence de ces cellules sur l'endothélium pulmonaire induisant une augmentation de l'expression de cette même connexine par les cellules endothéliales. Cette interaction permettrait aux cellules cancéreuses, par la suite, de pouvoir sortir de la circulation sanguine par le phénomène de diapédèse afin de générer des métastases (Elzarrad et al., 2008) (Figure 17). L'interaction directe entre les cellules endothéliales et cancéreuses *via* les connexines a été également montrée pour des cellules de mélanomes et de gliomes (Saito-Katsuragi et al., 2007; Zhang et al., 2003a). Par ailleurs, la transfection de la Cx43 dans des cellules tumorales mammaires permettrait d'établir un couplage hétérocellulaire avec les cellules endothéliales et d'accroître la diapédèse (Pollmann et al., 2005).

En plus de l'impact sur l'extravasation, cette communication hétérocellulaire pourrait jouer un rôle bien en amont durant l'angiogenèse. En effet, les cellules C6 de gliomes surexprimant la Cx43, co-cultivées avec des cellules vasculaires endothéliales humaines (HUVEC), augmentent les capacités de ces dernières à former un réseau capillaire. Dans ce modèle, l'établissement de la CIJG est un facteur important accompagné d'une augmentation de la sécrétion de VEGF (Zhang et al., 2003a).

Les cellules endothéliales sont connues pour exprimer la Cx37, la Cx40 et la Cx43 ce qui signifie qu'elles peuvent établir une CIJG avec les cellules cancéreuses qui expriment des connexines capables de former des jonctions communicantes avec ces dernières (Cronier et al., 2009).

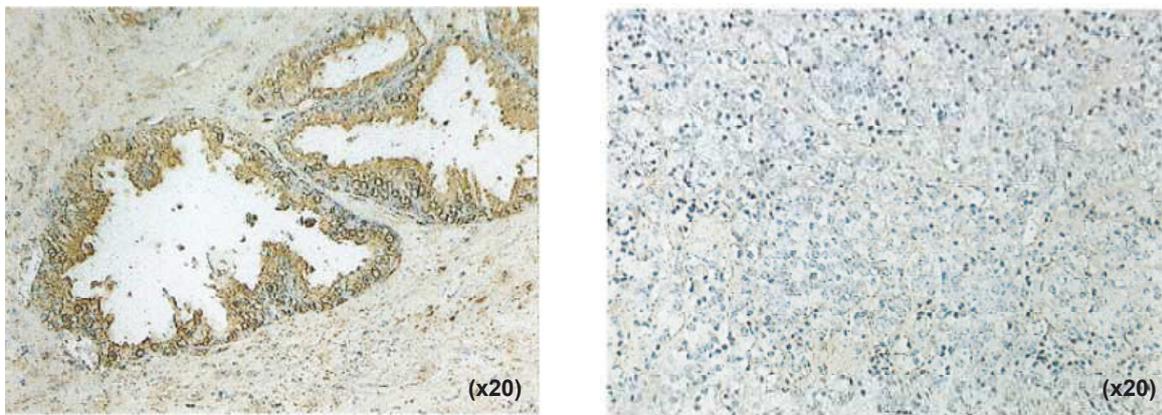
Enfin, d'autres études mettent en évidence que les connexines ralentissent le processus métastatiques des cellules cancéreuses. Ainsi, une étude portant sur la lignée cancéreuse mammaire Hs578T a montré que la diminution d'expression de la Cx43 augmentait les capacités invasives et migratoires de ces cellules. Ce phénomène était accompagné d'une diminution d'expression d'un facteur anti-angiogénique, la thrombospondine-1 alors que l'expression du VEGF était augmentée (Shao et al., 2005). La surexpression de la Cx43 dans des lignées tumorales pulmonaires diminue leur capacité invasive associée à une diminution d'expression de la MMP-2 et une augmentation de la localisation membranaire de la E-cadhérine (Xu et al., 2008; Zhao et al., 2011). La Cx43 et la Cx26 diminuent également la migration, l'invasion et l'adhérence des cellules tumorales mammaires ainsi que le développement de métastases dans le poumons (McLachlan et al., 2006; Momiyama et al., 2003; Plante et al., 2011).

Il est difficile de déterminer si les connexines favorisent ou non le processus tumoral. Il semble que leurs impacts dépendent du type de la tumeur et de son contexte environnemental.

### ***3.3. Connexine et cancer de la prostate.***

Les cellules épithéliales de la prostate expriment la Cx43 ainsi que la Cx32. La Cx43 est plutôt localisée à la membrane des cellules basales alors que la Cx32 est exprimée par les cellules épithéliales luminales. L'expression de la Cx43 serait régulée par les androgènes. En effet, la castration chez le rat induit une apoptose des cellules prostatiques accompagnée d'une augmentation d'expression de la Cx43 alors que la réintroduction de la dihydrotestostérone (DHT) abolit cet effet (Huynh et al., 2001).

Des études ont permis de déterminer l'expression des connexines lors du développement du cancer de la prostate. Pour cela, des marquages immunohistochimiques ont été effectués sur des extraits de prostate saine, sur des hyperplasies bénignes de la prostate et



(D'après Tsai et al., 1996)

**Figure 18 : Immunomarquage de la Cx43 sur des coupes de prostate d'un patient sain (gauche) et d'un patient atteint d'un carcinome de la prostate au stade 4 (droite).**

La Cx43 a une organisation ordonnée dans le tissu sain par rapport au tissu tumoral. A noter également une diminution de l'intensité du marquage de la Cx43 indiquant une diminution d'expression de la Cx43 dans le tissu tumoral.

sur des tumeurs prostatiques. Il s'avère que la Cx32 et la Cx43 sont exprimées dans les deux premiers cas, mais leur expression est fortement diminuée dans les tumeurs (Figure 18). Plus les cellules tumorales prostatiques de la tumeur primaire sont dédifférenciées et moins elles expriment les connexines (Habermann et al., 2002; Tsai et al., 1996). De plus, l'équipe de Mehta, en 1999 a montré une diminution d'expression de la Cx32 et de la Cx43 accompagnée d'une délocalisation dans le cytoplasme. Ils ont surexprimé également la Cx43 dans la lignée cellulaire LNCaP induisant une diminution de la prolifération de ces cellules (Mehta et al., 1999).

Des études se sont intéressées à l'impact des connexines sur l'action d'agents pharmacologiques influençant le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques. Tout d'abord, il a été montré que la surexpression de la Cx43 dans la lignée cellulaire PC-3 (cellules très invasives) ne modifiait pas leur croissance mais les rendait plus sensibles au docetaxel, un alcaloïde anticancéreux. Cet effet était caractérisé par une augmentation de l'apoptose liée principalement à une diminution d'expression de Bcl-2 et une augmentation de l'activité de la caspase-3 (Fukushima et al., 2007). De plus, une équipe en 2007 s'est intéressée à la sensibilité des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP au TNF $\alpha$ . Suite à la surexpression, la Cx43 est localisée à la membrane et est fonctionnelle, rendant les cellules LNCaP plus sensibles au TNF $\alpha$ . Ils ont remarqué que l'augmentation de l'apoptose s'accompagne d'une augmentation d'activation de la caspase 8 (Wang et al., 2007a).

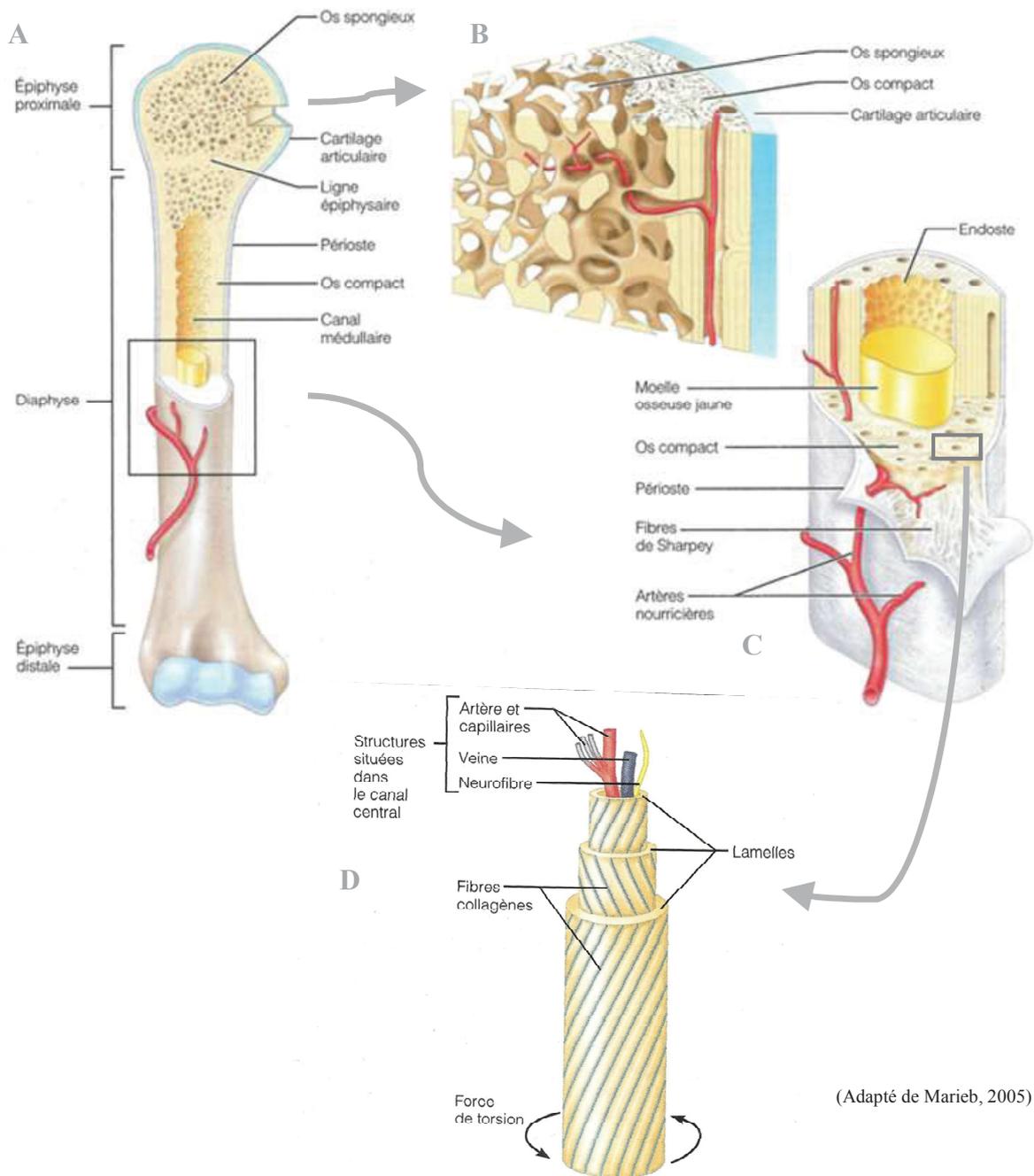
Hormis les effets de la Cx43 sur la survie cellulaire, aucune étude n'a été entreprise sur les propriétés agressives des cellules cancéreuses prostatiques.

### **III. Chapitre 3 : Métastases osseuses.**

#### **1. Physiologie osseuse : le remodelage osseux.**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé puisqu'il est minéralisé. Il est composé d'une matrice organique constituée principalement de collagène de type 1, de protéines non collagéniques et d'une fraction minérale formée de cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Il assure quatre fonctions essentielles :

- Une fonction mécanique assurant le support du poids de l'organisme et le mouvement.



**Figure 19 : Schéma représentant la structure macroscopique d'un os long.**

**A)** Vue antérieure avec coupe frontale montrant l'intérieur de l'extrémité proximale. **B)** Vue tridimensionnelle grossie de l'os spongieux et de l'os compact de l'épiphysse de A). **C)** Coupe transversale grossie de la diaphysse de A). La surface externe de la diaphysse est recouverte de périoste alors que la surface articulaire de l'épiphysse est recouverte de cartilage hyalin. **D)** Schéma d'un ostéon grossi de C). Les lignes obliques représentent l'orientation des fibres de collagène à l'intérieur de la matrice osseuse.

- Une fonction de protection des organes essentiels (tissus mous)
- Une fonction métabolique liée à sa capacité de stocker le calcium et le phosphate.
- Une fonction de synthèse et de renouvellement de toutes les cellules sanguines par l'hématopoïèse localisée dans la moelle osseuse.

Macroscopiquement, le squelette adulte comprend de l'os cortical ou compact et de l'os spongieux ou trabéculaire (Figure 19A et B). L'os cortical, essentiellement localisé dans les os longs, est composé de zones cylindriques appelées ostéons ou système de Havers. Chaque ostéon est constitué de lamelles de collagène organisées de manière concentrique délimitant un canal central qui permet le passage des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses appelé canal de Havers. Des canalicules permettent de relier les canaux de Havers entre eux (Figure 19B et C).

L'os trabéculaire ne possède pas de structure de type ostéon mais présente des lamelles de collagène irrégulières. Ces travées délimitent des espaces contenant la moelle osseuse et, dans lesquelles, les ostéocytes y sont localisés.

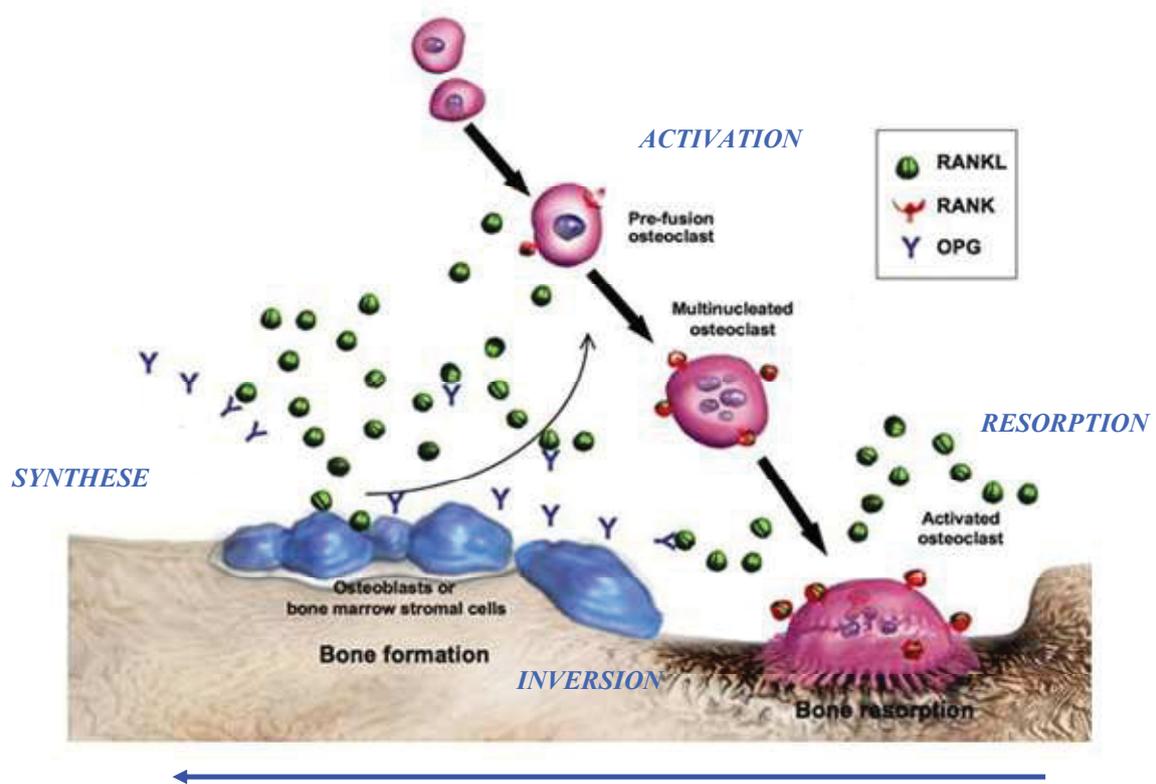
### ***1.1. Les principaux acteurs et fonctionnement du remodelage osseux.***

Deux types d'ossification vont permettre la formation du tissu osseux : l'ossification endochondrale et l'ossification intramembraneuse.

L'ossification endochondrale responsable de la formation des os longs est caractérisée par la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes produisant un cartilage hyalin qui va être progressivement remplacé par une matrice ostéoïde sécrétée par les ostéoblastes. Quant à l'ossification intramembraneuse, préférentielle au niveau des os plats, elle correspond à l'apposition d'une matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes sous forme d'une membrane progressivement minéralisée.

Chez l'adulte, les os, qu'ils soient longs ou plats, sont soumis à un remodelage à hauteur de 10% par an. Ce remodelage est assuré par deux types cellulaires : les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice. L'équilibre entre destruction et formation osseuse est régulé par de nombreux facteurs locaux et systémiques agissant principalement sur les cellules mésenchymateuses.

Dans une structure définie appelée BMU (Basic Multicellular Unit), le cycle du remodelage débute par une phase de résorption durant laquelle les ostéoclastes vont digérer la



(Modifié d'après Rosen, 2011)

**Figure 20 : Représentation schématique du cycle de remodelage osseux.**

Le cycle du remodelage osseux débute tout d'abord par une phase d'activation et de différenciation des ostéoclastes (grâce notamment au RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor NF- $\kappa$ B Ligand). Les ostéoclastes fusionnent, donnant naissance à une cellule géante multinucléée qui pourra résorber la matrice osseuse. Puis, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, correspondant à la phase d'inversion. Ensuite, les précurseurs des ostéoblastes se différencient en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice osseuse en comblant la lacune de résorption. A la fin, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, subissant un phénomène d'apoptose ou se laissant inclure dans la matrice en devenant des ostéocytes.

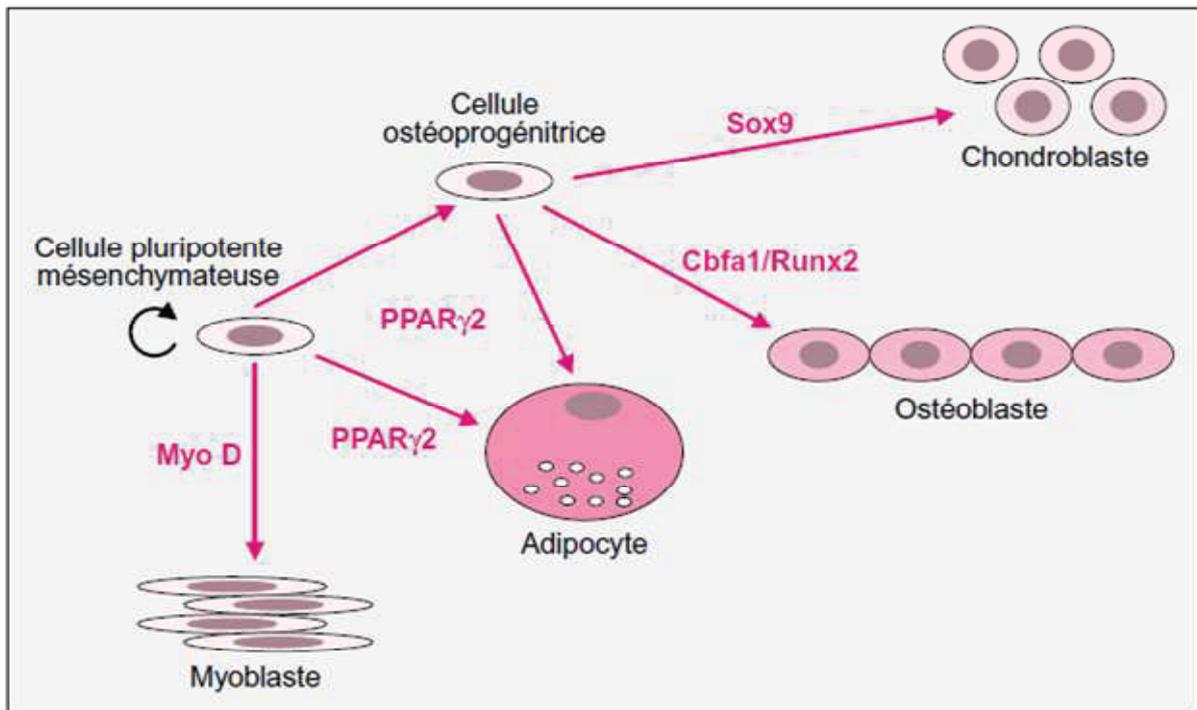
OPG: Ostéoprotégérine

matrice osseuse. Les ostéoclastes vont se détacher et rentrer en apoptose correspondant à la phase d'inversion. Enfin, les précurseurs mésenchymateux des ostéoblastes vont se différencier en ostéoblastes matures qui vont synthétiser et déposer une nouvelle matrice comblant la lacune de résorption. Une partie des ostéoblastes va subir un phénomène d'apoptose et une autre partie sera incluse dans la matrice pour devenir des ostéocytes (Figure 20).

Les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, dérivent de cellules souches hématopoïétiques de la lignée monocyttaire. Après une phase de prolifération, les précurseurs des ostéoclastes vont fusionner pour donner des ostéoclastes matures correspondant à des cellules géantes multinucléées. De nombreuses molécules sont impliquées dans la fusion des ostéoclastes comme par exemple une protéine à sept domaines transmembranaires DC-STAMP (Dendritic Cell Specific Transmembrane Protein) ou encore le CD44 (de Vries et al., 2005; Iwasaki et al., 2008). La membrane plasmique de ces cellules présente une bordure en brosse apicale en contact avec la matrice osseuse à résorber. Afin de pouvoir s'arrimer et se déplacer le long de la surface du tissu osseux, ils possèdent des structures dynamiques appelées podosomes (Jurdic et al., 2006; Teitelbaum, 2000). En effet, les intégrines  $\alpha\beta3$  présentes dans les podosomes seraient importantes pour l'adhérence, la motilité et l'activation des ostéoclastes (Zou and Teitelbaum, 2010). Ainsi, l'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique alternant des phases migratoires et des phases de résorption actives.

Lorsque les ostéoclastes ont développé leur bordure en brosse, l'acidification du milieu va pouvoir être effectuée par l'activation d'une ATPase protonique pour solubiliser les cristaux d'hydroxyapatite. De plus, des enzymes lysosomiales et des MMP vont être sécrétées et ainsi dégrader la matrice osseuse. Les résidus de collagène formés par la dégradation vont être soit phagocytés, soit transportés par les ostéoclastes pour être libérés au niveau basolatéral. Lorsque la lacune de résorption est formée, les ostéoclastes entrent dans une phase d'apoptose et disparaissent pour être remplacés pendant la phase d'inversion par les ostéoblastes (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006).

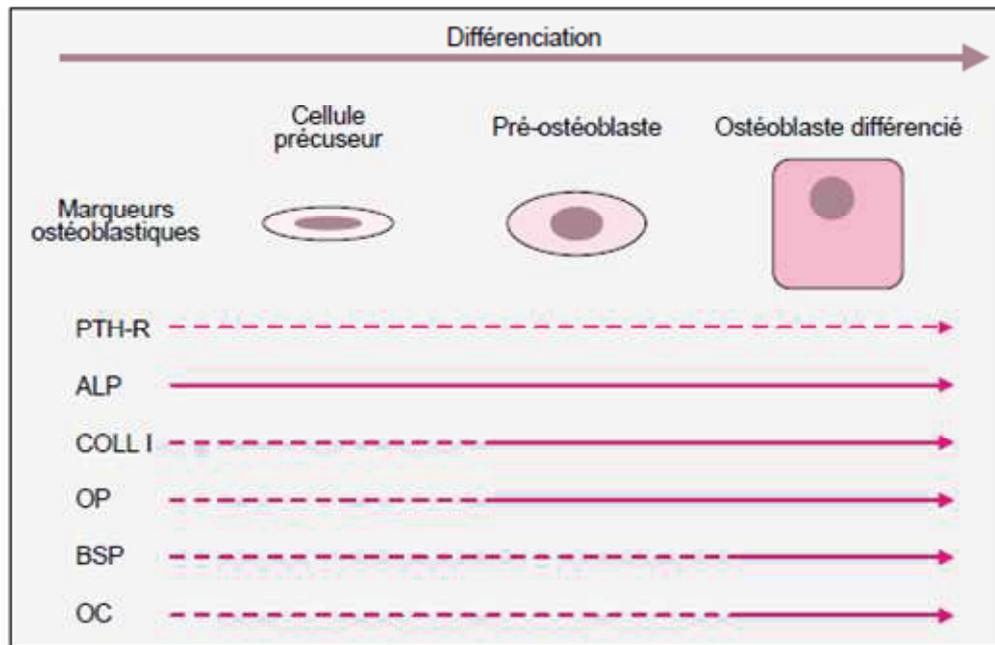
La fonction principale de l'ostéoblaste est donc de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse composée principalement de collagène de type 1. Ils synthétisent également un grand nombre de protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine...) qui représentent 50% des protéines non collagéniques de l'os, à savoir des molécules d'adhérence, des protéoglycanes et des facteurs de croissance. Les ostéoblastes s'organisent généralement sous



(D'après Marie et al., 2001)

**Figure 21: Représentation schématique de la multipotentialité des cellules souches mésenchymateuses.**

La différenciation vers un type de cellules nécessite l'expression de facteurs de transcription spécifiques. La différenciation ostéoblastique nécessite l'expression de Cbfa1/Runx2 alors que l'expression de Sox9 induit la voie chondroblastique. L'expression de PPAR $\gamma$ 2 induit la différenciation adipocytaire alors que le facteur de transcription Myo D permet de générer des myoblastes.



(D'après Marie et al., 2001)

**Figure 22 : Schéma représentant les principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique.**

La différenciation des ostéoblastes est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques précoces (PTH-R: récepteur de la PTH; ALP: phosphatase alcaline; COLL-1: collagène de type 1; OP: ostéopontine) ou tardifs (BSP: sialoprotéine osseuse; OC: ostéocalcine)

---- : faible expression ; —: forte expression

forme d'amas le long de la surface osseuse et dérivent de cellules souches mésenchymateuses multipotentes qui ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, myoblastes ou fibroblastes (Bianco et al., 2001) (Figure 21).

Après une phase de prolifération, les ostéoblastes produisent rapidement une matrice ostéoïde par dépôt de collagène suivie de sa minéralisation par fixation d'hydroxyapatite formée d'ions calciques et phosphates. Lorsque la matrice est complètement minéralisée, la plupart des ostéoblastes disparaissent par apoptose mais certains peuvent rester piégés en état de quiescence dans la matrice nouvellement synthétisées et deviennent des ostéocytes. Plus les ostéocytes évoluent et plus ils perdent l'expression de marqueurs ostéoblastiques dont l'ostéocalcine et le collagène de type 1 et participeraient à la mécano-transduction lors d'un stress mécanique (Rochefort et al., 2010). Les ostéocytes finiront par être phagocytés puis digérés par les ostéoclastes lors des cycles de remodelages successifs (Elmardi et al., 1990).

La synthèse des protéines de l'os, effectuée par les ostéoblastes, se produit de manière séquentielle. En effet, lors des stades les plus précoces, au cours du dépôt de la matrice ostéoïde, les cellules pré-ostéoblastiques expriment des protéines associées à la production de cette matrice telles que le collagène de type 1, la fibronectine ou l'ostéopontine. Une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline est également observée. Cette enzyme permet de dégrader les pyrophosphates inorganique, eux-mêmes inhibiteurs de la calcification, afin d'augmenter les taux de phosphate nécessaires à la minéralisation pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Quant aux ostéoblastes différenciés, ils expriment des facteurs plus tardifs tels que l'ostéocalcine ou encore la sialoprotéine osseuse (BSP) (Figure 22). L'ostéocalcine est la protéine majoritaire sécrétée par les ostéoblastes et fait partie de la famille des gla-protéines car elle possède trois résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique permettant la fixation de calcium. De ce fait, elle participe à la fixation et à la stabilisation des cristaux d'hydroxyapatite (Neve et al., 2011). L'ostéopontine ainsi que la sialoprotéine osseuse sont également exprimées par les ostéoblastes matures. Ces deux protéines sont des glycoprotéines matricielles regroupées sous le terme de SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein). Elles participeraient à l'adhérence des cellules osseuses à la matrice (Aubin et al., 1995; Ihara et al., 2001).

Une étroite coopération entre ces différents types cellulaires apparaît essentielle lors du cycle du remodelage osseux.

## 1.2. Régulation de la différenciation ostéoclastique

Les ostéoclastes ont une origine commune avec les monocytes/macrophages. La spécification des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription et de facteurs de croissance dont les principaux sont au nombre de trois : M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Ligand) et son antagoniste l'ostéoprotégérine (OPG).

RANKL, une cytokine apparentée à la famille des TNF $\alpha$ , est une protéine liée à la membrane cellulaire exprimée dans de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales et les lymphocytes T. Dans l'os, ce facteur est synthétisé par les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes. Il va pouvoir stimuler la différenciation des ostéoclastes en se fixant sur son récepteur RANK présent à la membrane plasmique des précurseurs ostéoclastiques et permettre ainsi la fusion des ostéoclastes et l'inhibition de l'apoptose de ces cellules. De plus, l'ostéoblaste mature sécrète également l'ostéoprotégérine, antagoniste soluble du RANKL, appartenant lui aussi à la famille des TNF $\alpha$ . C'est un récepteur leurre puisqu'en se fixant au RANKL il bloque la différenciation des ostéoclastes (Simonet et al., 1997; Thomas et al., 2001a). *In vivo*, des souris déficientes en ostéoprotégérine, développent une ostéoporose sévère alors que les souris la surexprimant développent une ostéopétrose (Bucay et al., 1998).

Enfin, les ostéoblastes peuvent sécréter le M-CSF qui est un facteur se fixant sur son récepteur c-fms exprimé à la membrane des précurseurs ostéoclastiques, permettant ainsi d'induire leur prolifération et leur différenciation. C'est pourquoi les souris déficientes en M-CSF présentent un phénotype ostéopétrotique (Dai et al., 2002; Hibbs et al., 2007).

Des hormones et des facteurs locaux agissent également sur la différenciation ostéoclastique. En effet des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF $\alpha$  augmentent la résorption osseuse en stimulant l'expression du M-CSF et du RANKL par les ostéoblastes. alors que le TGF $\beta$  et l'IFN $\gamma$  augmentent l'expression de l'OPG (Perez-Sayans et al., 2010).

### ***1.3. Régulation de la différenciation ostéoblastique.***

La formation osseuse est principalement dépendante du nombre d'ostéoblastes différenciés et de la différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de facteurs de transcription, d'interactions cellulaires et matricielles et de facteurs systémiques et locaux.

#### ***1.3.1. Les facteurs de transcription.***

Cbfa1/Runx2 est un facteur essentiel de l'engagement et de la différenciation des ostéoblastes. Ce facteur peut réguler l'expression de nombreux gènes spécifiques des ostéoblastes tels que la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type 1, l'ostéocalcine ou encore l'ostéopontine en se fixant sur une séquence spécifique appelée OSE2 (de Crombrughe et al., 2001; Ducy et al., 1999). Il a été montré que des souris déficientes en Cbfa1/Runx2 présentaient une activité de la phosphatase alcaline très faible alors que l'expression de l'ostéocalcine n'était plus détectable. De plus, les ostéoblastes en culture n'ont plus la capacité de minéraliser (Lian et al., 2006).

Osterix est un autre facteur important. Ce facteur de transcription possède un motif en doigt de zinc et est spécifiquement exprimé par les ostéoblastes. Cette structure lui permet de se fixer sur des séquences d'ADN riches en G-C pouvant se lier au promoteur de la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type 1, l'ostéonectine ou l'ostéopontine (Nakashima et al., 2002). La transcription du gène codant pour Osterix est régulée positivement par Cbfa1/Runx2 permettant l'évolution des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes immatures. En effet, des souris déficientes en Osterix présentent des défauts de formation osseuse sans modification du niveau d'expression de Runx2 (Koga et al., 2005).

D'autres facteurs peuvent également participer à la différenciation ostéoblastique tels qu'AP-1, ATF4 (Activating Transcriptor Factor 4), Dlx-5 (Distal-less homeobox), Msx2 (homeobox msh-like 2). Concernant AP-1, il s'est avéré que c-Fos régulaient la prolifération et l'expression génique des ostéoblastes (Grigoriadis et al., 1995; Machwate et al., 1995). Quant à ATF4, il interagit avec Cbfa1/Runx2 pour réguler la transcription du gène codant pour l'ostéocalcine (Gaur et al., 2005). Enfin, Dlx-5 en association avec Msx2 contrôle l'expression de la sialoprotéine osseuse et de l'ostéocalcine (Lian et al., 2006; Marie, 2001b).

### 1.3.2. Les facteurs solubles locaux.

Plusieurs facteurs de croissance sont d'importants régulateurs de recrutement, de la différenciation et de la fonction de l'ostéoblaste. Ils vont favoriser l'expression par les ostéoblastes de plusieurs cytokines. Les facteurs les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes et qui s'incorporent dans la matrice osseuse et seront libérés lors de la résorption osseuse, c'est-à-dire les IGFs, le TGF $\beta$ , les BMPs, et le FGF.

L'IGF1 active la prolifération ostéoblastique et la synthèse de collagène de type I *in vitro* et la formation osseuse *in vivo* (Koch et al., 2005; Radcliff et al., 2005).

Le TGF $\beta$  est un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogenèse. Il stimule la formation osseuse, la prolifération des précurseurs ostéoblastiques ainsi que la production de collagène de type I et de l'ostéopontine. Il diminue également la dégradation de la matrice en inhibant l'activité de la collagénase et a un effet anti-apoptotique sur les ostéoblastes. En dehors de ses effets anaboliques, le TGF $\beta$  contrôle la différenciation ostéoclastique en augmentant la production de l'ostéoprotégérine par les cellules stromales et les ostéoblastes (Erlebacher and Derynck, 1996; Manolagas, 2000).

Certaines BMPs ont des propriétés ostéoinductives *in vivo*. Les BMPs (2 à 7) appartiennent à la famille des polypeptides TGF $\beta$  et sont produites par les ostéoblastes jouant un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse (développement embryonnaire, cicatrisation des fractures osseuses). Les BMPs agissent en augmentant l'expression de Cbfa1/Runx2 dans les précurseurs ostéoblastiques et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéocalcine dans les ostéoblastes. Dans l'os, l'une des plus importantes BMPs, est la BMP2 qui active Cbfa1/Runx2 alors que la BMP3 inhibe la différenciation des cellules ostéoprogénitrices induites par la BMP2 (Harada and Rodan, 2003; Yamaguchi et al., 2000).

Les FGFs sont également des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes. Ils stimulent la formation osseuse étant donné que toute invalidation de leurs gènes chez la souris conduit à une ostéopénie (Montero et al., 2000). Par exemple, il a été montré que FGF2 avait un effet protecteur contre l'apoptose des ostéoblastes

humains issus de calvaria. De plus, il favorise la production d'ostéocalcine ou la minéralisation de la matrice par les ostéoblastes (Debiais et al., 1998; Debiais et al., 2004).

Enfin, les cytokines jouent un rôle important dans le remodelage osseux. L'IL11 stimule la formation d'ostéoblastes à partir des cellules souches mésenchymateuses. L'action d'IL11 sur les os s'effectue en augmentant l'action de la BMP-2 sur les ostéoblastes et en stimulant leur différenciation et leur prolifération (Sims et al., 2005). De plus, les ostéoblastes et leurs précurseurs produisent également des cytokines inflammatoires comme l'IL1. Cette cytokine inhibe la formation osseuse par les ostéoblastes en diminuant l'expression de la phosphatase alcaline (Zhang et al., 1996b).

Ainsi, il apparaît clairement que l'ostéoformation est sous le contrôle de facteurs agissant au niveau de l'engagement des cellules mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique, de la prolifération des préostéoblastes ou de la différenciation en ostéoblastes.

### 1.3.3. Les facteurs solubles systémiques.

Les hormones les plus importantes contrôlant l'ostéoformation sont l'hormone parathyroïdienne (PTH), les stéroïdes sexuels en particulier les œstrogènes, les glucocorticoïdes et la vitamine D.

La PTH sécrétée par les parathyroïdes, régule la calcémie et le métabolisme osseux. Son action s'exerce sur les os, les reins et les intestins. La sécrétion de la PTH est étroitement régulée par la concentration sérique en calcium ionisé. Ainsi, une diminution de la calcémie provoque une augmentation de la PTH en quelques secondes et inversement une augmentation de la calcémie induit une diminution de la sécrétion de la PTH.

*In vivo*, l'administration intermittente de la PTH stimule la formation osseuse, tandis qu'une administration continue stimule plutôt la résorption du tissu osseux. *In vitro*, elle induit un arrêt du cycle cellulaire des ostéoblastes en phase G1 et stimule leur différenciation (Kim et al., 2003; Qin et al., 2005). L'effet majeur de la PTH sur la différenciation des ostéoblastes passe par sa fixation sur son récepteur PTHR1 et l'activation des facteurs de transcription AP-1 et Runx2 grâce à la PKA (Nakao et al., 2009; Swarthout et al., 2002; Zhou et al., 2011). Il s'avère également que la PTH augmente l'expression d'IGF1 qui augmenterait

les effets de la PTH sur la formation osseuse (Linkhart and Mohan, 1989; McCarthy et al., 1989; Wang et al., 2007b).

La vitamine D est rapidement stockée dans le tissu adipeux (réserve mobilisable plusieurs mois) ou est métabolisée. Elle est impliquée dans l'homéostasie du calcium et du phosphate et stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphate. La métabolisation de la vitamine D se fait en deux étapes. La première se fait dans le foie où elle subit une hydroxylation en position 25. La deuxième se fait dans le rein où elle est hydroxylée en position 1 par une hydroxylase. Les taux de 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D sont maintenus stables par le contrôle de l'activité de l'hydroxylase par la PTH.

Au niveau de l'os, elle active la différenciation et la maturation des ostéoblastes en présence de PTH. A doses physiologiques, l'effet est anabolique et les ostéoblastes sécrètent la matrice osseuse. A doses importantes, l'effet est inverse. Elle régule aussi l'homéostasie calcique en agissant sur la parathyroïde, où elle induit une suppression de la prolifération des cellules parathyroïdiennes qui sécrètent la PTH.

La 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D agit par l'intermédiaire d'un récepteur à la vitamine D (VDR) nucléaire. L'invalidation du gène codant pour VDR, chez la souris, induit une diminution de la formation osseuse. A l'inverse, sa surexpression favorise la formation de l'os à partir du périoste. Elle stimule également l'expression de gènes ostéoblastiques comme l'ostéopontine et l'ostéocalcine, ce dernier effet impliquant *Cbfa1* (St-Arnaud, 2008; Yoshizawa et al., 1997). Elle stimule également l'expression de RANKL par les ostéoblastes pour favoriser l'ostéoclastogenèse (Kearns et al., 2008; Thomas et al., 2001a). Ainsi, il semblerait que la 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D participerait d'une part au maintien des taux calciques dans le sang et d'autre part à la formation osseuse (Anderson and Atkins, 2008).

Les stéroïdes et notamment les œstrogènes sont avant tout des inhibiteurs de la résorption osseuse. Les œstrogènes exercent des effets directs et indirects importants sur les ostéoblastes (Parikka et al., 2005). Les ostéoblastes expriment les récepteurs de type  $\alpha$  et  $\beta$  (Wiren et al., 2002). Le rôle de ces récepteurs dans le contrôle de l'ostéogenèse reste cependant à établir. *In vitro*, les œstrogènes augmentent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ainsi que la prolifération des précurseurs *via* une augmentation de la production de facteurs locaux tels que le TGF et l'IGF. Les ostéoporoses liées à une carence œstrogénique post-ménopausique démontrent clairement l'importance de la régulation de la

différenciation ostéoblastique par les œstrogènes (Leung et al., 2004; Venken et al., 2005). Les œstrogènes ont en plus des effets anti-apoptotiques sur les ostéoblastes.

Un effet similaire a été également observé pour la testostérone qui participe à la formation osseuse en augmentant la prolifération des ostéoblastes (Maus et al., 2008). De plus, pour des hommes âgés, un traitement à la testostérone semble diminuer la perte osseuse liée à l'âge (van den Beld et al., 2000).

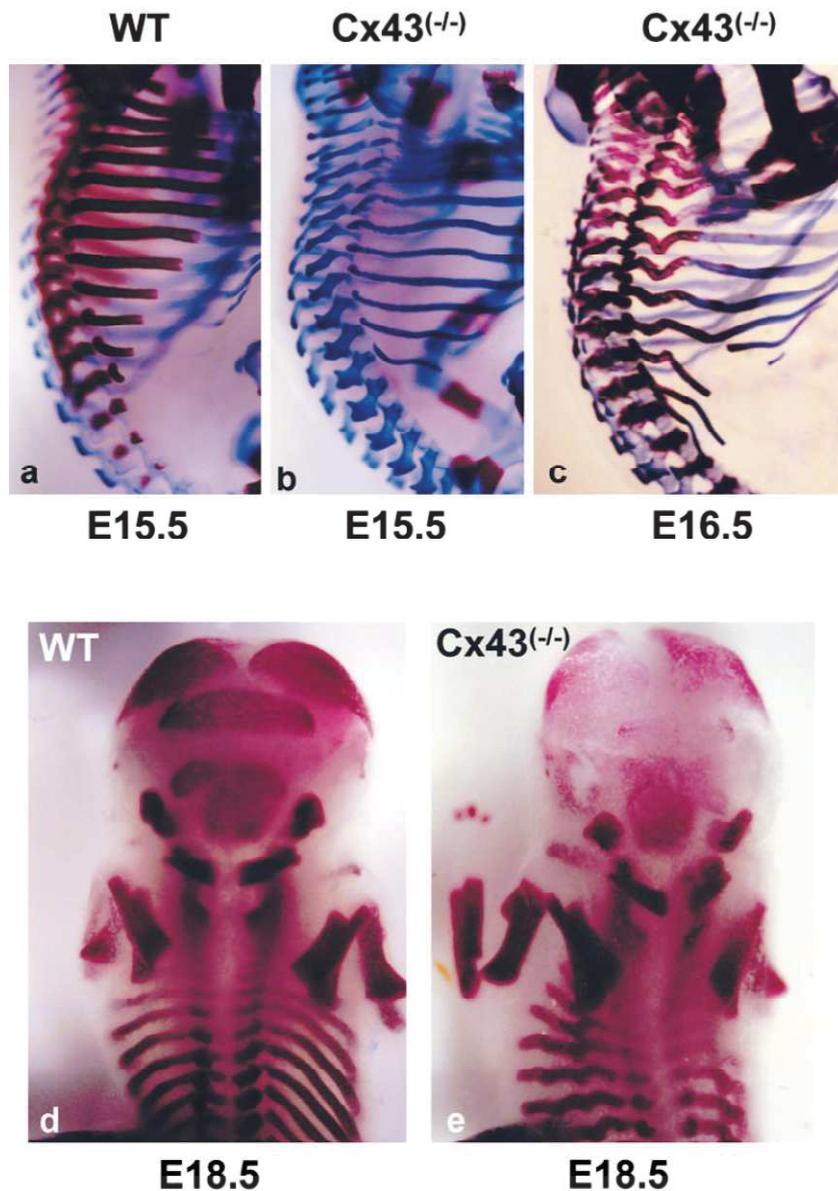
Les glucocorticoïdes, à des doses importantes, ont des effets cataboliques sur l'os en inhibant la synthèse d'IGF-1 par les ostéoblastes et en diminuant l'expression de la BMP2 et de Cbfa1 (Manolagas, 2000). Cependant, il a été montré qu'à des doses physiologiques, ils pourraient favoriser la différenciation ostéoblastique (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006).

#### *1.3.4. Les interactions cellulaires.*

En plus des facteurs cités précédemment, des interactions cellulaires sont capables de moduler la différenciation ostéoblastique. De nombreuses protéines sont impliquées telles que les cadhérines, les connexines et les intégrines.

Les cadhérines qui participent à l'adhérence cellule/cellule sont exprimées par les progéniteurs ostéoblastiques et sont présentes tout au long de la différenciation. En effet, l'expression de la R-cadherine/cadherine4 est rapidement perdue et est remplacée par la cadherine-11 et la N-cadherine. Différentes études ont montré que le blocage de l'expression de la N-cadherine empêchait la différenciation des ostéoblastes. En effet, la N-cadherine favoriserait la différenciation ostéoblastique en induisant l'expression de Cbfa1/Runx2 (Cheng et al., 2000; Ferrari et al., 2000). La cadherine-11 est très spécifique de l'os même si elle a été retrouvée faiblement exprimée dans le cerveau, les poumons et les testicules. Elle est également importante pour la différenciation des ostéoblastes puisque des souris invalidées pour cette cadherine présentent des défauts de minéralisation au niveau craniofacial. Elle pourrait participer à la migration des ostéoblastes aux sites d'ossification lors de leur différenciation (Kawaguchi et al., 2001a; Kawaguchi et al., 2001b).

Les intégrines sont les principales protéines assurant l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Des études ont montré que les sous-unités  $\alpha 1$  à 6,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 5$



(D'après Lecanda et al., 2000)

**Figure 23 : Effet de la délétion du gène de la Cx43 sur le développement axial chez la souris.**

Les photographies a, b et c représentent une vue latérale des vertèbres du thorax colorées au rouge d'alizarine (tissu osseux) et au bleu alcian (tissu cartilagineux) à différents jours de vie embryonnaire (E15.5 et E16.5) chez la souris homozygotes  $Cx43^{+/+}$  ou  $Cx43^{-/-}$ . Ces photographies illustrent le retard d'ossification au niveau des vertèbres et les déformations costales suite à l'absence d'expression de la Cx43. Les photographies d et e représentent une vue dorsale des embryons homozygotes  $Cx43^{+/+}$  ou  $Cx43^{-/-}$  colorés au rouge d'alizarine permettant de visualiser un retard d'ossification de la région cranio-faciale après 18.5 jours de vie embryonnaire.

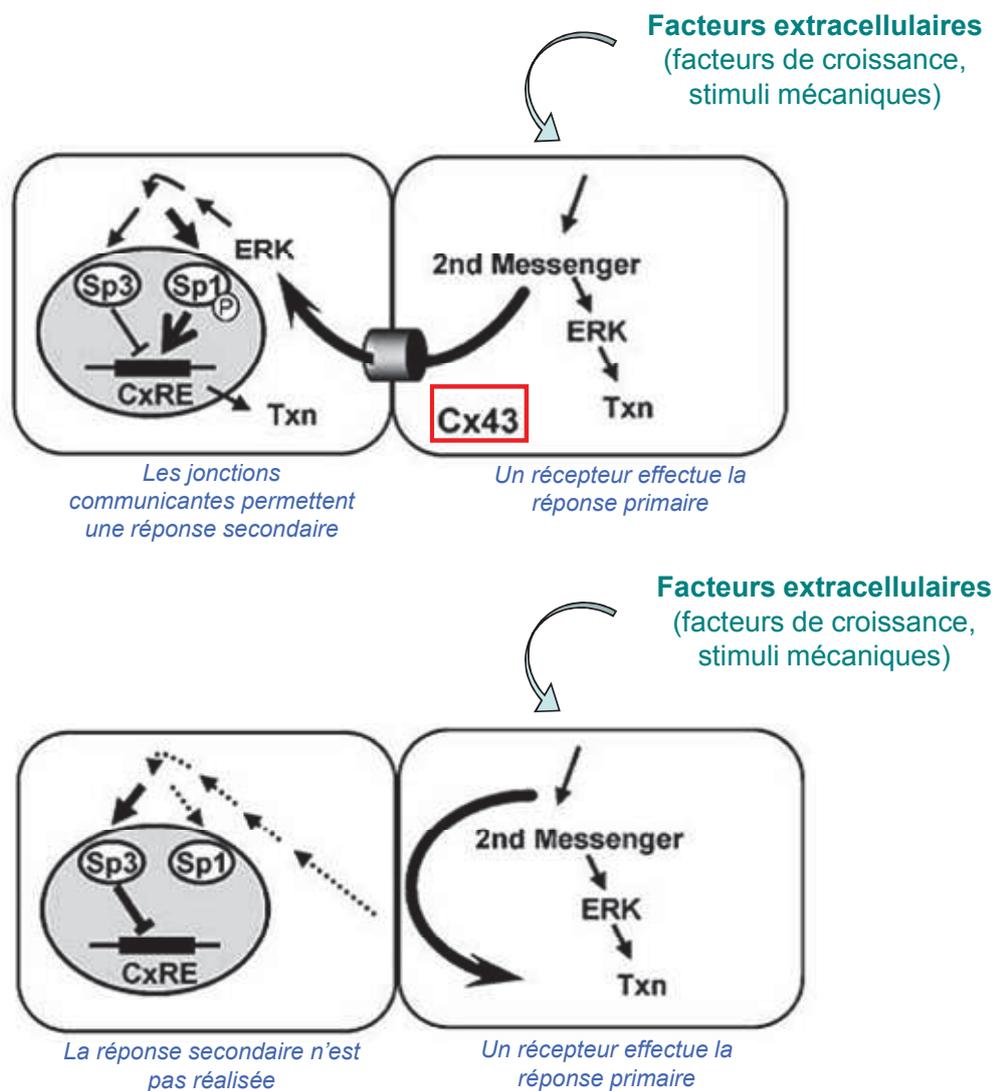
étaient exprimées à différents stades de la différenciation des ostéoblastes. En plus de participer à l'adhérence des ostéoblastes, elles peuvent également activer des facteurs de transcription tels qu'AP-1 et favoriser ainsi la prolifération des cellules. De plus, des souris exprimant un dominant négatif de la sous-unité  $\beta 1$  présentent une forte réduction de la formation osseuse (Cowles et al., 2000; Siebers et al., 2005).

Dans le contexte de notre étude, il est important de considérer le rôle des connexines dans la différenciation des ostéoblastes.

#### ***1.4. La communication jonctionnelle et le tissu osseux.***

Les jonctions communicantes ont été identifiées au niveau des ostéoblastes, des ostéocytes et également des ostéoclastes par microscopie électronique (Doty, 1981; Stanka, 1975). Les ostéoblastes expriment principalement la Cx43 et faiblement la Cx45. Ils expriment également la Cx46 mais elle présente un défaut d'adressage et reste piégée dans le Golgi (Civitelli et al., 1993; Donahue et al., 1995; Koval et al., 1997). La Cx43 dans les ostéoclastes participerait à la fusion des cellules. En effet, le blocage de la communication jonctionnelle empêche la fusion des ostéoclastes et diminue donc leur capacité de résorption de la matrice osseuse (Ilvesaro et al., 2001; Ilvesaro et al., 2000).

Les études génétiques chez l'homme et la souris ont permis de comprendre l'importance de la Cx43 dans le développement et le renouvellement osseux. En effet, les souris invalidées pour la Cx43 présentent des défauts d'ossification intramembraneuse et endochondrale liées à des malformations craniofaciales et à des défauts de minéralisation (Lecanda et al., 2000) (Figure 23). Les ostéoblastes issus des calvaria de ces souris ont une capacité de différenciation réduite avec des problèmes de minéralisation accompagnés d'une diminution d'expression d'ostéocalcine, du collagène de type 1 et de la sialoprotéine osseuse. De plus, les souris hétérozygotes pour la Cx43 présentent également des retards d'ossification et l'étude des ostéoblastes montrent une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline et également une diminution d'expression de l'ostéocalcine (Geneau et al., 2010). D'autres études ont porté sur des stratégies antisens ou la surexpression de la Cx45 dans des lignées ostéoblastiques confirmant l'implication de la Cx43 dans la différenciation ostéoblastique. La Cx45 semble diminuer les capacités de la Cx43 et affecter le phénotype des ostéoblastes (Lecanda et al., 1998). La modulation de l'expression de l'ostéocalcine ou du collagène de



(Modifiée d'après Stains et Civitelli, 2005)

**Figure 24 : Hypothèse du mécanisme d'action de la Cx43 dans le contrôle des gènes associés à la différenciation comme l'ostéocalcine.**

Des facteurs extracellulaires tels que les facteurs de croissance ou des stimuli mécaniques induisent la libération de seconds messagers (par exemple, IP3, AMPc, Ca<sup>2+</sup>), conduisant à une réponse primaire cellulaire. Cette réponse est indépendante des jonctions communicantes. En présence de la communication jonctionnelle due à la présence de la Cx43, la propagation intercellulaire de seconds messagers peut être effectuée, activant la cascade de signalisation ERK, conduisant à une réponse secondaire dans la seconde cellule. Ces signaux activent SP1, le transactivateur du gène codant l'ostéocalcine, qui se lie au domaine CxRE, conduisant à une transcription robuste (TXN). Lorsque la communication est perturbée, la réponse cellulaire est atténuée, en raison de l'échec de propagation des signaux entre les cellules.

type 1 semblerait liée à l'activation du facteur de transcription Sp1, celui-ci est régulé par les signaux transmis à travers les canaux formés de Cx43, se liant au domaine CxRE (Connexin Response Element) sur le promoteur de leur gène. Dans les cellules couplées, Sp1 se lierait à des régions riches en CT présentes dans les promoteurs de ces gènes. A l'inverse, lorsque la communication est rompue, le rapport Sp1/Sp3 diminuerait. Le recrutement de Sp3 entraînerait une diminution de la transcription de ces gènes (Stains and Civitelli, 2005) (Figure 24).

De plus, une mutation du gène codant pour la Cx43 est associée à une maladie chez l'homme, décrite précédemment, appelée ODDD (dysplasie oculodentodigitale). Cette pathologie est caractérisée par des malformations des membres et des anomalies au niveau du crâne et des dents (Paznekas et al., 2003).

Des études, sur des lignées ostéoblastiques, ont également pu mettre en évidence que la Cx43 permettait de potentialiser les effets de la PTH. En effet, une inhibition de la communication jonctionnelle dans ces cellules altère la réponse des ostéoblastes à la PTH. Les souris dont l'expression de la Cx43 est diminuée dans les ostéoblastes présentent des retards d'ossification et les effets de la PTH sont bloqués par l'absence de la Cx43. De plus, un des effets de la PTH est d'augmenter l'expression de la Cx43 (Chung et al., 2006; Massas and Benayahu, 1998; Schiller et al., 2001; Schiller et al., 1992).

Par ailleurs, la Cx43 régule les effets d'autres facteurs tels que l'endothéline 1 (ET-1). En effet, l'ET-1 accroît la prolifération et ralentit la différenciation des ostéoblastes Cx43<sup>+/+</sup> alors que son effet est aboli lorsque les ostéoblastes ont une diminution d'expression de la Cx43. Ainsi, la Cx43 semble importante pour que l'ET-1 puisse influencer le phénotype des ostéoblastes (Geneau et al., 2010; Niger et al., 2008).

Une autre fonction de la communication jonctionnelle est de transmettre des signaux mécaniques, correspondant à la mécanotransduction, générés parmi les ostéocytes et les ostéoblastes (Alford et al., 2003; Saunders et al., 2001; Ziambaras et al., 1998). Il a été montré qu'un stress mécanique augmentait l'expression de la Cx43 et de la CIJG. De même, l'inhibition de la communication jonctionnelle dépendante de la Cx43 par l'utilisation d'une stratégie antisens entraîne une diminution de la libération de prostaglandine de type E2

Tumeur primaire	Incidence post mortem des métastases osseuse (%)
Sein	73
<b>Prostate</b>	<b>68</b>
Thyroïde	42
Poumon	36
Rein	35
Mélanome	35
Tractus gastrointestinal	5
Ovaires	0.1

(Modifié d'après Suva et al., 2011)

**Tableau 3 : Incidence des métastases osseuses dans différents types de cancer.**

normalement induite lors d'un stress mécanique. Dans les conditions physiologiques, la PGE2 module à son tour l'expression de la Cx43 (Saunders et al., 2003).

Parmi les différents mécanismes de propagation, les jonctions communicantes peuvent également générer des vagues calciques entre les ostéoblastes. Ce mode de propagation par les jonctions communicantes fait intervenir un influx de calcium par l'intermédiaire de canaux voltage dépendants de type L. C'est alors la diffusion d'IP3 ou d'autres seconds messagers qui vont être à l'origine de la transmission de ce signal calcique (Jorgensen et al., 1997; Jorgensen et al., 2000; Jorgensen et al., 2003).

Des études ont également suggéré un rôle de la Cx43 non lié à la communication jonctionnelle mais à sa fonction d'hémicanal. En effet, les effets des bisphosphonates connus pour inhiber l'apoptose des ostéoblastes seraient dépendants de la Cx43 mais pas de la communication jonctionnelle. Cet impact serait dû à la formation d'hémicanaux dont l'activation déclencherait une cascade d'activation passant par ERK (Plotkin et al., 2002).

Enfin, il a été montré que la Cx43 était importante pour établir une communication hétérocellulaire entre les progéniteurs ostéoblastiques et les cellules endothéliales (HUVEC). En effet, un contact direct entre ces deux types cellulaires accroît la différenciation des ostéoblastes caractérisée par une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et de la synthèse du collagène de type 1. De plus, les cellules expriment la Cx43 et l'effet est aboli après l'utilisation du 18 $\alpha$ -glycyrrhétinique, un inhibiteur de la communication intercellulaire (Guillot et al., 2004; Santos et al., 2009; Villars et al., 2002).

## **2. Les métastases osseuses.**

### ***2.1. Généralités.***

Les métastases constituent une complication fréquente de certains cancers. L'os est le site privilégié du développement de métastases des cancers humains les plus fréquents tels que les cancers du poumon, du sein et de la prostate. Les métastases osseuses se développent chez 15 à 30% des individus atteints d'un cancer du poumon et dans 80% des cas de cancer du sein ou de la prostate au stade avancé (Tableau 3).

Elles constituent un réel problème dans l'évolution du cancer car elles sont souvent incurables et leur apparition affecte le pronostic vital et détériore la qualité de vie des patients.

En effet, elles peuvent être responsables de violentes douleurs, de fractures osseuses, de compressions médullaires et d'importantes perturbations du métabolisme phosphocalcique. Le traitement local des métastases osseuses est principalement de nature palliative. La radiothérapie est le moyen le plus efficace pour calmer les douleurs osseuses liées aux métastases osseuses. Elle entraîne une diminution des douleurs dans 85 à 90% des cas. Le but du traitement est de réduire les douleurs afin d'améliorer la qualité de vie et de diminuer la prolifération des cellules tumorales métastatiques. Les traitements actuels des métastases osseuses sont imparfaits et souvent d'une efficacité limitée dans le temps. D'autres stratégies émergent pour lutter contre les effets osseux des métastases. En effet, les bisphosphonates prévenant la résorption osseuse en bloquant l'activité des ostéoclastes sont très utilisés. Ils peuvent également réduire la croissance des cellules tumorales prostatiques et diminuent le risque de complications osseuses. Il faut savoir que les anticorps contre le RANKL inhibent la formation des ostéoclastes alors que les anticorps anti-Runx2 préviennent la différenciation des ostéoblastes (Cleardin and Teti, 2007; Dunstan et al., 2007; Santini et al., 2010).

De nombreuses études se sont intéressées aux métastases osseuses afin de savoir pourquoi l'os est un site privilégié. Dès 1889, Stephen Paget émet l'hypothèse du « seed and soil », autrement dit « la graine et le sol ». Il suggère ainsi que certaines tumeurs « les graines » possèdent une affinité spécifique pour métastaser dans certains organes particuliers, qu'il qualifie de « sol ». Il pose l'hypothèse d'une compatibilité entre « la graine et le sol » qui détermine si les cellules tumorales vont former ou non des métastases dans un site spécifique. Plus tard, en 1928 James Ewing proposa une théorie alternative pour expliquer la prévalence des métastases dans certains sites particuliers. Il suggère que les cellules tumorales sont capables de se développer dans un site distant de la tumeur primaire car les cellules y sont transportées de manière privilégiée par le réseau vasculaire et lymphatique (Ewing, 1928).

Le microenvironnement osseux, décrit précédemment, comprend de nombreux types cellulaires et est très riche en divers facteurs tels que les facteurs de croissance.

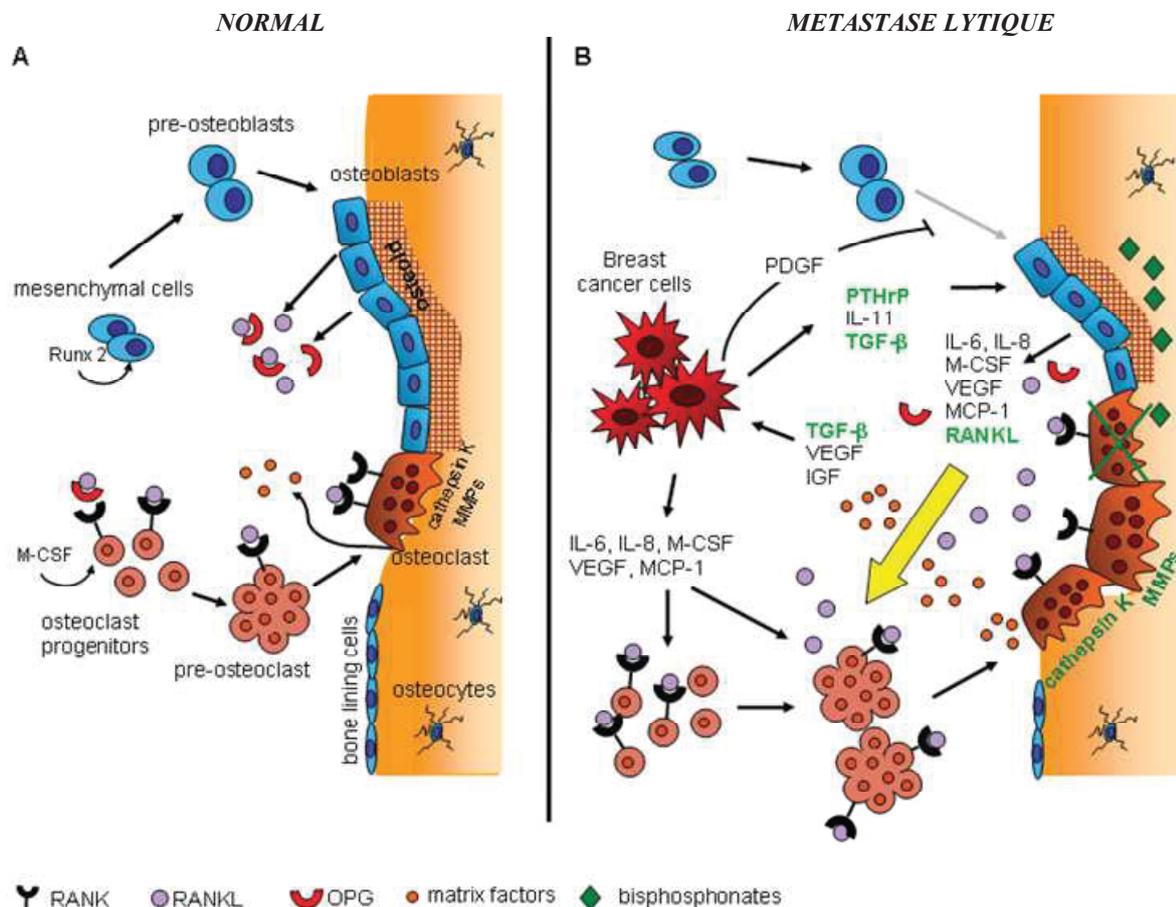
Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes, fibroblastes et ostéoblastes. Les adipocytes sécrètent des facteurs tels que l'IL-6, le TNF $\alpha$ , ou la leptine qui stimule la résorption osseuse et inhibe la prolifération des ostéoblastes. Les facteurs sécrétés par les adipocytes sont également impliqués dans la prolifération, l'invasion et l'angiogénèse des cellules tumorales mammaires

(Iyengar et al., 2003; Maurin et al., 2000). Les fibroblastes, quant à eux, contribuent également aux métastases osseuses du cancer du sein par exemple en sécrétant de la MMP-2 inactive. Cette MMP, une fois activée par les cellules cancéreuses permettra de dégrader la matrice extracellulaire et de participer à la migration des cellules (Saad et al., 2002).

La présence des cellules hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse semble également attractive pour les cellules cancéreuses. En effet, ces cellules peuvent se différencier notamment en plaquettes, érythrocytes ou en lymphocytes T. Les plaquettes permettent aux cellules cancéreuses d'adhérer et d'échapper au système immunitaire dans les vaisseaux sanguins (Palumbo et al., 2005). Quant aux lymphocytes T, une activation importante de la résorption engendre une forte libération dans le milieu extracellulaire du TGF- $\beta$  qui inhibe la prolifération et l'activité de ces cellules, permettant une fois de plus aux cellules cancéreuses d'échapper à la surveillance du système immunitaire (Bussard et al., 2008; Fournier et al., 2006). De plus, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont originaires de cellules monocytaires. Ils vont jouer un double rôle, inhibiteur et activateur de l'évolution tumorale. Même si leur activation va tuer de nombreuses cellules tumorales, ils sécrètent malgré tout des facteurs de croissance, des cytokines et des protéases qui participent à la croissance tumorale. Par exemple, la sécrétion d'IL-10 permet de supprimer la réponse cytotoxique des lymphocytes T en réponse à la présence des cellules tumorales dans l'os (Brigati et al., 2002; Schoppmann et al., 2002).

De plus, les ostéoblastes sécrètent de nombreux facteurs qui seront ensuite piégés dans la matrice osseuse. Durant la phase de résorption, ces facteurs incluant le TGF $\beta$ , le PDGF, ou encore les BMPs vont être libérés et vont être soit activés par le faible pH généré par les ostéoclastes, soit par la présence de protéases présentes dans le microenvironnement (Cleardin and Teti, 2007).

Un cercle vicieux est établi lors de la formation des métastases osseuses consistant à la perturbation du microenvironnement osseux initié par les cellules tumorales qui produisent divers facteurs. Mais il s'avère que les cellules cancéreuses ayant métastasé dans la moelle osseuse peuvent rester dans une phase de dormance pendant des années. Cela semble expliquer le fait que les patients ayant subi une exérèse de la prostate ou de la glande mammaire après la détection d'une tumeur primaire, développent des années après des métastases osseuses (Cameron et al., 2000; Karrison et al., 1999). Les ostéoblastes ont un rôle fondamental dans la phase de quiescence à long terme des cellules souches hématopoïétiques



(D'après Chen et al., 2010)

**Figure 25 : Schéma représentant le cercle vicieux des métastases ostéolytiques du cancer du sein.**

**A)** Le microenvironnement osseux en condition normale lors du renouvellement osseux. Les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes *via* Runx2 pour permettre la synthèse de matrice osseuse. La dégradation de la matrice osseuse est effectuée par les ostéoclastes dérivant des cellules hématopoïétiques grâce notamment au M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et à RANKL (Receptor Activator for NFκb) produit par les ostéoblastes. Les ostéoblastes contrôlent la dégradation de la matrice osseuse par la sécrétion d'un antagoniste l'OPG (ostéoprotégérine). **B)** Les cellules cancéreuses mammaires sécrètent PTHr-P (ParaThyroid Hormone related Peptide), des cytokines (IL-6, IL-1) et des facteurs de croissance qui inhibent l'activité des ostéoblastes et qui activent les ostéoclastes. Le ratio RANKL/OPG augmente, activant les ostéoclastes et favorisant la résorption. Ici, les bisphosphonates représentent un des traitements utilisés induisant l'apoptose des ostéoclastes.

et ceci par des interactions cellulaires dus à la N-cadhérine. De ce fait, des hypothèses ont émergé sur l'implication des ostéoblastes exprimant la N-cadhérine dans la phase de quiescence des cellules tumorales métastatiques. Mais à l'heure actuelle, peu de données existent sur cet état de dormance des cellules tumorales (Clezardin and Teti, 2007).

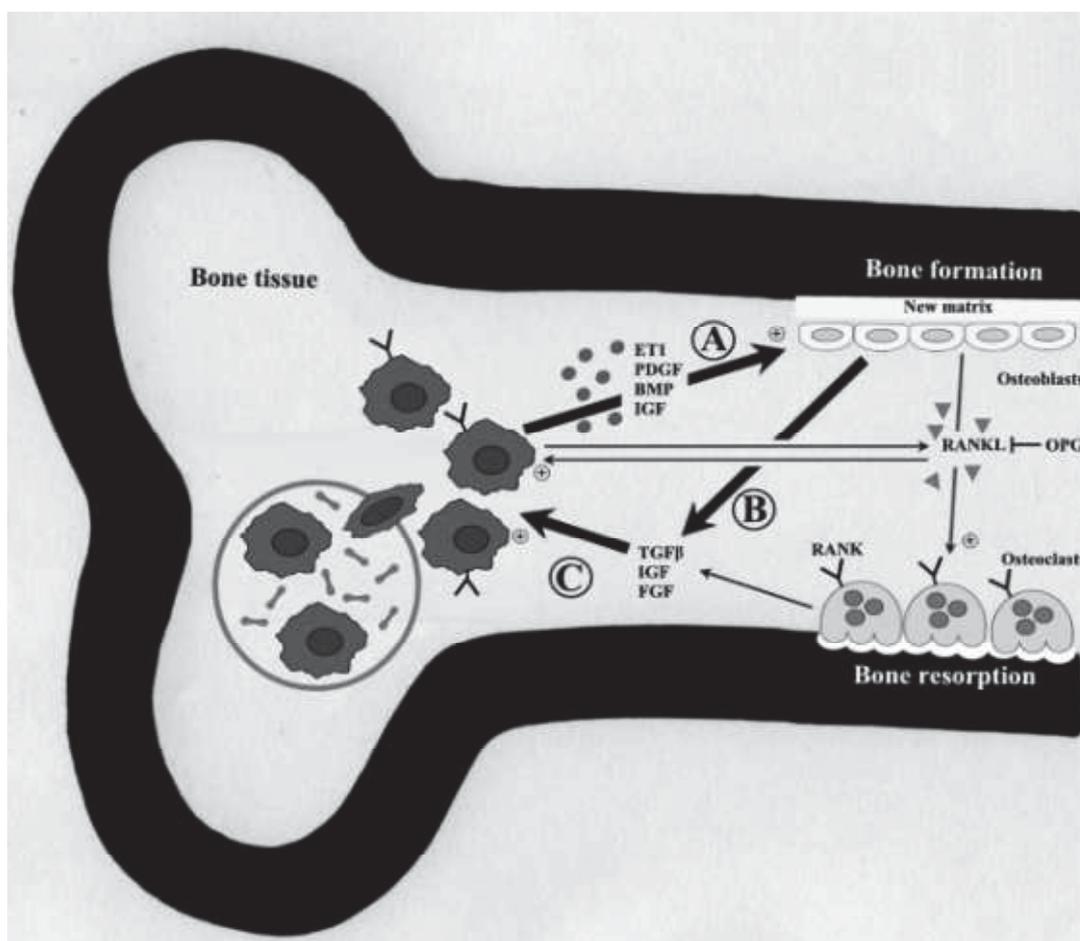
## ***2.2. Catégories de métastases osseuses.***

Il existe deux catégories de métastases : ostéoblastiques ou ostéolytiques. Les métastases ostéoblastiques ou ostéocondensantes sont caractérisées par une activité accrue des ostéoblastes qui se traduit par une augmentation de la densité osseuse. Les lésions ostéolytiques, quant à elles, résultent d'une résorption de l'os due à une stimulation accrue des ostéoclastes. Néanmoins, des métastases mixtes peuvent être observées chez les patients, possédant les deux types de lésions.

### ***2.2.1. Métastases ostéolytiques.***

Forme la plus commune des métastases, la lésion dominante est lytique et destructrice bien que des formations osseuses locales puissent être également observées. Les lésions ostéolytiques sont principalement localisées au niveau du crâne et des extrémités proximales des os longs. *In vivo*, des études ont montré que l'ostéolyse était due à une stimulation des ostéoclastes et une diminution de l'activité des ostéoblastes (Figure 25). Les cellules tumorales produisent des facteurs qui stimulent, directement ou indirectement, l'activité résorbante des ostéoclastes. Tout d'abord, le PTHrP (ParaThyroid-Hormone-related Peptide) est très exprimé dans les métastases osseuses du cancer du sein. En effet, l'utilisation d'un anticorps neutralisant le PTHrP prévient les métastases osseuses induites chez la souris (Powell et al., 1991; Southby et al., 1990). Le PTHrP se fixerait au récepteur PTH-R1 et induirait l'expression du RANKL par les ostéoblastes. De plus, l'IL-6, une interleukine très exprimée dans les cancers du rein, de la vessie et du sein est également un facteur stimulant la formation des ostéoclastes et potentialiserait les effets de PTHrP (de la Mata et al., 1995; Kurihara et al., 1990).

La voie Wnt participe à la différenciation des ostéoblastes lorsque ce facteur se fixe sur ses récepteurs LRP-5/6 présents sur la membrane plasmique des ostéoblastes. Dickkopf-related Protein1 (DKK1) est un antagoniste soluble de la voie Wnt qui en se liant au récepteur réduit l'activité des ostéoblastes et augmente le ratio RANKL/OPG permettant d'accroître



(D'après Ibrahim et al., 2010)

**Figure 26 : Schéma représentant le cercle vicieux des métastases ostéoblastiques du cancer de la prostate.**

**A)** Les cellules cancéreuses prostatiques sécrètent des facteurs de croissance ostéogéniques, activant les ostéoblastes pour déposer la matrice osseuse. **B)** Les ostéoblastes sécrètent une série de facteurs supplémentaires tels que l'IGF (Insulin like Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth factor), le TGFβ (Transforming Growth Factor). **C)** Les cellules cancéreuses sont attirées par ces facteurs qui favorisent également leur prolifération.

l'activité des ostéoclastes. Ainsi, dans la lignée cancéreuse prostatique PC-3 connue pour développer des métastases ostéolytiques, il a été montré que l'inhibition de l'expression de DKK1 amène les cellules PC-3 à développer des métastases de type ostéoblastique (Hall et al., 2005; Kawano and Kypta, 2003; Spencer et al., 2006). Par ailleurs, des taux élevés de DKK1 dans le sang est associé à la présence de lésions ostéolytiques chez des patients atteints de myélome multiple (Tian et al., 2003)

D'autres facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses mammaires peuvent également stimuler l'activité des ostéoclastes tels que l'IL-8, l'IL-11, CTGF (Connective Tissue Growth Factor, impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire) ou la MMP-1 (Garcia et al., 2008).

De plus, la résorption de l'os aboutit à la libération dans le microenvironnement de facteurs de croissance tels que le TGF $\beta$ , le FGF, l'IGF et la BMP-2. Il a été montré que la libération du TGF $\beta$  du microenvironnement osseux active et stimule la production de PTHrP par les cellules cancéreuses mammaires. Les ostéoclastes sont ensuite activés et résorbent l'os correspondant à l'établissement d'un cercle vicieux (Yin et al., 1999). De plus, la sécrétion du TGF $\beta$  inhibe la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (Natural Killer) diminuant l'activité du système immunitaire (Fournier et al., 2006).

### 2.2.2. Métastases ostéoblastiques.

Le cancer de la prostate est le cancer prédominant pour ce type de métastases et 15 à 20% des cancers mammaires développent ce type de lésions. Les lésions ostéoblastiques sont principalement retrouvées sur le squelette axial au niveau des vertèbres et du bassin où les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs favorisant le développement de métastases ostéocondensantes (Figure 26).

L'ET-1 est un médiateur important des métastases ostéoblastiques (Guisse et al., 2003). Son expression est fortement augmentée dans le sérum de patients souffrant de lésions ostéoblastiques et des souris invalidées pour le gène codant pour l'ET-1 présentent des hypoplasies des os du visage (Kurihara et al., 1994; Yin et al., 2003). Les cellules cancéreuses prostatiques expriment l'ET-1 ainsi que son récepteur ET<sub>A</sub> suggérant des effets autocrines et paracrines. Il participe notamment à l'inhibition de la motilité des ostéoclastes et de la

résorption osseuse et augmente la prolifération des ostéoblastes (Alam et al., 1992; Geneau et al., 2010).

Des protéases ont également été impliquées dans les métastases de type ostéoblastique telles que l'Activateur du Plasminogène de type urokinase (uPA) et la PSA. En effet, la surproduction de l'uPA par les cellules cancéreuses prostatiques accroît le développement de métastases osseuses et l'utilisation d'une stratégie antisens de l'uPA dans les cellules cancéreuses prostatiques diminue le nombre de métastases osseuses (Achbarou et al., 1994; Rabbani et al., 1990). Concernant la PSA, elle peut cliver le PTHrP empêchant d'activer les ostéoclastes et donc de diminuer la résorption osseuse. Elle peut également activer le TGF $\beta$  qui est un facteur de croissance pour les ostéoblastes (Killian et al., 1993; Yin et al., 2005).

Enfin, les BMPs appartenant à la superfamille du TGF $\beta$  induisent la formation osseuse en stimulant la différenciation ostéoblastique par l'activation de Runx2. Les cellules cancéreuses prostatiques expriment la BMP-4, la BMP-6 et la BMP-7 favorisant ainsi la formation osseuse (Brubaker et al., 2004; Ide et al., 1997).

### ***2.3. Ostéomimétisme.***

Lorsque des cellules tumorales sont présentes au niveau osseux, un phénomène d'ostéomimétisme peut parfois être observé. Les cellules tumorales acquièrent alors les propriétés des cellules osseuses, leur permettant d'améliorer leur adhérence, leur prolifération et leur survie dans le microenvironnement osseux. Après le développement de métastases osseuses par injection intracardiaque chez la souris, il a été montré que des cellules cancéreuses mammaires B02 présentaient des variations d'expression de certains gènes par rapport aux cellules non métastatiques. Il a été montré une augmentation de l'expression d'un facteur de croissance ostéogénique le FGF13, une glycoprotéine fortement exprimée dans l'os et participant à la survie et à la maturation des ostéoblastes nommée ostéonectine. La cadhérine-11, très exprimée par les ostéoblastes, est elle aussi fortement exprimée dans les cellules B02 après le développement de métastases osseuses. Elle faciliterait l'interaction des cellules cancéreuses avec les ostéoblastes afin de permettre la croissance tumorale (Bellahcene et al., 2007; Garcia et al., 2008). Des facteurs peuvent également être réprimés comme la thrombospondine 1 (TSP1) qui est un inhibiteur de la minéralisation ou encore noggin (NOG) qui se lie à la BMP-2, la BMP-4, la BMP-6 et la BMP-7 empêchant la liaison à

leur récepteur diminuant ainsi la différenciation ostéoblastique (Aspenberg et al., 2001; Zimmerman et al., 1996). La Cx43 a été aussi décrite comme une protéine favorisant le développement de métastases osseuses et permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter à l'environnement osseux (voir paragraphe ci-dessous) (Bellahcene et al., 2007; Clezardin and Teti, 2007).

La cathepsine K est une protéase lysosomale fortement exprimée par les ostéoclastes et participe à la résorption osseuse en agissant sur la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses prostatiques et mammaires augmentent l'expression de cette protéase afin de dégrader le collagène de type 1, un processus important pour l'expansion des cellules tumorales une fois dans l'os (Brubaker et al., 2003; Le Gall et al., 2007).

De plus il a été montré une augmentation de l'expression de protéines présentes dans la matrice osseuse telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse II dans le cancer de la prostate et du sein. En effet, la diminution d'expression de l'ostéopontine et de la sialoprotéine osseuse II dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB- 231 réduit la formation de métastases osseuses après injection chez la souris (Adwan et al., 2004; Campo McKnight et al., 2006; Desai et al., 2007; Huang et al., 2005).

#### ***2.4. Les métastases osseuses du cancer de la prostate.***

Les cellules cancéreuses prostatiques métastasent à distance dans le foie, les poumons, les ganglions lymphatiques et le cerveau, mais le site métastatique principal est le tissu osseux. En effet, dans 80% des cas, les hommes mourant d'un cancer de la prostate ont des métastases localisées dans l'os. Elles sont généralement caractérisées par des lésions de type ostéoblastiques avec des lésions lytiques sous-jacentes (Keller, 2002). Des analyses histopathologiques de métastases osseuses ont montré la présence d'ostéoblastes localisés à côté des cellules cancéreuses prostatiques. Ces lésions sont caractérisées par une augmentation de la masse osseuse accompagnée d'un dépôt important de matrice ostéoïde (Charhon et al., 1983; Cook and Watson, 1968). De plus, les patients atteints de métastases osseuses du cancer de la prostate ont des taux élevés dans leur sérum de marqueurs spécifiques de la différenciation ostéoblastique tels que la phosphatase alcaline ou le protocollagène de type 1 (Jung et al., 2004).

2.4.1. Facteurs exprimés par les cellules cancéreuses prostatiques

Les cellules cancéreuses prostatiques, lors du processus métastatique, vont exprimer des facteurs facilitant le développement de métastases osseuses.

Tout d'abord, elles subissent le processus EMT, décrit précédemment, caractérisé par une perte d'expression de la E-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine associée à une augmentation d'expression de la N-cadhérine pour permettre l'invasion et le développement de métastases osseuses. Une fois arrivées dans le tissu osseux cible, il a été montré que les cellules cancéreuses prostatiques avaient la capacité d'effectuer la transformation inverse (MET) et donc augmenter leur expression en E-cadhérine et en  $\beta$ -caténine (Saha et al., 2008; Tran et al., 1999; Umbas et al., 1994).

De plus, il a été montré que les cellules cancéreuses prostatiques, dans la circulation sanguine, présentaient une affinité préférentielle pour les cellules endothéliales vasculaires osseuses facilitant ainsi leur sortie vers le tissu osseux. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques telles que les cellules PC-3, LNCaP ou DU145 se lient préférentiellement aux cellules endothéliales de la moelle osseuse par rapport à des cellules endothéliales du rein, de la peau ou des poumons (Cooper et al., 2000; Lehr and Pienta, 1998). Il s'avère que la PSA peut avoir un rôle dans le ciblage des cellules cancéreuses prostatiques pour les cellules endothéliales vasculaires de l'os. En effet, les cellules C4-2B transfectées avec un siRNA contre la PSA voient diminuer leur adhérence sur les cellules endothéliales de la moelle osseuse. La PSA permettrait de digérer les composants de l'endothélium de la moelle osseuse pour augmenter l'adhérence et le passage des cellules cancéreuses prostatiques (Romanov et al., 2004). Cette interaction pourrait être également potentialisée par la présence de l'E-selectine, glycoprotéine à un seul domaine transmembranaire, exprimée par les cellules endothéliales vasculaires. Les cellules cancéreuses prostatiques, telles que les cellules PC-3, métastasent dans l'os, expriment le ligand spécifique de l'E-sélectine des cellules endothéliales de la moelle osseuse correspondant à PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1). Au contraire, les lignées DU145 ou encore les cellules LNCaP qui ne métastasent pas dans l'os, expriment un autre type de ligand ESL-1 (E-Selectin Ligand 1) (Dimitroff et al., 2005; Dimitroff et al., 2004).

Les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 peuvent être utilisées comme des marqueurs de pronostic pour étudier l'évolution du cancer de la prostate. En effet, des concentrations importantes de MMP-2 et MMP-9 dans le sang des patients ayant des métastases osseuses ont été mises en évidence (Zhong et al., 2008). D'autres MMPs sont également impliquées telles que la MMP-12 ou la MMP-13. En effet, les cellules PC-3 co-cultivées avec des cellules de la moelle osseuse présentent une augmentation d'expression de la MMP-12 et ceci a été également montré *in vivo* suite à l'injection intra-tibiale de ces mêmes cellules. De plus, l'utilisation d'ARN antisens contre la MMP-12 dans les cellules PC-3 diminue les capacités invasives de ces cellules caractérisées notamment par une diminution de la dégradation du collagène de type 1 (Nabha et al., 2008). Concernant la MMP-13, son expression est augmentée dans les cellules PC-3 et les biopsies de cancer de la prostate ont également montré une corrélation entre la présence de métastases osseuses et le niveau d'expression de la MMP-13 (Daja et al., 2003; Escaff et al., 2010).

Une autre protéase impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire a également été impliquée dans les métastases du cancer de la prostate. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'uPA diminue l'activation de la MMP-2 et la MMP-9 dans les cellules DU145 et PC-3 (Festuccia et al., 1998). De plus, l'utilisation d'ARN antisens contre l'uPA dans les cellules PC-3 diminue l'implantation suite à des injections intra-fémorales associées à une diminution de la destruction osseuse (Dong et al., 2008). Il pourrait également stimuler la prolifération des ostéoblastes en hydrolysant les protéines liées à l'IGF afin d'augmenter le taux d'IGF libre ou de cliver et d'activer le TGF $\beta$  régulant la différenciation des ostéoblastes (Killian et al., 1993; Logothetis and Lin, 2005).

De plus, les cellules cancéreuses prostatiques métastasants dans l'os expriment fortement PAR-1 (Protease-activated receptor 1) un récepteur activé par la thrombine. En effet, PAR-1 participe à l'adhérence, à la migration et à la sécrétion des MMPs par les cellules cancéreuses prostatiques (Cooper et al., 2003; Lafleur et al., 2001).

L'expression des intégrines ou des cadhérines est également importante pour permettre l'adhérence des cellules sur de nouvelles matrices extracellulaires ou de nouveaux types cellulaires. Les cellules cancéreuses prostatiques exprimant  $\alpha v \beta 3$  telles que les cellules PC-3 semblent adhérer plus facilement sur des boîtes de culture recouvertes de vitronectine ou d'ostéopontine, composant de l'os (Zheng et al., 1999; Zheng et al., 2000). Il a été également

Formation osseuse	Résorption de la matrice osseuse
(1) Galectine1	(8) RANKL
(2) BMP-2	(8) IL1
(2) BMP-4	(2) Cathepsin K
(3) BMP-6	(2) TNF $\alpha$
(4) Phosphatase alcaline	(9) DKK1
(4) Pro-collagène 1	(10) TGF $\beta$
(5) ET-1	6) PTHrP
(11) uPA	
(12) PSA	
(7) Sialoprotéine osseuse	
(2) Ostéoprotégérine	

(Modifié d'après Edlund et al., 2004)

**Tableau 4 : Facteurs pouvant être sécrétés par les cellules cancéreuses prostatiques et stimulant la formation osseuse ou la résorption osseuse.**

(1) Andersen et al., 2003; (2) Lee et al., 2003; (3) Autzen et al., 1998; (4) De la Piedra et al., 2003; (5) Guise et al., 2003; (6) Dougherty et al., 1999; (7) Waltregny et al., 2000; (8) Brown et al., 2001; (9) Hall et al., 2005; (10) Jin et al., 2011; (11) Achbarou et al., 1994; (12) Yin et al., 2005

BMP: Bone Morphogenic Protein; ET-1: Endothéline 1; uPA: Urokinase-type Plasminogen Activator; PSA: Prostate Specific Antigen; RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor NF-kB Ligand; IL1: Interleukine 1; TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha; DKK1: Dickkopf-related protein 1; TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor bêta; PTHrP: ParaThyroid-Hormone-related Peptide

montré que les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  augmentaient l'adhérence aux collagène de type 1. Ces deux types d'intégrines semblent importants aux cellules cancéreuses prostatiques pour pouvoir adhérer sur les matrices osseuses. De plus, ces intégrines sont aussi exprimées par les ostéoclastes.

D'une manière intéressante, la cadhérine-11 est très exprimée dans les cellules cancéreuses prostatiques ayant métastasé dans l'os mais n'est pas détectable dans les cellules ayant métastasé dans les autres organes. De plus, la diminution d'expression de cette cadhérine dans les cellules PC-3 réduit l'incidence des tumeurs osseuses après injection intracardiaque alors que la surexpression dans une lignée qui l'exprime faiblement, C4-2B4, accroît leur capacité d'invasion et de migration et également l'interaction avec les ostéoblastes (Bussemakers et al., 2000; Chu et al., 2008; Huang et al., 2010).

Les cellules cancéreuses prostatiques ayant un fort pouvoir métastatique peuvent également exprimer Runx2. Une étude a comparé les cellules PC-3 (très invasives) et les cellules LNCaP (peu invasives) et a montré une nette corrélation entre le niveau d'expression de Runx2 et l'agressivité des cellules. Les cellules PC-3 expriment fortement ce facteur et la diminution d'expression de Runx2 dans ces cellules, par une stratégie antisens, engendre une diminution de l'invasion et de la survie des cellules *in vivo* dans le tissu osseux (Akech et al., 2010).

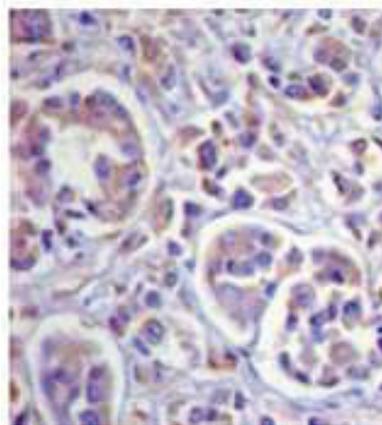
Enfin, les cellules cancéreuses prostatiques sécrètent des facteurs qui influencent le remodelage osseux en agissant sur les ostéoblastes. Le TGF $\beta$ 2 est abondamment exprimé par les cellules PC-3 et la concentration sérique en TGF $\beta$  est plus importante chez les patients ayant des métastases osseuses (Logothetis and Lin, 2005; Shariat et al., 2001). D'autres facteurs cités précédemment tels que l'ET-1, les BMPs, et l'IGF sont également sécrétés par les cellules cancéreuses prostatiques et peuvent activer les ostéoblastes.

Le récapitulatif des facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses prostatiques influençant le microenvironnement osseux est répertorié dans le tableau 4.

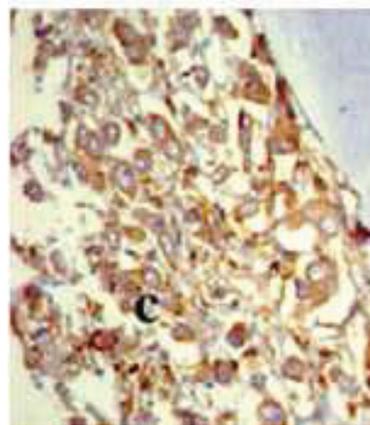
#### 2.4.2. Facteurs présents dans le microenvironnement osseux.

Des facteurs présents dans le microenvironnement osseux peuvent influencer les cellules cancéreuses prostatiques.

**Tumeur primaire**



**Métastase osseuse**



(D'après Bellahcène et al., 2007)

**Figure 27 : Ré-expression de la Cx43 dans les métastases osseuses du cancer du sein.**

Immunomarquage de la Cx43 sur des coupes de tissus de patients atteints d'un cancer du sein. La photographie de gauche correspond à la tumeur primaire alors que la photographie de droite correspond à la métastase osseuse, montrant une augmentation de l'expression de la Cx43 dans les cellules tumorales après métastase dans l'os. (grossissement: x400).

Tout d'abord, la résorption de la matrice osseuse libère des facteurs tels que l'IL-6, le TGF $\beta$  et l'IGF-1 qui agissent aussi bien sur la prolifération des ostéoblastes et des cellules cancéreuses prostatiques (Edlund et al., 2004). De plus, la formation de l'os permet la sécrétion de facteurs qui favorisent la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, l'ostéonectine accroît la migration et l'invasion des cellules PC-3 et DU145 alors que la sialoprotéine osseuse augmente le potentiel métastatique des cellules cancéreuses prostatiques (Jacob et al., 1999; Rosol, 2000).

Les chimiokines (cytokines chimioattractantes) sont une famille de petites protéines, majoritairement solubles, de 8-14 kDa. Le tissu osseux contient des chimiokines qui attirent les cellules cancéreuses prostatiques. Ainsi, le facteur SDF-1 est très élevé dans les métastases osseuses et se fixerait sur son récepteur CXCR4 très fortement exprimé dans les cellules tumorales prostatiques. De plus, il a été montré *in vivo* une diminution des métastases osseuses par injection intra-cardiaque des cellules PC-3 suite à l'utilisation d'anticorps neutralisant CXCR4 (Arya et al., 2004; Sun et al., 2005).

Le milieu conditionné issu de moelle osseuse accroît la prolifération des cellules DU145 et PC-3 alors qu'il n'a aucun effet sur d'autres types de cellules cancéreuses telles que CAK-1 (carcinome de rein métastasant dans la peau) ou encore Calu 1 (carcinome de poumon métastasant dans la plèvre) (Chackal-Roy et al., 1989).

#### 2.4.3. Connexines et métastases osseuses.

A l'heure actuelle, peu d'études ont porté sur le rôle des connexines et principalement de la Cx43 dans le développement des métastases osseuses. Quelques données nous laissent à penser qu'elles pourraient avoir un impact non négligeable. En effet, l'analyse transcriptomique de deux lignées tumorales mammaires a montré que la lignée B02, ayant une affinité plus importante pour l'os que la lignée MDA-MB-231, avait une augmentation d'expression en ARNm de la Cx43. Pour compléter l'étude, l'analyse du niveau d'expression protéique de la Cx43 a permis de confirmer cette augmentation d'expression dans la lignée métastasant dans l'os. De plus, l'analyse de tumeurs primaires mammaires et de métastases osseuses a révélé, de nouveau par immunohistochimie, une expression plus importante de la Cx43 dans les cellules tumorales ayant métastasé dans l'os (Figure 27). La présence de la

Cx43 permettrait aux cellules tumorales d'effectuer le processus d'ostéomimétisme (Bellahcene et al., 2007; Clezardin and Teti, 2007; Garcia et al., 2008).

*In vivo*, il a été démontré l'établissement d'une communication hétérocellulaire entre les cellules tumorales mammaires et les cellules d'une lignée ostéoblastique dont la fonctionnalité serait supérieure à la communication homocellulaire entre les cellules tumorales. Cette communication hétérocellulaire pourrait être effectuée par la Cx43 (Kapoor et al., 2004).

*Objectif de l'étude*

## Objectif de l'étude.

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme associé dans 80% des cas à des métastases osseuses de type ostéoblastique. De nombreuses études se sont donc focalisées sur la compréhension de ce ciblage osseux préférentiel pour les cellules tumorales prostatiques. Ainsi, différentes hypothèses décrites précédemment ont émergé sans en comprendre réellement les mécanismes.

Par ailleurs, l'impact de la Cx43 sur la différenciation des ostéoblastes a été étudié précédemment au sein du laboratoire, permettant de mettre en évidence un rôle fondamental de cette connexine lors de l'ostéogenèse. En effet, des souris hétérozygotes pour la Cx43 présentent un retard d'ossification principalement au niveau craniofacial associé à un ralentissement de la différenciation ostéoblastique (Geneau et al., 2007; Geneau et al., 2010; Niger et al., 2008).

Les cellules épithéliales prostatiques normales expriment la Cx43. Cependant, il s'avère qu'au cours de la transformation tumorale, les cellules perdent l'expression de cette connexine et/ou présentent une délocalisation cytoplasmique. D'un point de vue général, de nombreuses études se sont tout d'abord intéressées au rôle des connexines au sein de la tumeur primaire mettant en évidence un effet antiprolifératif. Mais, lors d'études plus récentes, il s'est avéré que les connexines avaient un rôle plus controversé lors de la progression tumorale et notamment lors du développement de métastases. En effet, elles semblent participer à la progression tumorale en augmentant l'invasion des cellules favorisant ainsi la diapédèse et le développement de métastases osseuses. De plus, une ré-expression de la Cx43 a été montrée dans des cellules tumorales mammaires après métastases dans l'os permettant aux cellules de s'adapter au contexte osseux en développant un phénomène d'ostéomimétisme.

Le but de ce travail a donc été d'étudier l'impact de la ré-introduction de la Cx43 dans des lignées cancéreuses prostatiques ayant des caractéristiques métastatiques différentes : les cellules LNCaP peu invasives et les cellules PC-3 très agressives. Dans un premier temps, l'objectif du travail a été de caractériser le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques suite à la surexpression de la Cx43. Pour cela, nous avons tout d'abord validé la surexpression de la Cx43 puis étudié leur potentiel métastatique *in vitro*.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au développement de tumeurs osseuses afin de déterminer si la Cx43 accroît *in vivo* l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques. De plus, nous avons initié l'étude de la dissémination des cellules cancéreuses afin de déterminer si la Cx43 accroît leur propension à métastaser dans le tissu osseux.

Dans un troisième temps, nous avons étudié en co-culture l'interaction entre les cellules cancéreuses prostatiques et les cellules ostéoblastiques afin d'évaluer *in vitro* l'impact de la Cx43. La prolifération et la capacité de différenciation ostéoblastique ont ainsi été quantifiées en présence ou en absence de contact hétérocellulaire.

Enfin, nous avons amorcé l'étude de l'expression de la cadhérine-11. Cette cadhérine, exprimée par les ostéoblastes, est aussi corrélée à la progression tumorale des cellules cancéreuses prostatiques. Sachant que l'expression des connexines a pu être associée à celle des cadhérines dans différents modèles physiologiques ou pathologiques, l'hypothèse d'une modulation de la cadhérine-11 suite à la surexpression de la Cx43 a été envisagée dans le contexte des métastases osseuses.

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

## **Matériels et Méthodes.**

### **I. Culture cellulaire.**

Les lignées cellulaires utilisées proviennent de tumeurs de patients atteints d'un cancer de la prostate avec métastases. Les principales caractéristiques des deux lignées cellulaires, les cellules PC-3 et les cellules LNCaP, ont été répertoriées dans le tableau 5.

#### **1. Entretien des cellules.**

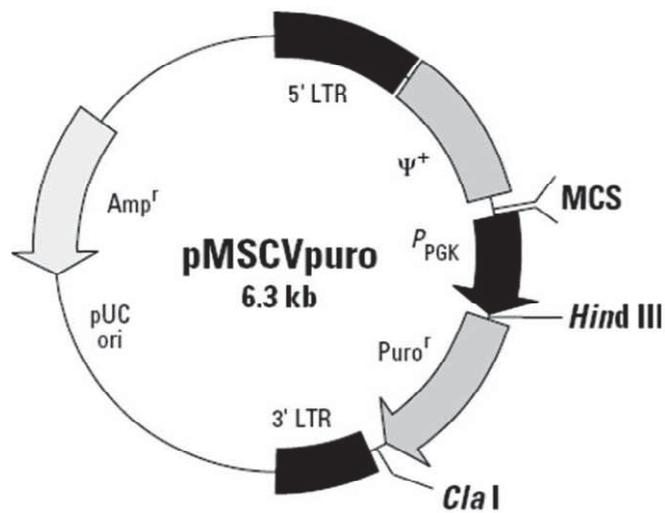
Les cultures cellulaires ont été maintenues sous atmosphère humide dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'air. Elles ont été cultivées sous une hotte à flux laminaire et le milieu de culture est du DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant du glucose à 4,5 g/L supplémenté avec du SVF à 10%, L-glutamine à 580 mg/L (Invitrogen), pénicilline à 100 IU/mL et streptomycine à 100 µg/mL (Lonza, Levallois-Perret, France) et sans rouge de phénol. Le repiquage des cellules a été effectué lorsqu'elles sont à confluence cellulaire. Pour cela, les cellules ont été décrochées à l'aide de trypsine-EDTA (Lonza). Une fois décrochées, les cellules ont été remises en suspension dans le milieu de culture afin de stopper l'action de la trypsine et le tout a été centrifugé pendant 10 min à 300 g. Le culot a été remis en suspension avec du milieu de culture et les cellules ont été réensemencées dans différents supports et à différentes concentrations selon le type d'expérience à réaliser.

#### **2. Congélation et décongélation.**

Pour la congélation, suite au décrochage des cellules par la trypsine-EDTA, les cellules ont été mises en suspension dans du milieu de culture, puis centrifugées 10 min à 300 g. Puis, 1.10<sup>6</sup> cellules ont été reprises dans 1 mL de milieu de culture contenant 10% de DMSO pour assurer la cryoprotection et sont introduites dans des cryotubes. Les cryotubes ont ensuite été placés dans une boîte de congélation spéciale à -80°C toute la nuit. Cette boîte permet une congélation progressive des cellules en faisant baisser la température des cryotubes d'un degré par minute. Les cryotubes peuvent être ensuite transférés dans l'azote liquide (-196°C) le lendemain pour une conservation de longue durée.

<b>Lignées cellulaires</b>	<b>PC-3</b>	<b>LNCaP</b>
<b>Classification</b>	Adénocarcinome de grade IV isolé au niveau d'une métastase osseuse	Carcinome prostatique isolé à partir d'une métastase au niveau du nœud lymphatique supra-claviculaire
<b>Provenance</b>	Patient âgé de 62 ans	Patient âgé de 50 ans
<b>Caractéristiques</b>	Triploïdie	Hypotétraploïdie, positive pour les récepteurs aux androgènes et oestrogènes
<b>Références</b>	Kaighn et al., 1979	Horoszewick et al., 1983

**Tableau 5 : Caractéristiques principales des lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et LNCaP.**



D'après clontech.com.

**Figure 28 : Schéma du plasmide pMSCVpuro.**

Le plasmide contient un promoteur 5'Long terminal repeat (5'LTR) en amont du gène permettant la production de particules rétrovirales ( $\psi^+$ ) 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.

La décongélation se fait rapidement en plongeant le cryotube dans le bain-marie à 37°C. Les cellules décongelées ont été immédiatement versées dans un tube contenant 10 mL de milieu de culture afin de réduire la toxicité du DMSO. Les cellules ont été ensuite centrifugées pendant 10 min à 300 g. Le culot a été remis en suspension avec 5 mL de milieu de culture et les cellules ont étéensemencées dans un flacon de 25cm<sup>2</sup> à bouchon ventilé.

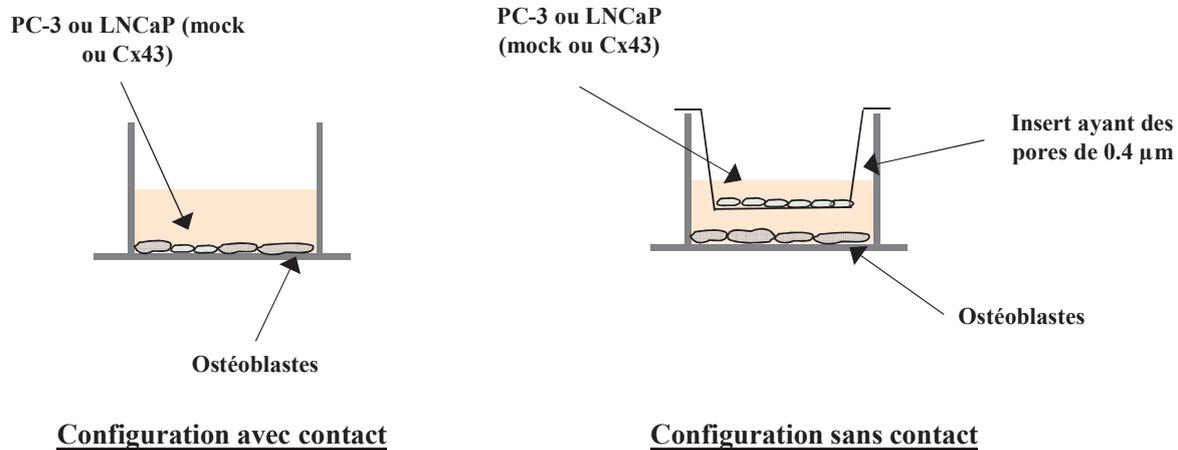
### **3. Obtention des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant la Cx43.**

Brièvement, afin d'obtenir les lignées cellulaires surexprimant la Cx43, les cellules ont été infectées par des particules rétrovirales. La lignée cellulaire *packaging 293GPG*, utilisée pour produire des vecteurs viraux, a été transfectée avec le plasmide pMSCVpuro natif (cellules mock) ou avec le plasmide contenant la séquence codante de la Cx43 humaine (cellules Cx43) (Figure 28). Ce plasmide contient le gène de résistance à la puromycine en aval du promoteur de la phosphoglycérate kinase murine. 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 mammaires. L'ADNc codant la Cx43 compte 1149 nucléotides.

## **II. Culture primaire d'ostéoblastes de calvaria.**

La culture primaire d'ostéoblastes de calvaria a été effectuée à partir de cellules isolées de calottes crâniennes prélevées sur des souriceaux de 3 à 4 jours. Après décapitation, une incision a été réalisée sur le sommet du crâne afin de dégager la voûte crânienne et de la prélever. Les calvaria ont ensuite subi différentes digestions enzymatiques séquentielles à 37°C sous légère agitation :

- La première digestion de 5 min a été effectuée avec un mélange composé de trypsine à 0,05% (Sigma) et d'EDTA à 0,15% (dilué dans une solution contenant 137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH=7,2). Le surnageant obtenu, contenant du périoste et des cellules de type ostéoclastiques, est éliminé.
- La deuxième digestion a été faite 5 min avec de la collagénase de type II (1 mg/mL, Sigma) et le surnageant composé essentiellement de cellules ostéoclastiques a été également rejeté.
- Les trois dernières digestions ont été faites, 5 min chacune, avec la collagénase de type II mais le surnageant a été récupéré puis additionné de 15% de SVF afin d'arrêter l'activité de la collagénase.



**Figure 29 : Représentation schématique des configurations utilisées pour les co-cultures.**

Dans la configuration sans contact les cellules cancéreuses prostatiques sont séparées des ostéoblastes par un insert dont la membrane possède des pores ayant une taille de 0.4 µm.

<b>Plaqué de culture</b>	6 puits
<b>Concentration (nombre de cellules/mL)</b>	OB: $2.5 \times 10^4$ Cellules cancéreuses prostatiques : $1 \times 10^4$
<b>Volume déposé (mL)</b>	OB: 2 Cellules cancéreuses prostatiques : 0.5

**Tableau 6 : Récapitulatif des ensemencements effectués pour l'étude de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes en co-culture.**

Les différents surnageants ont été rassemblés et filtrés sur une toile à bluter afin d'éliminer les débris et les fibres de collagène puis centrifugés à 300 g pendant 10 min à température ambiante. Les ostéoblastes ont été remis en suspension dans leur milieu de prolifération correspondant à du DMEM, supplémenté avec 20% SVF, L-glutamine à 580 mg/L (Invitrogen), pénicilline à 100 IU/mL et streptomycine à 100 µg/mL et ensemencés dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> à 1,5.10<sup>5</sup> cellules/mL avant d'être placés dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'air.

Afin d'étudier l'impact des cellules cancéreuses prostatiques sur le phénotype des ostéoblastes, des co-cultures avec ou sans contact ont été réalisées (Figure 29). Pour cela, au bout de 5 jours de culture, les ostéoblastes à confluence ont été décrochés avec 0,05% de trypsine et de l'EDTA à 0,15% dilués du PBS. Les ostéoblastes ont été ensuite centrifugés 10 min à 300 g à température ambiante puis ensemencés à 2,5.10<sup>4</sup> cellules/mL soit dans leur milieu de prolifération, soit dans leur milieu de différenciation composé de SVF à 10%, β-glycérophosphate à 10 mM, L-glutamine à 580 mg/L (Invitrogen), pénicilline à 100 IU/mL et streptomycine à 100 µg/mL (Tableau 6).

Lorsque les ostéoblastes ont adhéré, les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 ont été décrochées à l'aide de trypsine-EDTA (Lonza) puis centrifugées 10 min à 300 g à température ambiante. Les cellules ont ensuite été ensemencées à 1.10<sup>4</sup> cellules/mL soit dans le milieu de prolifération soit dans le milieu de différenciation des ostéoblastes, faisant un ratio de 1/10 en faveur des ostéoblastes. Dans la configuration sans contact, les cellules cancéreuses prostatiques ont été ensemencées sur des inserts contenant une membrane en PET (Polyethylene Terephthalate ; BD Biosciences) d'une taille de pore de 0.4 µm empêchant le passage des cellules au travers de la membrane mais laissant diffuser les facteurs solubles.

### **III. RT-PCR quantitative.**

#### **1. Extraction des ARN totaux.**

Afin d'évaluer le niveau d'expression des ARNm codant pour la Cx43, la Cx45, la Cx26, OCN, Cbfa1, OPN, OPG et le RANKL, les cellules ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Par la suite, l'extraction des ARN totaux a été effectuée

à différents temps grâce au kit SV total RNA isolation (Promega, Madison, Etats-Unis) où 175  $\mu$ L de RNA lysis buffer est ajouté afin de lyser les cellules. Après avoir récupéré les ARNm sur la colonne du kit puis digéré l'ADN par la DNase1 du kit, les ARNm ont été élués avec 50  $\mu$ L d'eau sans nucléases et peuvent être conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons ont été déposés avec du Bleu de Bromophénol sur un gel d'agarose de 1% afin de vérifier la présence et la pureté des ARN.

## **2. Transcription inverse.**

La transcription inverse se fait à partir des ARN totaux précédemment extraits. La technique appliquée est basée sur l'utilisation d'hexamères de six nucléotidiques aléatoires qui vont se fixer sur l'ARN afin d'effectuer la synthèse d'ADNc. Pour amorcer l'hybridation et éliminer les structures secondaires, les hexamères (Invitrogen) ont été mis en présence des ARN pendant 5 min à  $70^{\circ}\text{C}$  puis à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 3 min. Par la suite, le prémix composé de 4  $\mu$ L de tampon 5X, 1  $\mu$ L de DTT (Dithiothreitol), 1  $\mu$ L de dNTPs (10 mM, Promega) et 1  $\mu$ L de l'enzyme SuperScriptII (transcriptase inverse) ont été ajoutés à 12,3  $\mu$ L d'ARN.

Les échantillons ont été ensuite mis dans un thermocycleur et traités selon le programme suivant :

- $25^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min pour activer l'enzyme.
- $42^{\circ}\text{C}$  pendant 50 min pour avoir un fonctionnement optimal de l'enzyme et réaliser l'élongation du brin d'ADNc.
- $95^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min pour permettre la séparation de l'ARN de l'ADNc néosynthétisé.

Les ADNc peuvent être conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **3. La PCR quantitative en temps réel.**

La réaction d'amplification a été faite dans une plaque 96 puits, permettant de faire une PCR sur plusieurs échantillons en même temps. La quantification de produit amplifié à chaque cycle a été faite par détection de la fluorescence grâce à l'appareil GeneAmp7500 Fast (Applied Biosystems), relié à un ordinateur qui a soumis la plaque à :

- $50^{\circ}\text{C}$  pendant 2 min pour activer l'UNG ampérase.
- $95^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min pour la dénaturation des brins d'ADNc.

Gène	Spécificité des espèces	Orientation des amorces	Séquence des amorces (5' > 3')	Taille amplicon
<b>GAPDH</b> NM_002046	-	Sens	GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC	269pb
		Antisens	GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG	
<b>Cx43</b> NM_000165	-	Sens	GCTGGTGGTGTCTTGGTGTC	215pb
		Antisens	CAGGAGGAGACATAGGCGAGAGG	
<b>Cx26</b> NM_004004	-	Sens	TGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTG	240pb
		Antisens	TGAAGAGGACGGTGAGCCAGATC	
<b>Cx32</b> NM_000166	-	Sens	GTCATCTTCATCTTCAGAATCATGG	243pb
		Antisens	CCGTAGCATTCTTCTCTATGTGT	
<b>Cx45</b> NM_005497	-	Sens	TCCTTGTCCCTCATAAGATAGACTGC	218pb
		Antisens	ATGGTGTATTCCAAGTGAAAGGATA	
<b>GAPDH</b> NM_008084	Souris	Sens	AGCATCTCCCTCACAATTTCCA	102pb
		Antisens	GTGCAGCGAACTTTATTGATGGTAT	
<b>Cx43</b> NM_010288	Souris	Sens	TCCACCACTTTGGCGTGCCG	121pb
		Antisens	CTCCGGCCGTGGAGTAGGCT	
<b>ALP</b> NM_007431	Souris	Sens	TCGCTATCTGCCTTGCCTGTA	102pb
		Antisens	AAGAGAGAAACCTGCTGGCCA	
<b>OCN</b> NM_007541	Souris	Sens	CTGGCTGCGCTCTGTCTCT	82pb
		Antisens	CCTGCTTGGACATGAAGGC	
<b>OPN</b> NM_009263	Souris	Sens	CGATGTCATCCCTGTTGCC	81pb
		Antisens	TGACTTGACTCATGGCTGCC	
<b>Cbfa1</b> NM_009820	Souris	Sens	AAACATCTCCACACCATTAGAGGTT	78pb
		Antisens	GTCAGTCAGTGCCTTTCCTCC	
<b>RANKL</b> NM_011613.3	Souris	Sens	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT	74pb
		Antisens	CATTGATGGTGAGGTGTGCAA	
<b>OPG</b> NM_008764.3	Souris	Sens	TGTGTGTCCCTTGCCCTGACCA	131pb
		Antisens	ACACTCGGTTGTGGGTGCGG	

**Tableau 7 : Récapitulatif des couples d'amorces utilisés en PCR quantitative en temps réel.**

- 40 cycles pendant 2h30 (90°C pendant 15 sec pour la dénaturation, 60°C pendant 1 min pour les phases d'hybridation et d'élongation).

L'analyse de la courbe de fusion (augmentation progressive de la température à partir de 60°C jusqu'à 95°C toutes les 30 sec) a été réalisée en fin de chaque expérience afin de vérifier qu'un produit unique par paire d'amorces a été amplifié.

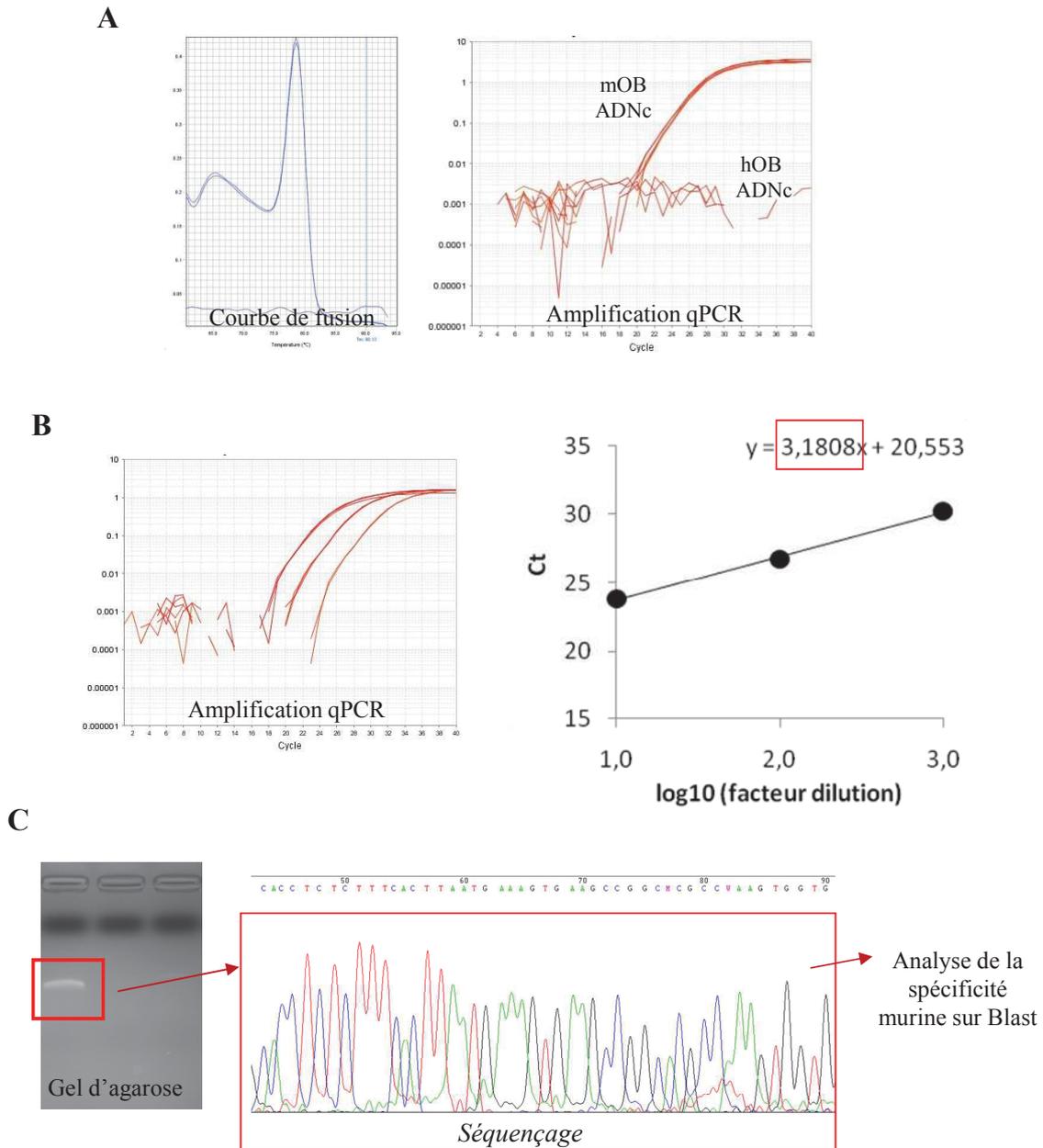
Le volume final de mélange réactionnel est de 20 µL par puits contenant 5 µL d'ADNc (dilués au préalable au 1/10<sup>ème</sup>) et 15 µL de Mix : 4,8 µL eau, 0,1 µL de chaque amorce à 25 mM, 10 µL de SYBRGREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) contenant l'agent intercalant fluorescent, la Taq polymérase, les dNTPs ainsi que les sels.

#### **4. Analyse des résultats.**

A partir des courbes de fluorescence, il est possible de connaître le cycle correspondant à l'amplification détectable du matériel génétique : Ct (cycle threshold ou cycle seuil). Préalablement, une normalisation du gène d'intérêt par rapport à un gène endogène de référence dont l'expression reste constante est réalisée. Le gène de référence utilisé est celui de la protéine GAPDH. La normalisation se fait en calculant la différence des Ct telle que  $\Delta Ct = Ct \text{ gène intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$ , pour en déduire l'expression relative du gène d'intérêt par rapport au gène de référence :  $\% \text{ GAPDH} = 2^{-\Delta Ct} \times 100$ . Ce calcul a été effectué pour chacune des conditions et des gènes d'intérêt utilisés lors des analyses. Afin de comparer l'expression du gène d'intérêt dans différentes conditions, la valeur relative de 1 (ou 100%) a été attribuée à la condition contrôle et les valeurs relatives des autres conditions ont été calculées en référence de celle-ci.

#### **5. Validation des amorces murines.**

Afin d'étudier l'impact en co-cultures des cellules cancéreuses prostatiques sur la différenciation des ostéoblastes murins et principalement sur l'expression génique de certains marqueurs ostéoblastiques, l'utilisation d'amorces spécifiques murines a été nécessaire. Pour cela, chaque couple d'amorces, cité dans le tableau 7, a été testé.



Plusieurs paramètres ont été vérifiés :

- Une PCR quantitative en temps réel a été effectuée avec des ADNc issus d'ostéoblastes murins et humains afin de vérifier que le couple d'amorces amplifie uniquement la matrice spécifique (Figure 30A).
- Afin de vérifier l'efficacité de l'amplification linéaire (Figure 30B), des dilutions successives au  $1/10^{\text{ème}}$  des matrices ont été effectuées et chaque matrice a été amplifiée par PCR quantitative en temps réel. Sachant qu'à chaque cycle, la quantité d'ADN est doublée, cela signifie que pour une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$ ,  $2^n=10$  donc  $n=3.3$ . La droite, correspondant au Ct en fonction du  $\log_{10}$  des dilutions, doit avoir une pente se situant entre 3,1 et 3,4.
- Il a fallu vérifier la spécificité de l'amplification grâce à la courbe de fusion et à une analyse par électrophorèse des amplicons sur gel d'agarose à 2% (Figure 30C). La bande obtenue est extraite, puis l'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Pour cela, le gel contenant la bande correspondant aux amplicons a été découpé et le tout a été suspendu dans le tampon QG du kit puis chauffé 10 min à 50°C afin de le solubiliser. Après plusieurs centrifugations et lavage à l'éthanol, les amplicons ont été élués dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ. La réaction de séquence a été effectuée selon la méthode de Sanger avec des DDnucléotides fluorescents et le kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Pour ce faire, 2  $\mu\text{L}$  d'amplicons ont été ajoutés à 1  $\mu\text{L}$  d'amorce à 1,6  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$  du kit BigDye® Terminator v3.1 et 5  $\mu\text{L}$  d'eau. Le séquençage a été analysé à l'aide du séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) et les séquences obtenues ont été vérifiées dans la base de données Blast.

#### **IV. Western blot.**

Les cellules cancéreuses prostatiques ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre à  $3.10^4$  cellules/mL. Les cellules, 3 à 4 jours après avoir atteint la confluence, ont été rincées 3 fois dans du tampon PBS (150 mM NaCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,4) sur glace. Elles ont ensuite été lysées dans du tampon de lyse (RIPA : 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% NP40, 0,5% DOC, 1% Triton X100, 0.01% SDS, pH=7,4) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma). Les échantillons ont été soniqués (3 fois, 5 sec) et la concentration protéique a été dosée par une

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Dilution</b>	<b>Anticorps secondaires</b>	<b>Dilution</b>
Anti-Cx43 monoclonal de souris (Transduction Laboratories, Lexington, KY).	1/1000 dilué dans TBS-tween 0,1% BSA 2%	Anticorps couplés à la peroxydase (Goat Anti Mouse) (Dako, Glostrup, Danemark)	1/5000 dilué dans TBS-tween 0,1% BSA 2%
Anti-Cx26 monoclonal de souris (Invitrogen)	1/500 dilué dans TBS-tween 0,1% BSA 2%		
Anti-Cadhérine 11 monoclonal de souris (Invitrogen)	1/1000 dilué dans TBS-tween 0,1% BSA 2%		

**Tableau 8 : Liste d'anticorps utilisés pour le western blot.**

méthode colorimétrique améliorée de la technique de Lowry (Lowry et al., 1951) à l'aide du kit Biorad DC protein assay. La coloration obtenue a été mesurée à 750 nm.

La séparation des protéines est faite sur gel de polyacrylamide en présence de SDS en conditions dénaturantes, en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines ont été dénaturées pendant 6 min à 90°C dans du tampon de charge Laemmli (tampon 5X : 10% sucrose, 10% SDS 10%, 20% B-mercaptoéthanol, 5% Bleu de Bromophénol, 480 mM Tris HCl). Puis les protéines totales (5 ou 50 µg) ont été soumises à une séparation électrophorétique à 100 V pendant 2h15 dans du tampon de migration (20 mM Tris HCl, 190 mM Glycine, 0,1% SDS). Elles ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE healthcare Amersham Hybond ECL) et le transfert a été fait à 100V pendant 1h à 4°C dans du tampon de transfert (20% méthanol, 190 mM Glycine, 20 mM Tris HCl).

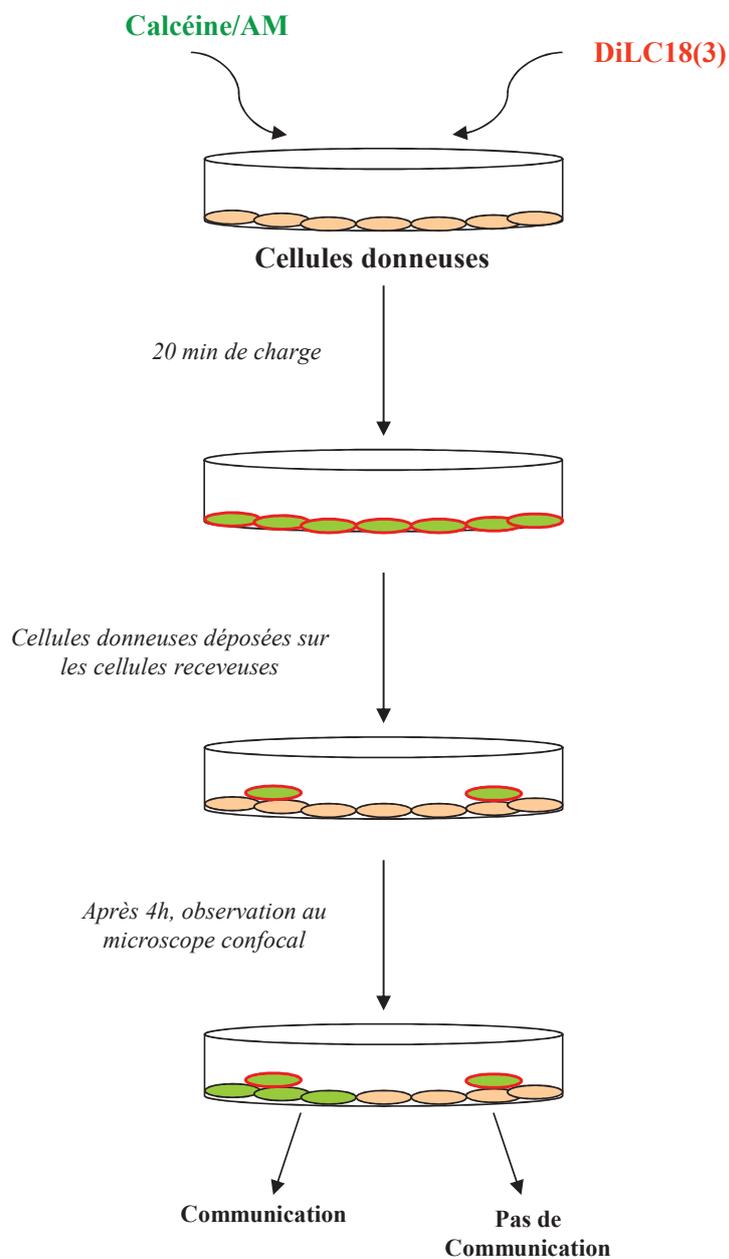
Le transfert a été vérifié par la coloration réversible de la membrane au rouge ponceau qui est ensuite rincée au TBS tween-20 (0,1%). Par la suite, les sites non spécifiques de la membrane ont été saturés pendant 1h30 à température ambiante dans du TBS tween-20 (0,1%) contenant 5% de lait écrémé. La membrane a été incubée toute la nuit, à 4°C, en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (Tableau 8) ou contre la GAPDH (1/5000<sup>ème</sup>) (Dako, Glostrup, Danemark) qui est la protéine de référence.

Le lendemain, la membrane a été rincée dans du TBS tween-20 (0,1%) pour éliminer l'excès d'anticorps primaire avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase reconnaissant l'anticorps primaire (Tableau 8). L'incubation avec l'anticorps secondaire a été faite 1h à température ambiante. La membrane a été de nouveau rincée avant la révélation des protéines avec le kit de détection SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, Etats-Unis) dont le signal est détecté sur des films photographiques (GE healthcare Amersham Hyperfilm ECL). Enfin, l'analyse densitométrique a été effectuée à l'aide du logiciel Image J.

## **V. Mesure de la communication jonctionnelle.**

Afin d'évaluer la communication jonctionnelle, deux techniques ont été employées :

- la technique de précharge qui est une méthode qualitative.
- la technique de Gap-FRAP qui est une méthode quantitative.



**Figure 31 : Représentation schématique du principe de la méthode de précharge.**

Les cellules donneuses sont chargées 20 min en présence de 5  $\mu\text{M}$  de calcéine (diffusible) et de 10  $\mu\text{M}$  de DiLC18(3) (marqueur membranaire). Mille cellules donneuses sont déposées sur les cellules receveuses cultivées à confluence. L'observation de la diffusion ou non de la calcéine des cellules donneuses aux cellules receveuses est effectuée 4h après au microscope confocal.

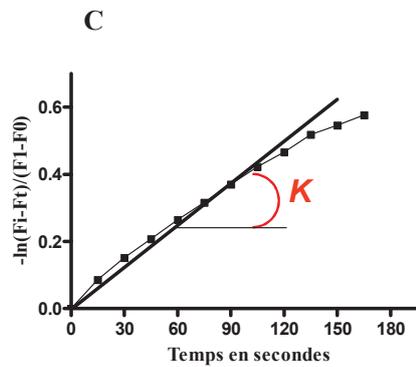
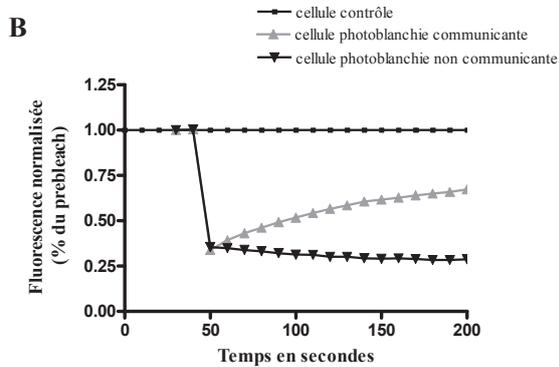
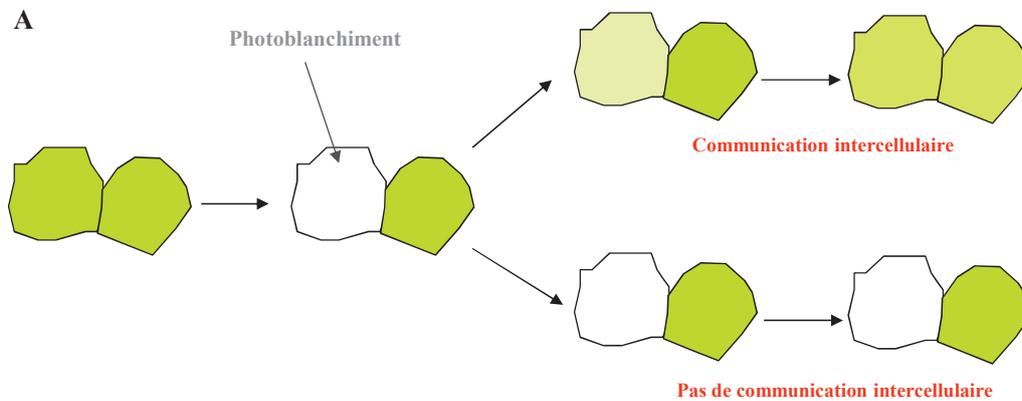
Des sondes fluorescentes ont été utilisées dans les deux cas et doivent présenter certaines caractéristiques. D'une part, elles doivent être hydrophiles une fois qu'elles ont pénétré à l'intérieur de la cellule et doivent être de faible poids moléculaire (< 1000 Da) pour passer à travers les jonctions communicantes. D'autre part, elles doivent être détectables à faible concentration, ne pas avoir d'activités biologiques, rester stables lors de la phase d'acquisition et avoir une perméabilité membranaire réduite.

### **1. La technique de précharge (méthode qualitative).**

La technique de précharge (Figure 31) permet de mettre en évidence une communication homo ou hétérocellulaire. Concernant l'étude de la communication homocellulaire, les cellules cancéreuses prostatiques ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre à  $3 \cdot 10^4$  cellules/mL. Après 4 jours de culture, lorsque les cellules ont atteint la confluence, une partie des cellules, appelées cellules donneuses, a été incubée pendant 20 min avec du Tyrode (NaCl 144 mM ; KCl 5,4 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mM ; Hepes 5 mM ; Glucose 5,6 mM ; pH 7,4) contenant 10 µM de DiIC<sub>18</sub>(3) (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Invitrogen) et 5 µM de calcéine/AM (Sigma). Le DiIC<sub>18</sub>(3) est un marqueur membranaire qui permet d'identifier les cellules donneuses, alors que la calcéine/AM, après clivage de son domaine hydrophobe AM (Acétoxyméthylester) par des estérases cytoplasmiques, peut diffuser au travers des jonctions communicantes du fait de son faible poids moléculaire (622 Da).

Après avoir été rincées avec du Tyrode, les cellules donneuses ont ensuite été décrochées à l'aide de trypsine-EDTA puis 1000 d'entre elles ont été déposées sur les cellules receveuses. Quatre heures plus tard, les cellules ont été observées au microscope confocal (FV 1000 Olympus IX-81, Tokyo, Japon), objectif x40 à immersion à l'huile. La calcéine est excitée à 488 nm et émet à 515 nm alors que le DiIC<sub>18</sub>(3) est excité à 543 nm et émet à 565 nm. Si les cellules ont établi une communication cellulaire, la calcéine sera transmise de la cellule donneuse aux cellules receveuses.

Pour étudier la communication hétérocellulaire, les cellules cancéreuses prostatiques sont les cellules donneuses qui ont été déposées sur les ostéoblastes. Quatre jours avant le dépôt des cellules cancéreuses prostatiques, les ostéoblastes ont étéensemencés à  $2,5 \cdot 10^4$  cellules/mL dans le milieu de différenciation.



$$e^{-kt} = (F_i - F_t) / (F_i - F_0) \quad \longrightarrow \quad kt = -\ln(F_i - F_t) / (F_i - F_0)$$

Avec :

$k$  = constante de perméabilité relative exprimée en  $\text{min}^{-1}$

$F_i$  = intensité de la fluorescence initiale

$F_t$  = intensité de la fluorescence au temps  $t$

$F_0$  = intensité de fluorescence au temps  $t=0$ .

**Figure 32 : Principe de la méthode du gap-FRAP.**

Les cellules cancéreuses prostatiques sont chargées 10 min avec une sonde fluorescente hydrophobe la 6-carboxyfluorescéine diacétate. Les estérases intracellulaires vont cliver la partie hydrophobe la piégeant ainsi dans les cellules. Grâce au photoblanchiment d'une cellule par un flash lumineux, il sera possible de visualiser le retour de fluorescence (**A**) à travers les jonctions communicantes. De plus, ce retour suit une constante de temps exponentielle indiquée en (**B**). Le niveau de fluorescence peut être quantifié d'une part en terme de pourcentage de cellules couplées et d'autre part en calculant une constante de perméabilité relative. Une linéarisation de l'équation précédente (**C**) permet d'obtenir cette constante de perméabilité relative,  $k$ .

## **2. La technique du Gap-FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching (méthode quantitative).**

La fonctionnalité de la communication jonctionnelle peut être également évaluée par l'étude de la cinétique du retour de fluorescence d'une cellule fluorescente vers une cellule photoblanchie (Wade et al., 1986). Le photoblanchiment correspond à la perte totale de fluorescence d'un fluorochrome suite à une exposition lumineuse de forte intensité. Si la cellule photoblanchie est connectée aux cellules adjacentes par l'intermédiaire des jonctions communicantes, un retour exponentiel de la fluorescence en provenance de ces cellules va pouvoir être observé (Figure 32A). Ce retour de fluorescence peut être effectué par des ponts cytoplasmiques et les canaux jonctionnels. Afin de distinguer les deux retours, une constante de perméabilité relative est définie et les constantes mesurées pour les ponts cytoplasmiques atteignent généralement des valeurs supérieures ou égales à 2. De plus, le retour de fluorescence effectué par les canaux jonctionnels est bloqué par l'utilisation de bloqueurs de la communication.

Les cellules cancéreuses prostatiques ont étéensemencées dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre sur lamelles de verre. A 70% de confluence, les cellules ont été rincées avec du Tyrode puis incubées pendant 10 min à température ambiante avec du Tyrode contenant la forme lipophile de la sonde fluorescente correspondant à 6-carboxyfluorescéine diacétate à 7 µg/mL (Sigma) dans 0,25% de DMSO. Cette sonde est excitée à 488 nm et émet à 530 nm. Après plusieurs rinçages pour éliminer l'excédent de sondes, les cellules chargées ont été observées en microscopie confocale (FV 1000 Olympus IX-81, Tokyo, Japon) sur un support maintenu à 37°C. Une cellule a été sélectionnée puis photoblanchie en appliquant une stimulation Laser de forte intensité à l'aide d'un Laser à 405 nm. Le niveau de fluorescence émit à 530 nm a été enregistré toutes les 15 sec pendant 5 min. Le niveau de fluorescence non photoblanchie a été également enregistré (cellule contrôle) afin d'estimer et de normaliser la perte de fluorescence lié à l'enregistrement (Figure 32B). Quand les cellules photoblanchies sont connectées avec les cellules adjacentes, il est possible de mesurer une constante  $k$  de perméabilité relative à partir de la courbe de retour de fluorescence et de l'équation suivante :  $(F_i - F_t)/(F_i - F_0) = e^{-kt}$  où  $F_i$ ,  $F_t$  et  $F_0$  correspondent aux intensités de fluorescence mesurées respectivement avant le photoblanchiment, au temps  $t$  et  $t=0$  juste après le photoblanchiment (Figure 32C).

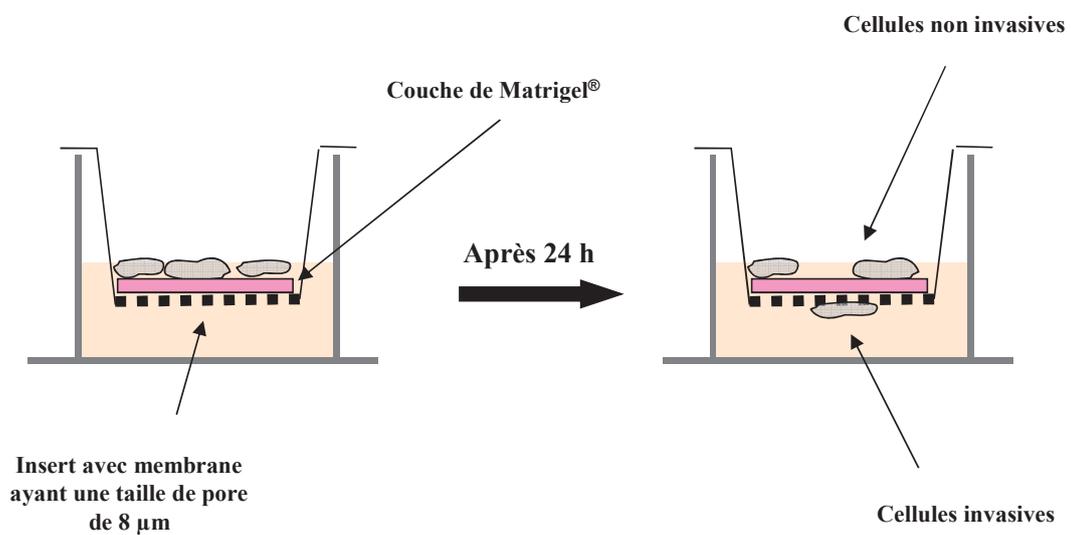
## **VI. Mesure de l'adhérence aux protéines matricielles.**

La mesure de l'adhérence aux protéines matricielles a été effectuée selon le protocole décrit par (Kusy et al., 2005). Pour ce faire, les puits d'une chambre de culture Lab-tek® (Nunc, Rochester, Etats-Unis) ont été traités avec 100 µL de PBS contenant soit 0,5 µg/mL de fibronectine, de vitronectine (Sigma), ou de collagène de type 1 (BD Bioscience) pendant 1 h à 37°C. Les puits correspondant aux conditions contrôles ont été traités avec du PBS seul. Puis les matrices et les sites non spécifiques ont été saturés par l'ajout de PBS 3% BSA pendant 1h à 37°C. En parallèle, les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 ont été décrochées à l'aide d'un tampon riche en EDTA (EDTA 8 mM ; NaCl 150 mM ; KCl 6 mM ; Glucose 6 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 4,5 mM ; pH=8.2) sans enzyme pour ne pas lyser les protéines participant à l'adhérence des cellules. Après décrochage, les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 300 g. Après avoir ôté la solution de saturation, 3000 cellules ont été déposées par puits et laissées 2h à 37°C. Enfin, les cellules n'ayant pas adhéré ont été aspirées et les cellules ayant adhéré aux protéines matricielles ont été fixées pendant 10 min avec 1 % de formaldéhyde et colorées 10 min au Crystal violet (0,1%). Après plusieurs rinçages et séchage, chaque puits a été photographié au grossissement x10 et le nombre de cellules adhérentes a été déterminé à l'aide du logiciel ImageJ.

## **VII. Mesure de l'invasion.**

Afin d'évaluer les capacités d'invasion des cellules cancéreuses prostatiques, des chambres d'invasion (ou chambre de Boyden) pour plaque 24 puits ont été utilisées. Ces chambres d'invasion sont des inserts contenant une membrane en PET (BD Biosciences) d'une taille de pore de 8 µm permettant le passage des cellules au travers de la membrane. Les chambres ont été recouvertes avec une matrice contenant des protéines de membrane basale et de matrice extracellulaire correspondant à 25 µL de Matrigel® (BD Biosciences) à 1 mg/mL (dilué dans le milieu de culture des cellules sans SVF) et laissé à polymériser 4h à température ambiante.

Les cellules ont été décrochées à l'aide de la solution enrichie en EDTA et sans enzyme, puis 5.10<sup>4</sup> d'entre elles ont été déposées dans l'insert avec 200 µL de milieu de culture à 0,5% de SVF. Les inserts ont été ensuite posés dans les puits contenant 500 µL de milieu de culture avec ou sans SVF à 10%. Le SVF jouera le rôle de chimioattractant.



**Figure 33 : Représentation schématique du principe de l'invasion en chambre de Boyden.**

Les cellules sont déposées sur une membrane ayant des pores de diamètre  $8\ \mu\text{m}$  recouverte de Matrigel® à  $1\ \text{mg/mL}$ . Puis 24h après, les cellules invasives présentes sur la face interne de la membrane sont fixées, puis colorées à l'éosine/hématoxyline et comptées.

De plus, pour déterminer le rôle des MMP dans l'invasion des cellules cancéreuses, un traitement au GM6001 (Calbiochem, Gibbstown, New Jersey), un inhibiteur de l'activité des MMPs, a été effectué. Pour cela, les cellules ont étéensemencées avec 10  $\mu$ M de GM6001 dans le milieu de culture contenant 0,5% de SVF. Etant donné que le GM6001 est dilué dans du DMSO, un traitement au DMSO a été effectué. Les inserts ont été posés dans les puits contenant 500  $\mu$ L de milieu de culture avec 10% de SVF contenant soit du GM6001 ou du DMSO.

Au bout de 24h, les cellules sur la face supérieure correspondant aux cellules non invasives ainsi que le Matrigel® ont été enlevés à l'aide d'un coton-tige. Les cellules invasives, présentes sur la face inférieure de l'insert, ont été rincées et fixées 10 min avec du méthanol froid. Après plusieurs rinçages, les cellules ont été colorées 20 min à température ambiante avec une solution d'hématoxyline de Harris permettant la coloration des noyaux des cellules. Les cellules ont été de nouveau rincées et colorées 20 min à température ambiante avec 0,5% d'éosine afin d'identifier le cytoplasme (Figure 33).

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, la membrane a été découpée puis déposée et fixée sur une lame avec un milieu de montage : le Mowiol. Pour chaque insert, 4 photographies, permettant de cibler l'ensemble de la membrane, ont été prises au microscope optique à l'objectif x10, puis le nombre de cellules a été déterminé à l'aide du logiciel ImageJ.

### **VIII. Analyse de la viabilité cellulaire.**

L'analyse de la viabilité cellulaire a été déterminée selon deux protocoles : le test au bleu de méthylène et le test XTT.

#### **1. Test au bleu de méthylène.**

La mesure de la viabilité cellulaire a été déterminée par un protocole adapté de Oliver en 1989 (Oliver et al., 1989). Les cellules cancéreuses prostatiques ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à  $3 \cdot 10^4$  cellules/mL (2 mL/puits). Puis les 7 jours suivants, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS pH=7,4 puis fixées 10 min à température ambiante avec du glutaraldéhyde à 0,5%. Les cellules fixées ont été ensuite incubées pendant 1h en présence de bleu de méthylène à 1%, dilué dans du tampon borate pH=8,5, capable de se fixer aux molécules chargées négativement (acide nucléique, certaines protéines).

Après rinçage et séchage, le bleu de méthylène incorporé dans les cellules a été extrait avec d'une solution d'HCl à 0,1 N. La densité optique (DO) des surnageants obtenus est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm. Une relation linéaire a permis ensuite de convertir les DO mesurées en nombre de cellules : 1 unité de DO correspond à  $33.10^3$  cellules,  $28.10^3$  cellules et  $50.10^3$  cellules respectivement pour les cellules PC-3, les cellules LNCaP et les ostéoblastes (les tests de correspondance ont été réalisés au laboratoire).

## **2. Test XTT.**

C'est un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules à métaboliser le sel de tétrazolium 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tétrazolium-5-carboxanilide : XTT (jaune) en formazan (orange). Cette réaction est réalisée par les déshydrogénases mitochondriales des cellules et la coloration est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les cellules cancéreuses prostatiques ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, à raison de  $3.10^3$  cellules par puits dans 100  $\mu$ L de milieu de culture. Le test a été effectué du jour de l'ensemencement jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de culture. Pour cela, 25  $\mu$ L d'une solution d'XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) ont été ajoutés dans chaque puits, puis les cellules ont été placées à 37°C pendant 4h. Après l'incubation, la DO du surnageant de chaque puits est lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque (PerkinElmer, Berthold) à une longueur d'onde de 490 nm.

## **IX. Test d'apoptose par marquage à l'annexine V.**

L'annexine V est une protéine calcium-dépendante présentant une très forte affinité pour la charge négative des phospholipides et plus spécifiquement pour la phosphatidylsérine. En effet, la phosphatidylsérine est localisée dans le feuillet interne de la membrane plasmique mais lorsque les cellules rentrent en apoptose, elle passe dans le feuillet lipidique externe.

L'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques a été analysée après 4 jours de culture selon la procédure du fournisseur (kit annexine V, BD Bioscience). Au préalable les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre à  $3.10^4$  cellules/mL (6 mL final) dans leur milieu de culture.

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Dilution</b>	<b>Anticorps secondaires</b>	<b>Dilution</b>
Anti-Cx43 monoclonal de souris (Transduction Laboratories, Lexington, KY).	1/250 dilué dans PBS triton 1% BSA 1%	GAMalexa488 (Goat Anti Mouse) (Molecular probes)	1/1000 dilué dans PBS triton 1% BSA 1%
Anti-Cadhérine 11 monoclonal de souris (Invitrogen)	1/50 dilué dans PBS triton 1% BSA 1%		

**Tableau 9 : Liste d'anticorps utilisés lors de l'immunocytochimie.**

Les cellules flottantes ainsi que les cellules adhérentes (après avoir été décrochées avec le tampon enrichi en EDTA) ont été centrifugées pendant 10 min à 300 g. Les cellules contenues dans le culot ont été remises en suspension dans du PBS pH=7.4 froid pour éviter aux cellules de s'agréger. Les cellules ont été ensuite soumises à une centrifugation de 10 min à 300 g. Ce type de lavage a été effectué deux fois.

A la fin du troisième lavage,  $5.10^5$  cellules ont été suspendues dans 100  $\mu$ L d'une solution appelée tampon annexine (140 mM NaCl; 2,5 mM  $CaCl_2$ ; 10 mM Hepes; pH=7,4) dont 1  $\mu$ L d'annexine V couplée à la fluorescéine est ajouté pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. A la fin de l'incubation, 400  $\mu$ L de tampon annexine ont été ajoutés ainsi que l'iodure de propidium à 2,5  $\mu$ g/mL. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un FACSCanto-II en utilisant le logiciel FACSDiva-II à raison de  $3.10^4$  évènements (BD Biosciences).

## **X. Immunocytochimie de la Cx43 et de la cadhérine-11.**

La technique utilisée est celle de l'immunomarquage indirect où l'anticorps primaire reconnaît l'antigène contre lequel il est dirigé. Plusieurs anticorps primaires peuvent se fixer sur l'antigène. Puis, l'anticorps primaire est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome ce qui va permettre d'amplifier le signal. Cette technique permet donc la détection et la localisation de protéines d'intérêt au sein d'une cellule.

Pour ce faire, les lignées cancéreuses prostatiques ont étéensemencées à  $3.10^4$  cellules/mL sur lamelle de verre de diamètre 14 mm dans des plaques 12 puits (1,5 mL final). Lorsque elles ont atteint la confluence, les cellules ont été rincées au PBS avant d'être fixées pendant 9 min avec de l'acétone froid. Après rinçage, l'étape de perméabilisation et de saturation des sites non spécifiques a été effectuée pendant 1h à température ambiante avec du triton X100 à 1% et de la BSA à 1% dilués dans du PBS.

La révélation des protéines d'intérêt a été faite par incubation des cellules avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C en chambre humide afin d'éviter l'évaporation. Après trois rinçages de 5 min chacun pour éliminer l'excédent d'anticorps, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa Fluor® 488 ou 635 (Invitrogen) pendant 1h à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité (Tableau

9). Pour l'observation, les lamelles ont été montées sur lame avec du milieu de montage Mowiol. L'observation a été effectuée en microscopie confocale à fluorescence (FV 1000 Olympus IX-81, Tokyo, Japon). A chaque expérience, un contrôle négatif pour lequel l'anticorps primaire a été omis afin de vérifier que l'anticorps secondaire ne se fixe pas à la préparation de manière non spécifique.

## **XI. Analyse protéomique du « sécrétome ».**

Le terme « sécrétome » est utilisé pour décrire l'étude globale de l'ensemble des protéines sécrétées par une cellule, un tissu ou un organisme. Cette technique a été effectuée au sein du laboratoire du Pr. Christian Naus à l'Université British Columbia de Vancouver afin de comparer la sécrétion protéique des cellules surexprimant la Cx43 et des cellules transfectées avec le vecteur vide.

Pour cela les cellules ont été cultivées dans deux boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre (Nunc) contenant chacune 20 mL de DMEM 10% SVF jusqu'à atteindre 80% de confluence. Les cultures ont été ensuite rincées deux fois au DMEM sans sérum et maintenues dans ce même milieu pendant 24h. Puis, les milieux dits « conditionnés » ont été récupérés, traités avec un cocktail inhibiteur de protéases et centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Puis les protéines ont été précipitées et récupérées dans un tampon de digestion contenant de la trypsine afin d'obtenir des fragments peptidiques.

Les échantillons ont été marqués par les isotopes légers (pour les protéines sécrétées par les cellules contrôles) et lourds (pour les protéines sécrétées par les cellules surexprimant la Cx43) du formaldéhyde et analysés par HPLC sur colonne C18 couplée au spectromètre de masse (High resolution linear trapping quadrupole-OrbitrapXL, Thermo Fisher) et au logiciel Xcalibur. Les spectres obtenus ont été identifiés à l'aide du logiciel Mascot v.2.2 (Matrix Science) et la quantification des ratios a été faite en utilisant MSQuant (Mortensen et al., 2010).

## **XII. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL).**

La mesure de l'activité de la phosphatase alcaline a été effectuée après deux jours de co-culture. Le protocole est effectué selon la méthode décrite par Majeska et Rodan (Majeska and Rodan, 1982). En effet, la phosphatase alcaline hydrolyse du p-nitrophényl-phosphate en

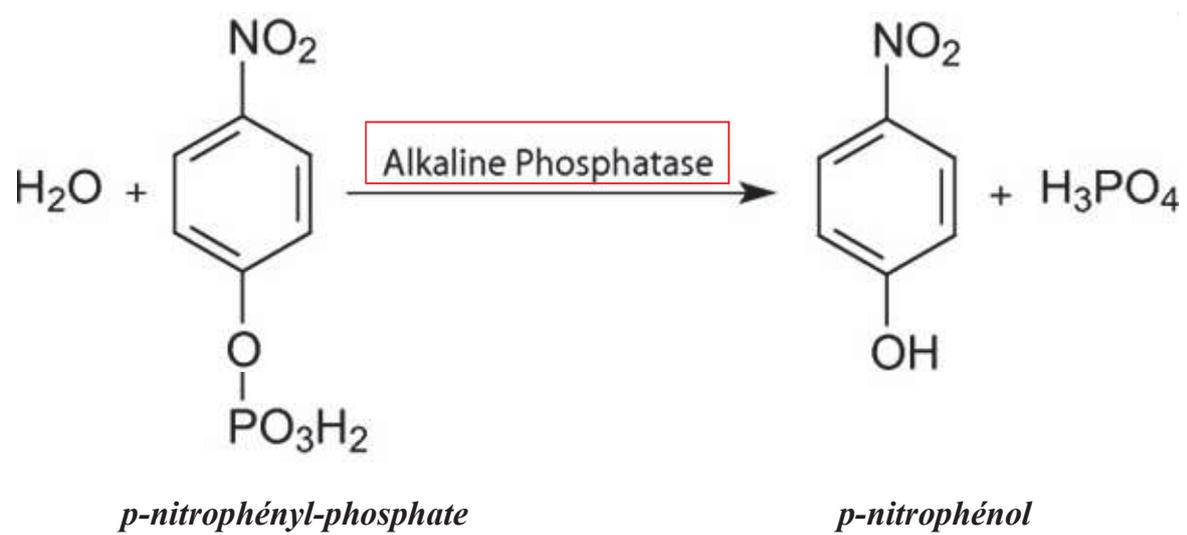


Figure 34 : Transformation du p-nitrophényl-phosphate en p-nitrophénol par la phosphatase alcaline.

p-nitrophénol et en phosphate inorganique en présence d'eau selon l'équation présentée figure 34.

Pour cela, les cellules ont été rincées plusieurs fois avec du PBS pH=7,4 froid puis récupérées avec un racleur et mises sur glace pour conserver les protéines. Elles ont ensuite été incubées 30 min à 37°C avec la solution substrat correspondant à une capsule de p-nitrophényl-phosphate (5 mg, Sigma) dilué dans 1,25 mL de tampon alcalin (1,5 M 2-amino-2-méthylpropanol-1 pH=10,3 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) supplémenté de 1,25 mL de triton X100. La réaction enzymatique a été arrêtée sur glace par l'ajout de 1 mL de NaOH à 0,1 N. Le P-nitrophénol formé présentant une absorbance à 410 nm, l'augmentation d'absorbance à cette longueur d'onde est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Ainsi, l'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée en utilisant la formule suivante :

$$A_{\text{pal}}(\text{UI/L}) = (\text{Abs./30min} \times 1000 \times \text{TV}) / (\epsilon \times \text{LP} \times \text{SV})$$

Abs./30min = absorbance mesurée à 30 min

1000 = facteur permettant de convertir les unités par mL en unités par L.

TV = volume total réactionnel (soit 1,15 mL)

$\epsilon$  = coefficient d'absorbance du P-nitrophénol à 410 nm (18,45)

LP = trajet optique (1 cm)

SV = volume de l'échantillon (0,1 mL)

En parallèle le dosage des protéines a été effectué par une méthode colorimétrique améliorée de la technique de Lowry (Lowry et al., 1951) à l'aide du kit Biorad DC protein assay. Ceci a permis d'exprimer l'activité de la phosphatase alcaline en unité internationale par litre et par microgramme de protéine.

### **XIII. Etude *in vivo*.**

Cette étude a été réalisée au Centre d'Imagerie du Petit Animal d'Orléans (UPS 44 TAAM). Les souris utilisées sont des souris mâles Balbc-nude (Charles River, Wilmington, MA) de 7 semaines. Elles sont immunodéficientes du fait qu'elles n'aient pas de thymus et sont donc incapables de produire des lymphocytes T.

Les souris ont été hébergées dans une cage, à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un cycle lumière-obscurité de 12/12 heures. Durant toute l'expérience, les souris avaient libre accès à la nourriture (Rongeurs Reproduction RM3 autoclavable bouchon végétal, SDS) ainsi qu'à des biberons remplis d'eau.

Les souris ont été pesées toutes les semaines puis tous les 2 jours. Lorsque leur état général ou leur poids avait diminué de plus de 20%, elles ont été sacrifiées par élongation conformément aux règles de bonnes pratiques éthiques.

### **1. Injection intra-tibiale des cellules PC-3 et LNCaP surexprimant ou non la Cx43.**

Afin d'étudier l'impact de la Cx43 dans le développement de tumeurs osseuses des cellules cancéreuses prostatiques, des injections intra-tibiales ont été effectuées.

Pour cela, les cellules ont été décrochées avec de la trypsine/EDTA (Lonza) puis centrifugées pendant 10 min à 300 g. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS à hauteur de  $6.10^5$  cellules/ 5  $\mu\text{L}$ .

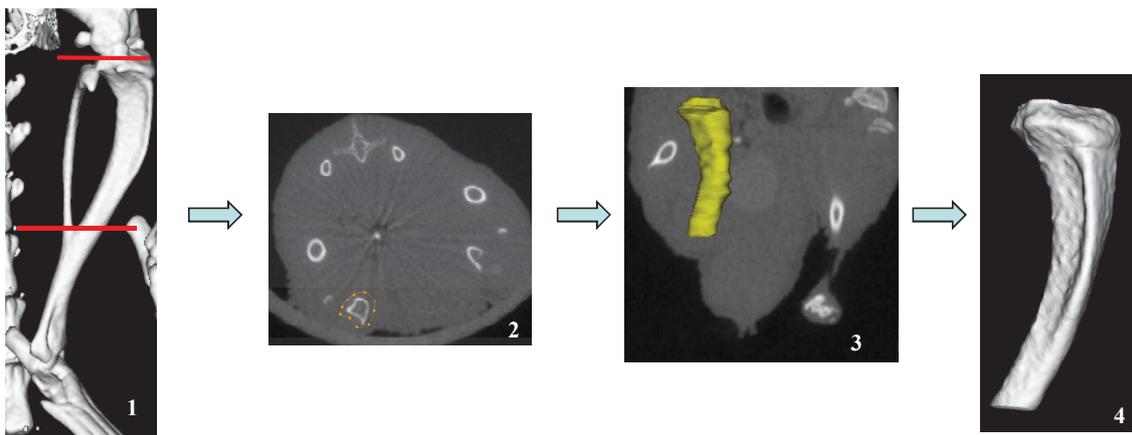
Après avoir anesthésié les souris par voie chimique (100 mg/kg kétamine et 10 mg/kg xylazine, Sigma),  $6.10^5$  cellules cancéreuses prostatiques ont été injectées à l'aide d'une seringue Hamilton préalablement lavée avec de l'alcool à 70% et de l'eau pour préparation injectable. L'aiguille a été enfoncée par mouvements rotationnels environ de 3 mm afin d'être localisée dans la tête du tibia droit au niveau de l'os spongieux, lieu de l'hématopoïèse, favorisant ainsi l'apparition de métastases. Le tibia gauche a reçu en contrôle, une injection avec du PBS. Afin de contrôler la position correcte de l'aiguille, une imagerie radiographique 2D (Faxitron) a été effectuée.

Afin d'étudier le développement des tumeurs osseuses, deux types d'analyse ont été effectués : au 20<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> jour après l'injection pour les cellules LNCaP mock et les cellules LNCaP Cx43 et au 12<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jour pour les cellules PC-3 mock et les cellules PC-3 Cx43 :

**A** Site d'injection des cellules  
cancéreuses prostatiques



**B**



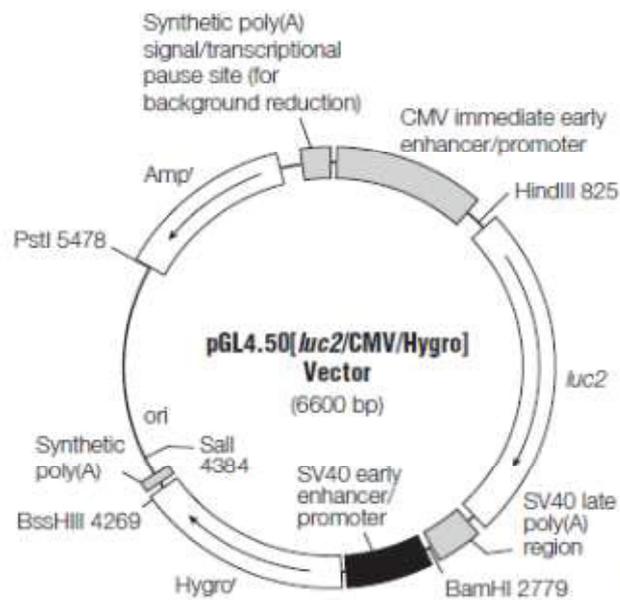
**Figure 35 : Exemple de radiographie 2D et 3D obtenue lors de l'injection intra-tibiale.**

**A)** Radiographie 2D permettant de localiser la seringue Hamilton avant l'injection des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 dans la tête du tibia. **B)** Radiographie 3D permettant de calculer le volume osseux du tibia. Des régions d'intérêt ont été tracées sur chaque plan de coupe transversale (2) entre les 2 repères rouge (1) (tête du tibia et la zone d'interaction entre le tibia et le péroné). Une fois la région d'intérêt tracée (3), une reconstitution du volume de celle-ci a été réalisée, en isosurface et en appliquant un seuillage (4).

- Une imagerie tomодensitométrie X (CT120, General Electric) : les animaux ont été anesthésiés par un mélange air/isoflurane 2% (Aerrane, Baxter) pour toute la durée de l'examen. Afin d'obtenir des données quantitatives, des volumes d'intérêts ont été tracés pour chaque tibia (traités et témoins) depuis la tête du tibia jusqu'à la jonction entre le tibia et le péroné. Une fois la région d'intérêt tracée, une reconstitution du volume de celle-ci a été réalisée, en isosurface et en appliquant un seuillage. Une valeur de volume osseux du tibia en  $\text{mm}^3$  a pu ensuite être obtenue (Figure 35).
- Une Imagerie tomoscintigraphique SPECT/CT (NanoSPECT/CT, Bioscan) : les souris ont été également anesthésiées avec de l'isoflurane à 2%. Cette imagerie est basée sur l'utilisation du Méthylène diphosphonate (MDP) marqué au Tc99m. Le MDP a la capacité de se fixer sur les cristaux d'hydroxyapatite au niveau de l'os spongieux et ainsi il sera possible de localiser les sites d'ostéogénèse (hyperfixation). Les paramètres utilisés lors de l'acquisition en SPECT sont 24 projections avec un temps d'exposition de 50 sec par projection. Les souris ont été imagées en moyenne 60 min après l'injection du radiotracer. La quantité de radioactivité présente dans les tibias a été déterminée grâce au logiciel InVivoScope (Bioscan) après avoir dessiné un volume d'intérêt contenant la radioactivité du tibia et de l'articulation du genou.

## **2. Injection intra-cardiaque des cellules PC-3 surexprimant ou non la Cx43.**

Afin de suivre l'évolution des cellules PC-3 mock ou Cx43 après injection, les cellules ont été préalablement transfectées avec un plasmide exprimant le gène luc2 codant pour la luciférase sous la dépendance du promoteur fort CMV. Brièvement, la transfection du plasmide pGL4.50 (CMV/luc2/hygro) (Figure 36) a été effectuée grâce à l'agent transfectant FuGENE® HD (Roche) en suivant les recommandations du fournisseur en utilisant la ration 4  $\mu\text{l}$  de l'agent transfectant pour 1  $\mu\text{g}$  de plasmide. Vingt quatre heures après la transfection, la sélection à l'hygromycine a commencé à une concentration de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et la dose a été diminuée progressivement jusqu'à atteindre 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  15 jours après la transfection. L'efficacité de la transfection a été testée tout au long de la sélection et également quelques jours avant l'injection intracardiaque avec le kit Luciferase Assay System (Promega) et le luminomètre Glomax® 20/20 (Promega).



**Figure 36 : Schéma du plasmide pGL4.50[luc 2/CMV/Hygro].**

Le gène luc2 codant pour la luciférase est sous la dépendance du promoteur fort CMV. Il y a également un gène de résistance à l'hygromycine sous la dépendance du promoteur SV40.

Le jour de l'injection intracardiaque, les cellules ont été décrochées avec de la trypsine/EDTA (Lonza), puis centrifugées pendant 10 min à 300 g. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS à hauteur de  $1,125 \cdot 10^7$  cellules/mL.

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane à 4% et maintenues sous anesthésie lors de l'injection à 2% d'isoflurane. Ensuite, après avoir placé la souris en décubitus dorsal, 100  $\mu$ L de cellules sont prélevés avec une seringue de 1 mL possédant une aiguille 27G et ont été injectés dans le ventricule gauche. Afin de contrôler l'efficacité de l'injection, une imagerie de bioluminescence de la souris a été réalisée dans les 20 min suivant l'injection. L'injection a été considérée comme réussie si la quantification du rapport thorax/Corps entier est inférieure à 0.6.

L'imagerie de bioluminescence a été réalisée une fois par semaine pendant 5 semaines par injection intrapéritonéale de la luciférine (2 mg pour 100  $\mu$ L, Proméga) avec un appareil Ivis®Lumina (Caliper Life sciences, USA) avec un temps d'acquisition de 1 à 5 min.

#### **XIV. Tests statistiques.**

Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne de  $n$  expérimentations  $\pm$  erreur standard de la moyenne (S.E.M, standard error of the mean). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test Anova à une entrée suivi d'un test post-hoc de Tukey pour les PCR quantitatives en temps réel. L'autre test statistique utilisé a été le test de Student (t) non apparié pour les autres expériences.

Pour ces deux tests statistiques, les valeurs ont été considérées comme significatives pour une valeur de  $P < 0,05^*$  ;  $P < 0,01^{**}$  ;  $P < 0,001^{***}$ .

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la version 4.0 du logiciel GraphPad Prism pour le système d'exploitation Windows (GraphPad Software).

*Résultats*

## **Résultats.**

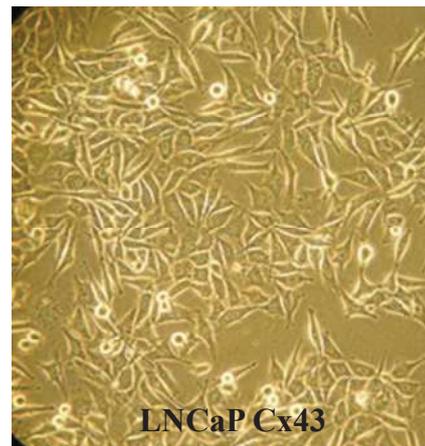
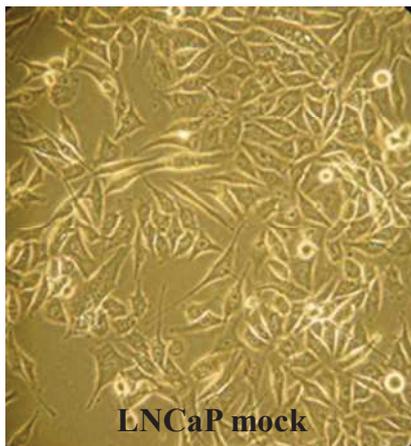
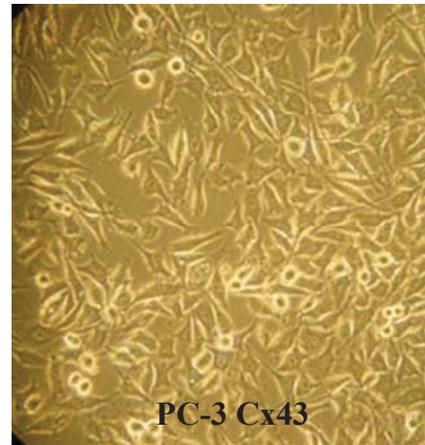
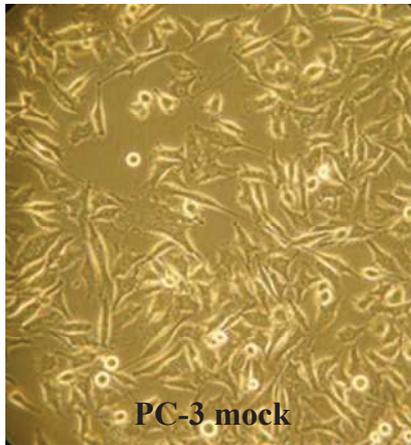
Deux lignées cancéreuses prostatiques, les cellules PC-3 et les cellules LNCaP, ont permis d'étudier l'impact de la surexpression de la Cx43 sur leur potentiel métastatique et sur le développement de métastases osseuses. Ces deux types cellulaires ont des caractéristiques métastatiques différentes : les cellules PC-3 sont très invasives et sont issues d'un adénocarcinome de grade IV isolé au niveau d'une métastase osseuse alors que les cellules LNCaP sont moins agressives et sont issues d'un carcinome isolé à partir d'une métastase au niveau d'un ganglion lymphatique. Leur morphologie est de type fusiforme (Figure 37).

### **I. Caractérisation des lignées cancéreuses prostatiques suite à la surexpression de la Cx43.**

#### **1. Validation de la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP.**

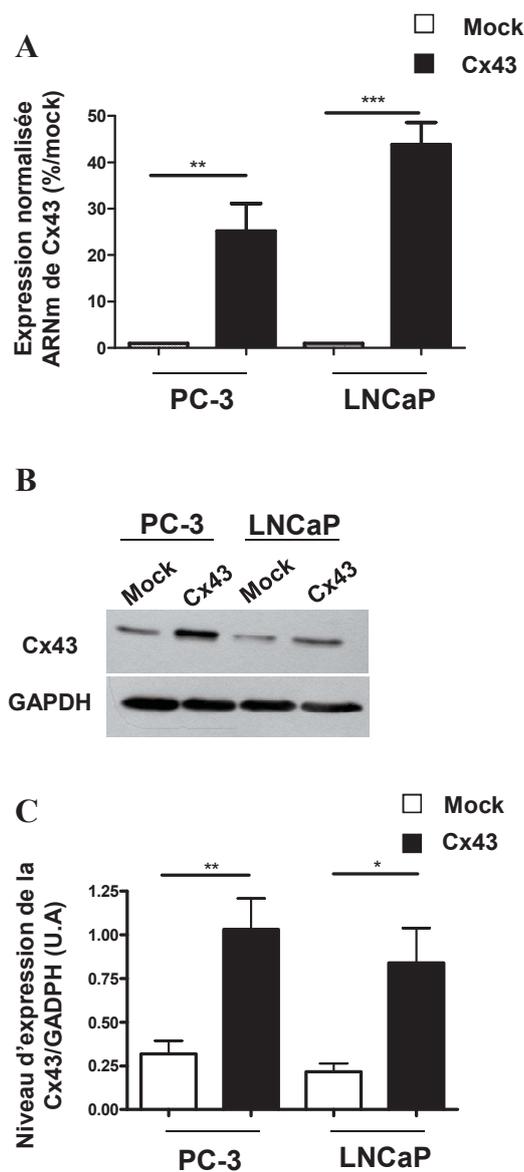
La surexpression de la Cx43 dans les lignées cancéreuses prostatiques a été effectuée par une infection rétrovirale afin d'obtenir une transfection stable donnant naissance aux cellules PC-3 Cx43 et LNCaP Cx43. En parallèle, des cellules ont été transfectées avec le plasmide natif permettant de générer les cellules mock. La sélection des cellules a été effectuée pendant 10 jours par l'ajout de 0,5 µg/mL de puromycine dans leur milieu de culture. Au-delà, les cellules ont été amplifiées et congelées.

L'efficacité de la surexpression de la Cx43 a été étudiée par RT-qPCR pour évaluer le niveau d'expression d'ARN messager et par western blot pour évaluer le niveau d'expression protéique de la Cx43. Ainsi, une augmentation d'un facteur  $25,21 \pm 5,9$  et de  $43,86 \pm 4,74$  du niveau d'ARNm par rapport aux cellules mock est observée respectivement pour les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (Figure 38A). Concernant le niveau protéique, une augmentation de 3,3 fois et de 4 fois par rapport aux cellules mock est observée respectivement pour les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (niveau d'expression de la Cx43 par rapport à la GAPDH : PC-3 mock :  $0,31 \pm 0,007$  U.A ; PC-3 Cx43 :  $1,032 \pm 0,17$  U.A ; LNCaP mock :  $0,21 \pm 0,04$  U.A ; LNCaP Cx43 :  $0,84 \pm 0,19$  U.A ; Figure 38B et C). De plus, les niveaux de Cx43 sont similaires entre les cellules mock et les cellules natives non transfectées. Comme



**Figure 37 : Photographie en contraste de phase des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43.**

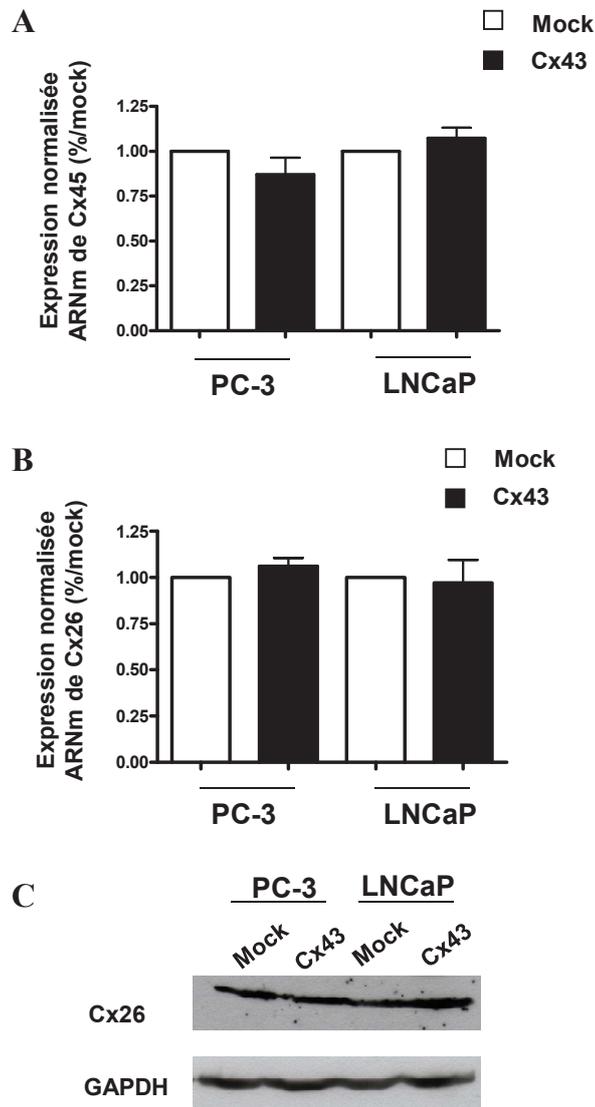
Les images représentent les cellules PC-3 et LNCaP surexprimant ou non la Cx43 en contraste de phase au grossissement (x40).



**Figure 38 : Validation de la surexpression de la Cx43 par infection rétrovirale.**

**A)** Niveaux d'expression de l'ARNm de la Cx43 quantifié par RT-qPCR. Les histogrammes représentent les valeurs relatives normalisées à 100% par rapport aux cellules mock. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=3. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*\*P<0,01 et \*\*\*P<0,001. **B)** Exemple de Western blot de la Cx43 obtenu pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43. **C)** Analyse densitométrique du niveau d'expression protéique de la Cx43. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression protéique de la Cx43 par rapport à la protéine de référence la GAPDH. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. \*P<0,05 et \*\*P<0,01.

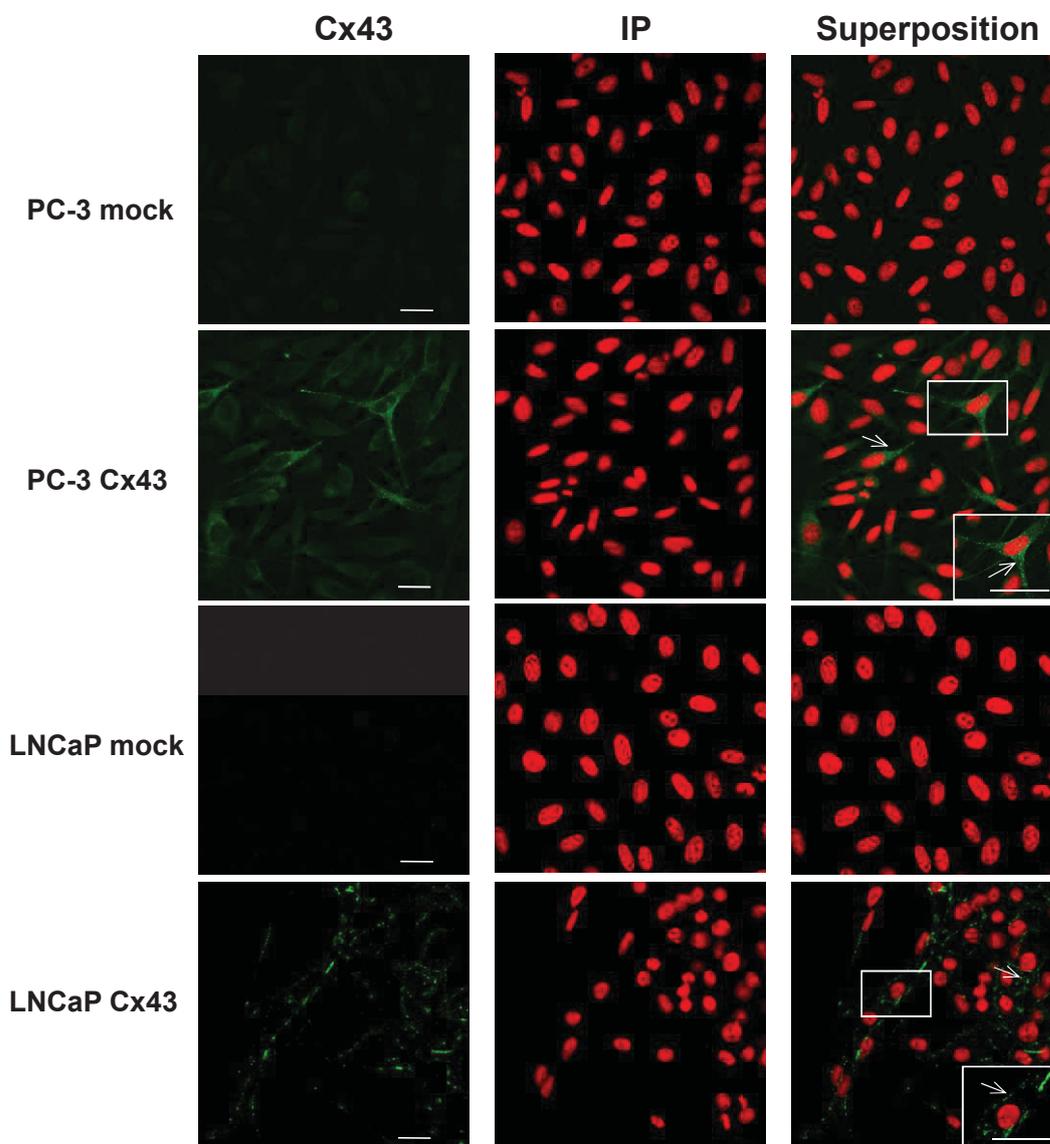
Pour les histogrammes, les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43.



**Figure 39 : Etude du niveau d'expression de la Cx26 et de la Cx45 dans les lignées cancéreuses prostatiques transfectées par la Cx43.**

**A)** Niveau d'expression de l'ARNm de la Cx45. Les histogrammes représentent les valeurs relatives normalisées à 100% par rapport aux cellules mock. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=3. **B)** Niveau d'expression de l'ARNm de la Cx26. Les histogrammes représentent les valeurs relatives normalisées à 100% par rapport aux cellules mock. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=3. **C)** Exemple de Western blot de la Cx26 obtenu pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. Les populations étudiées ne sont pas significativement différentes. Les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43.



**Figure 40 : Immunolocalisation de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques.**

L'immunolocalisation a été effectuée dans les cellules PC-3 mock et Cx43 ainsi que dans les cellules LNCaP mock et Cx43. Les noyaux sont marqués à l'iodure de propidium. La superposition des images permet de visualiser le marquage de la Cx43 et de l'iodure de propidium.

Les flèches blanches permettent de cibler la Cx43 dans le cytoplasme pour les cellules PC-3 Cx43 et à la membrane pour les cellules LNCaP Cx43. Les carrés blancs ciblent les zones agrandies de deux fois pour visualiser la Cx43. Concernant les cellules PC-3 mock et les cellules LNCaP mock aucun marquage de la Cx43 n'a été observé.

Barre d'échelle: 100  $\mu$ m.

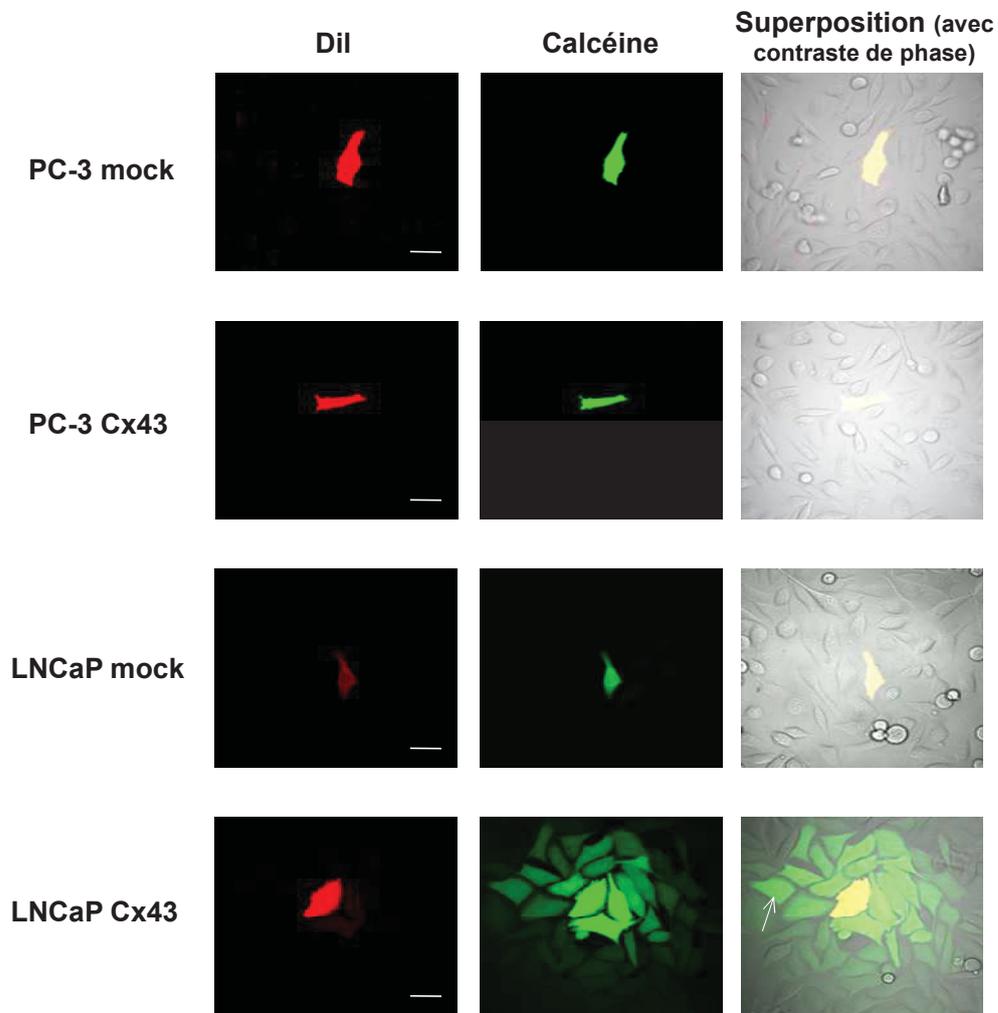
attendu, l'infection rétrovirale utilisant le plasmide pMSCVpuro n'engendre qu'une augmentation modérée du niveau d'expression de la Cx43.

Sachant que les cellules épithéliales saines prostatiques expriment la Cx43 et la Cx32 et qu'il a été montré par RT-qPCR que les cellules PC-3 et les cellules LNCaP expriment aussi la Cx45 et la Cx26 (Saladino et al., 2002; Tate et al., 2006), il a été nécessaire de vérifier que la surexpression de la Cx43 ne modifiait pas l'expression de ces connexines. Ainsi, des expériences de RT-qPCR ont permis de vérifier que le niveau d'expression de la Cx45 et de la Cx26 était inchangé suite à la surexpression de la Cx43 aussi bien dans les cellules PC-3 que dans les cellules LNCaP (Figure 39A et B). De plus, aucune variation du niveau protéique de la Cx26 n'a pu être mise en évidence dans nos conditions expérimentales (Figure 39C). Enfin, la Cx32 n'a pu être détectée dans les deux lignées considérées aussi bien pour les cellules mock que pour les cellules surexprimant la Cx43.

De ce fait, la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP n'entraîne aucune modification d'expression de la Cx26, la Cx32 et la Cx45. Donc aucune compensation ne semble se mettre en place entre les membres de cette famille multigénique.

Il est à noter que l'étude portant sur l'impact de la Cx43 sur les potentiels métastatiques des lignées cancéreuses prostatiques avait commencé avec trois lignées comprenant les cellules PC-3, les cellules LNCaP et les cellules DU145. Mais la dernière lignée présentait, suite à la surexpression, des niveaux d'expression de la Cx43 beaucoup trop élevés. En effet, le niveau d'ARNm était augmenté de 240 fois et le niveau protéique de plus de 10 fois par rapport aux cellules mock. De plus, les cellules DU145 Cx43 étaient très fragiles lors de la mise en culture puisqu'elles présentaient une perte d'adhérence. Donc, au vu de l'augmentation trop importante du niveau d'expression de la Cx43 dans les cellules DU145, la suite de l'étude n'a pas porté sur ces cellules.

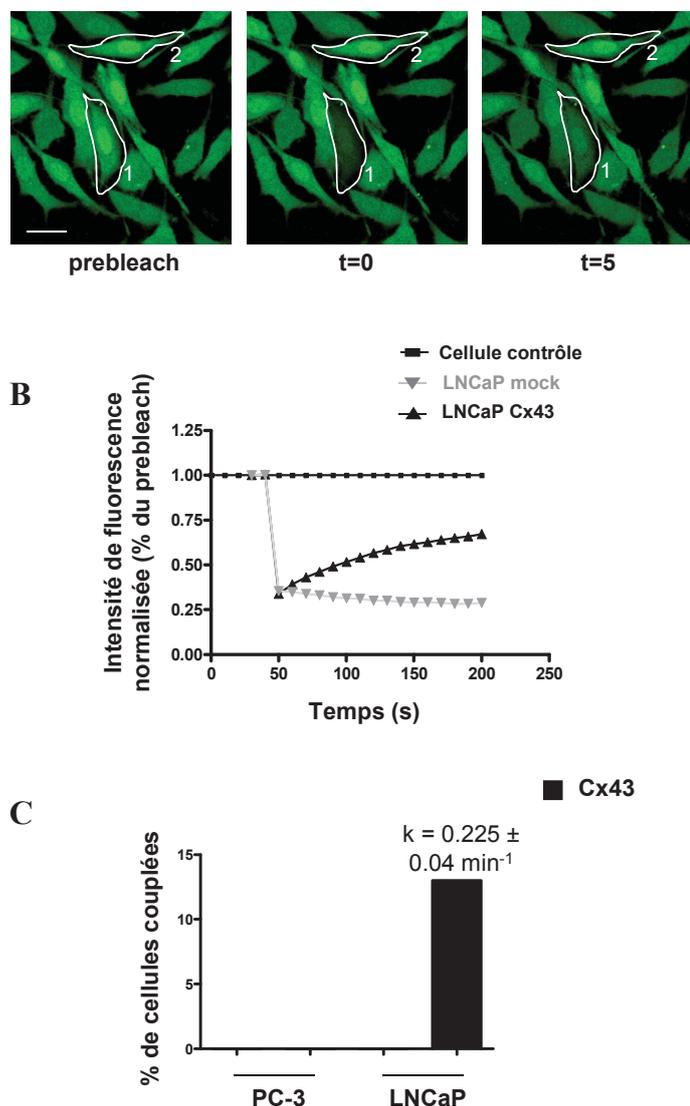
Par la suite, la localisation cellulaire par immunocytochimie de la Cx43 au sein des cellules cancéreuses prostatiques a permis d'observer une localisation différente entre les cellules PC-3 Cx43 et les cellules LNCaP Cx43. En effet, la Cx43 présente un marquage cytoplasmique pour les cellules PC-3 Cx43 alors que pour les cellules LNCaP Cx43, elle est localisée principalement à la membrane plasmique caractérisé par un marquage ponctiforme. En revanche, aucun immunomarquage n'a pu être mis en évidence dans les cellules mock (Figure 40).



**Figure 41 : Etude du couplage homocellulaire des lignées cancéreuses prostatiques par la technique de précharge.**

Les cellules donneuses sont chargées avec un marqueur membranaire correspondant au Dil (10  $\mu\text{m}$ ) et avec la molécule diffusible à travers les jonctions communicantes correspondant à la calcéine (5 $\mu\text{m}$ ). Les cellules sont ensuite déposées 4h sur le même type cellulaire à confluence. Une diffusion de la calcéine aux cellules receveuses est observable seulement pour les cellules LNCaP Cx43.

Laf flèche cible la diffusion de la calcéine aux cellules adjacentes. Barre d'échelle: 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 42 : Etude du couplage homocellulaire des lignées cancéreuses prostatiques par la technique de gap-FRAP.**

**A)** Exemple d'image de la distribution de la fluorescence dans les cellules LNCaP Cx43. Prebleach: image obtenue avant l'extinction de la fluorescence; t=0 : image au temps d'extinction de la fluorescence; t=5 : image obtenue 5 min après l'extinction de la fluorescence. Les cellules ont été chargées avec 7  $\mu\text{g/mL}$  de 6-carboxyfluorescéine diacétate. Polygone 1: cellule testée; polygone 2: cellule témoin. **B)** Exemple représentatif de courbes de retour de fluorescence normalisées, exprimées en pourcentage de la fluorescence initiale (prebleach) en fonction du temps. Les cellules LNCaP mock n'ont pas de retour exponentiel au contraire des cellules LNCaP Cx43. **C)** Mesure du pourcentage de cellules couplées accompagnée de la mesure de la constante  $k$ ,  $n=25$  pour les cellules PC-3 mock et Cx43 ainsi que pour les cellules LNCaP mock,  $n=66$  pour les cellules LNCaP Cx43.

Barre d'échelle: 100  $\mu\text{m}$ .

Enfin, le couplage jonctionnel a été étudié par la méthode de gap-FRAP et la méthode de précharge mettant en évidence un couplage fonctionnel seulement pour les cellules LNCaP Cx43. En effet, grâce à la méthode de précharge, il a été observé une diffusion de la calcéine de la cellule donneuse aux cellules receveuses juste pour les cellules LNCaP Cx43. Concernant les cellules mock et les cellules PC-3 Cx43, la cellule donneuse marquée par le DiL n'établit pas de communication cellulaire avec les cellules adjacentes car aucun transfert de la calcéine n'a pu être observé (Figure 41).

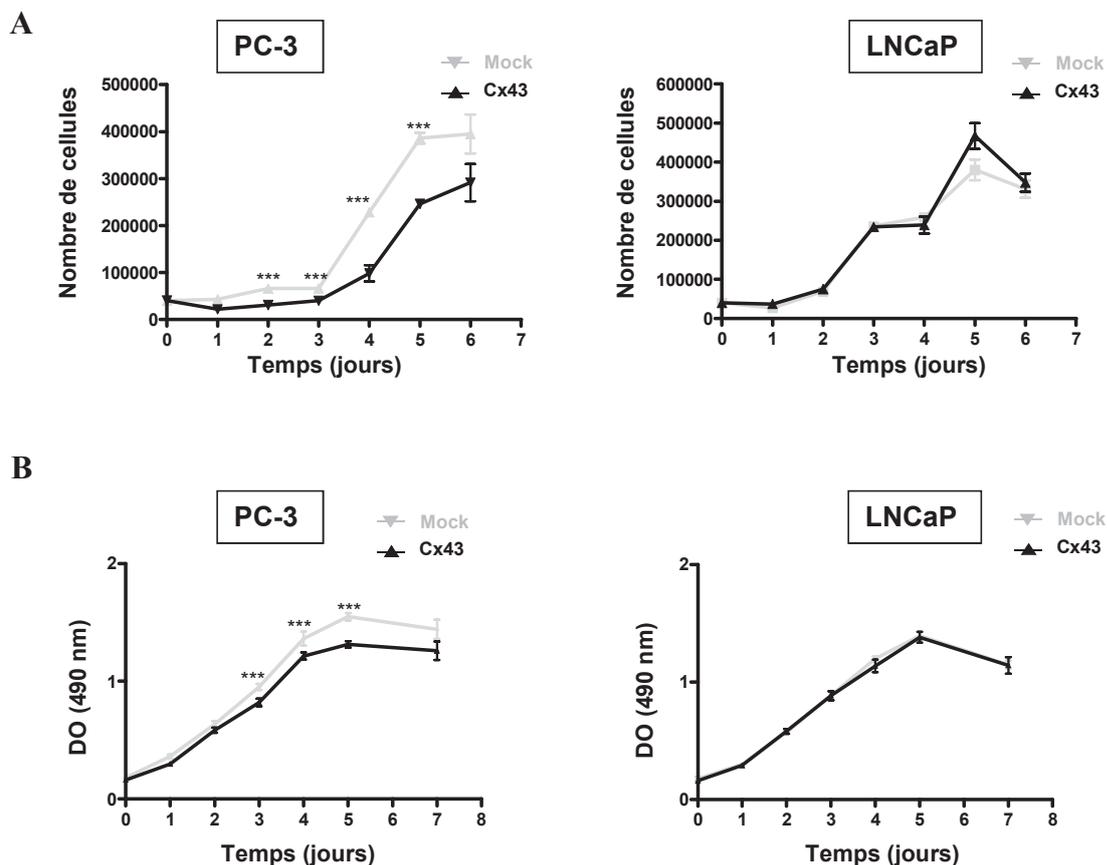
De plus, la quantification du couplage jonctionnel par la méthode de gap-FRAP a permis de confirmer l'absence de communication intercellulaire par les jonctions communicantes pour les cellules PC-3 et LNCaP mock et les cellules PC-3 Cx43. Mais pour les cellules LNCaP Cx43, un retour de la fluorescence a été observé pour 13% des cellules testées avec une constante de retour de fluorescence  $k$  de  $0.225 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$  (Figure 42).

Par conséquent, pour les cellules LNCaP Cx43, non seulement la Cx43 est présente à la membrane plasmique mais elle est également fonctionnelle, permettant d'établir un couplage homocellulaire.

Il est à noter que la surexpression de la Cx43 perdure dans le temps et ce même après dix passages en trypsine. Mais dans nos conditions expérimentales, les cellules n'ont pas été utilisées au-delà de dix passages.

## **2. Conséquences phénotypiques de la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques.**

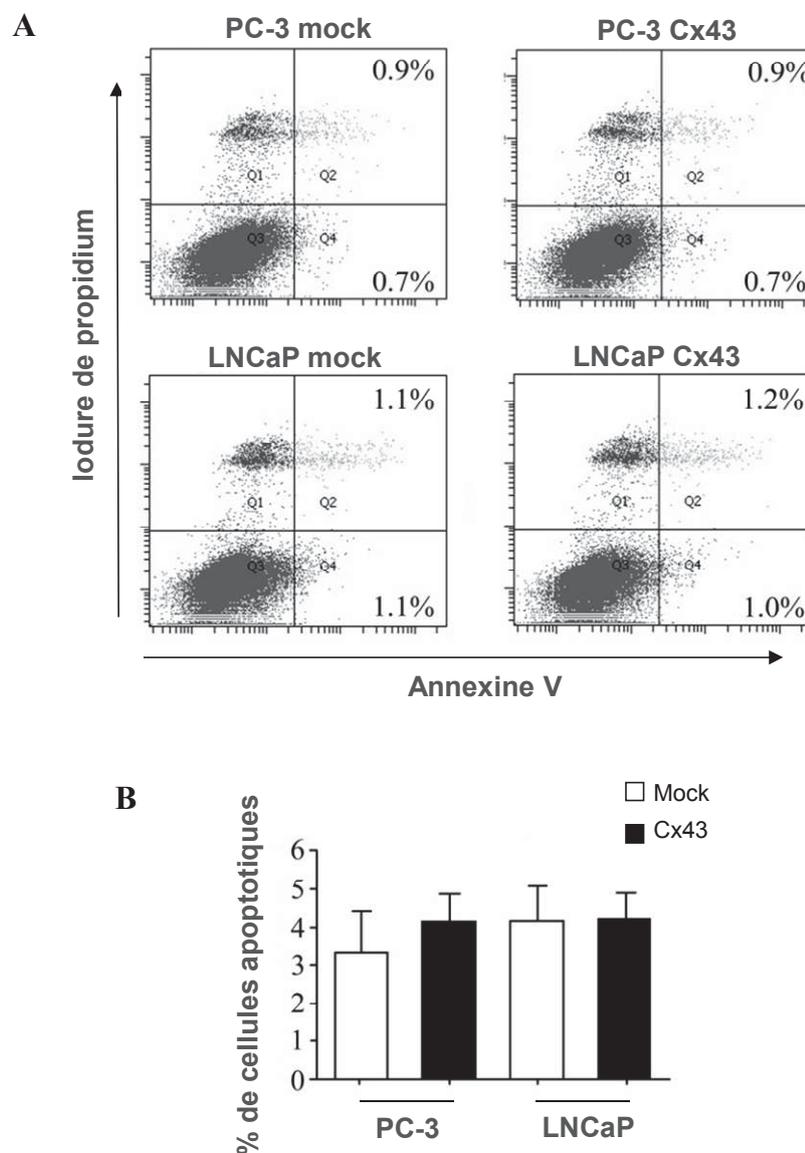
Tout d'abord, l'impact de la surexpression de la Cx43 sur la prolifération des lignées cancéreuses prostatiques a été étudié par la technique de coloration au bleu de méthylène permettant d'évaluer le nombre de cellules vivantes et ce pendant plusieurs jours (du jour de l'ensemencement jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de culture). Il s'avère que la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 diminue de moitié le nombre de cellules à partir du 2<sup>ème</sup> jour de culture (PC-3 mock :  $65,9.10^3 \pm 2,988.10^3$  cellules ; PC-3 Cx43 :  $30,74.10^3 \pm 5,024.10^3$  cellules). De plus, cette diminution significative de la prolifération est également observée les jours suivants. En effet, au 4<sup>ème</sup> et au 5<sup>ème</sup> jour de culture, le nombre de cellules est diminué respectivement de 58% et de 37% par rapport aux cellules PC-3 mock (4<sup>ème</sup> jour : PC-3 mock :  $228,2.10^3 \pm 3,7.10^3$  cellules ; PC-3 Cx43 :  $98,26.10^3 \pm 17,4.10^3$  cellules ; 5<sup>ème</sup> jour : PC-3 mock :  $386,4.10^3 \pm 11,59.10^3$  cellules ; PC-3 Cx43 :  $246,1.10^3 \pm 5,15.10^3$  cellules).



**Figure 43 : Effet de la surexpression de la Cx43 sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques.**

**A)** Etude de la prolifération des cellules PC-3 mock et Cx43 (gauche) et des cellules LNCaP mock et Cx43 (droite) par la coloration au bleu de méthylène. Les courbes représentent le nombre de cellules en fonction du temps, n=4 en triplicat. **B)** Etude de la prolifération des cellules PC-3 mock et Cx43 (gauche) et des cellules LNCaP mock et Cx43 (droite) par le test colorimétrique XTT. Les courbes représentent la densité optique (DO: 490 nm) mesurée en fonction du temps. La DO est proportionnelle au nombre de cellules, n=4 en triplicat.

L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. \*\*\*P<0,001.



**Figure 44 : Effet de la surexpression de la Cx43 sur l'apoptose spontanée des cellules cancéreuses prostatiques.**

**A)** Exemple du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexineV obtenu après analyse en cytométrie de flux pour les cellules PC-3 mock et Cx43 ainsi que pour les cellules LNCaP mock et Cx43. **B)** Pourcentage de cellules apoptotiques correspondant aux cellules annexineV positives, après 4 jours de culture. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4.

Pour l'histogramme, les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. Les populations étudiées ne sont pas significativement différentes.

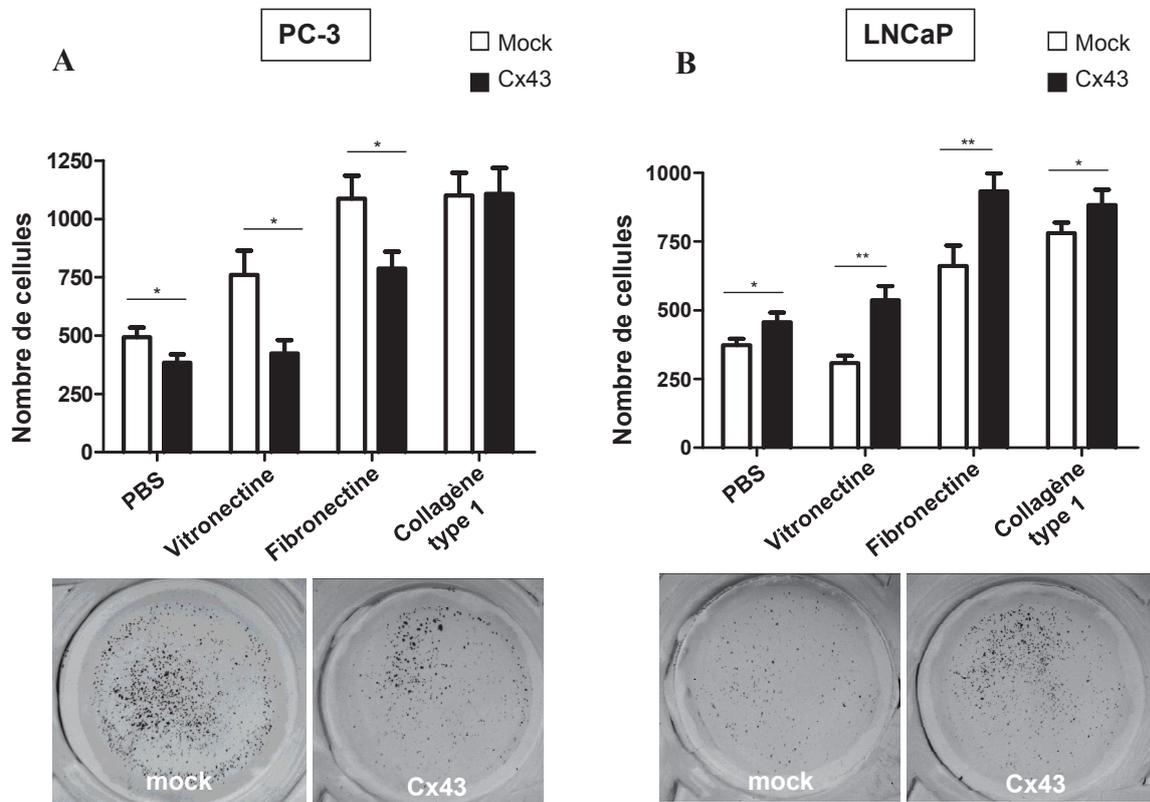
Concernant les cellules LNCaP, aucune modification de la prolifération n'a été mesurée entre les cellules LNCaP mock et les cellules LNCaP Cx43 même après 5 jours de culture (Figure 43A).

Afin de valider les résultats obtenus sur la prolifération par le test au bleu de méthylène, un test basé sur l'activité mitochondriale des cellules a été utilisé permettant de mettre en évidence une diminution de la coloration liée à une diminution du nombre de cellules pour les cellules PC-3 Cx43 par rapport aux cellules PC-3 mock à partir du 3<sup>ème</sup> jour de culture. Cette diminution est moins importante que celle obtenue par le test au bleu de méthylène. Cela permet de confirmer que la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 diminue la prolifération des cellules alors qu'elle n'a aucun effet pour les cellules LNCaP (Figure 43B).

Cependant, la diminution du nombre de cellules pour les cellules PC-3 Cx43 pourrait être liée non pas à une diminution de la prolifération mais à une augmentation de l'apoptose. Pour cela, l'utilisation de l'annexineV couplée au FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) a permis de marquer en vert les cellules apoptotiques et de mesurer l'apoptose spontanée des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, dans une cellule non-apoptotique, les phosphatidylsérines membranaires sont situées sur la face interne de la membrane plasmique. Mais dès qu'une cellule entre en apoptose, elles sont délocalisées et exprimées des deux côtés de la membrane. L'annexine ayant une forte affinité pour ces phosphatidylsérines va aller se fixer sur celles présentes sur le feuillet externe et marquer les cellules apoptotiques.

De plus, l'utilisation combinée d'iodure de propidium permet de différencier les cellules nécrotiques des cellules apoptotiques. De ce fait, après marquage des cellules et passage dans le cytomètre en flux, les cellules apoptotiques à prendre en compte sont marquées par l'annexineV. Le simple marquage à l'iodure de propidium correspond à de la nécrose cellulaire ou à quelques débris cellulaires. Donc, les cellules marquées à l'annexineV vont correspondre à l'addition de la zone Q2 et de la zone Q4 représentées sur la figure 44A.

Cela a permis d'observer que la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP ne modifie pas l'apoptose spontanée des cellules correspondant à un niveau basal de 4% de la population totale (Figure 44B). A noter que l'étude sur l'apoptose a été effectuée après 4 jours de culture, correspondant au temps où la diminution du nombre de cellules était la plus importante pour les cellules PC-3 Cx43.

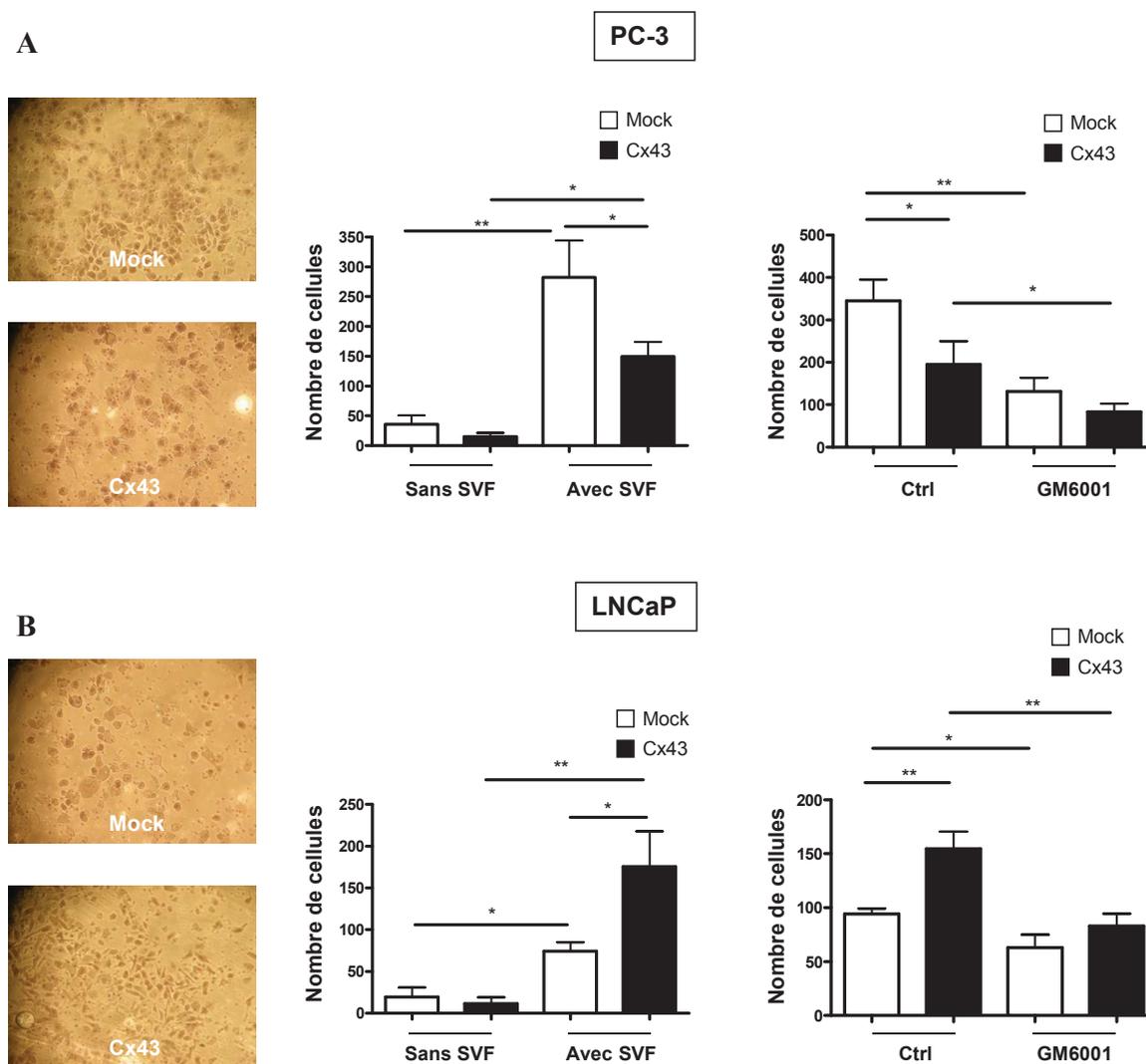


**Figure 45 : Effet de la surexpression de la Cx43 sur les capacités d'adhérence des cellules cancéreuses prostatiques.**

**A)** Nombre de cellules PC-3 mock et Cx43 ayant adhéré en fonction de la matrice extracellulaire. Les photographies sont représentatives des cellules adhérentes colorées au crystal violet. **B)** Nombre de cellules LNCaP mock et Cx43 ayant adhéré en fonction de la matrice extracellulaire. Les photographies sont représentatives des cellules adhérentes colorées au crystal violet.

Les différentes matrices utilisées sont la vitronectine, la fibronectine et le collagène de type 1 à 0,5 µg/mL; le PBS étant un contrôle. Chaque barre représente la valeur moyenne ± SEM, n=4 en triplicat.

Les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. \*P<0,05 ; \*\*P<0,01.



**Figure 46 : Effet de la surexpression de la Cx43 sur les capacités invasives des cellules cancéreuses prostatiques.**

**A)** Nombre de cellules PC-3 mock et Cx43 ayant traversé le Matrigel®. Au centre, le SVF est considéré comme chimioattractant. A droite, traitement avec un inhibiteur de l'activité des MMPs: GM6001 (10  $\mu$ M). Les photographies sont représentatives des cellules colorées à l'éosine/hématoxyline ayant envahi sur la face inférieure de l'insert (x10). **B)** Nombre de cellules LNCaP mock et Cx43 ayant traversé le Matrigel®. Au centre, le SVF est considéré comme chimioattractant. A droite, traitement avec un inhibiteur de l'activité des MMPs: GM6001 (10  $\mu$ M). Les photographies sont représentatives des cellules colorées à l'éosine/hématoxyline ayant envahi sur la face inférieure de l'insert (x10).

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4 en triplicat pour le test avec le gradient de SVF et n=2 en triplicat pour le traitement au GM6001.

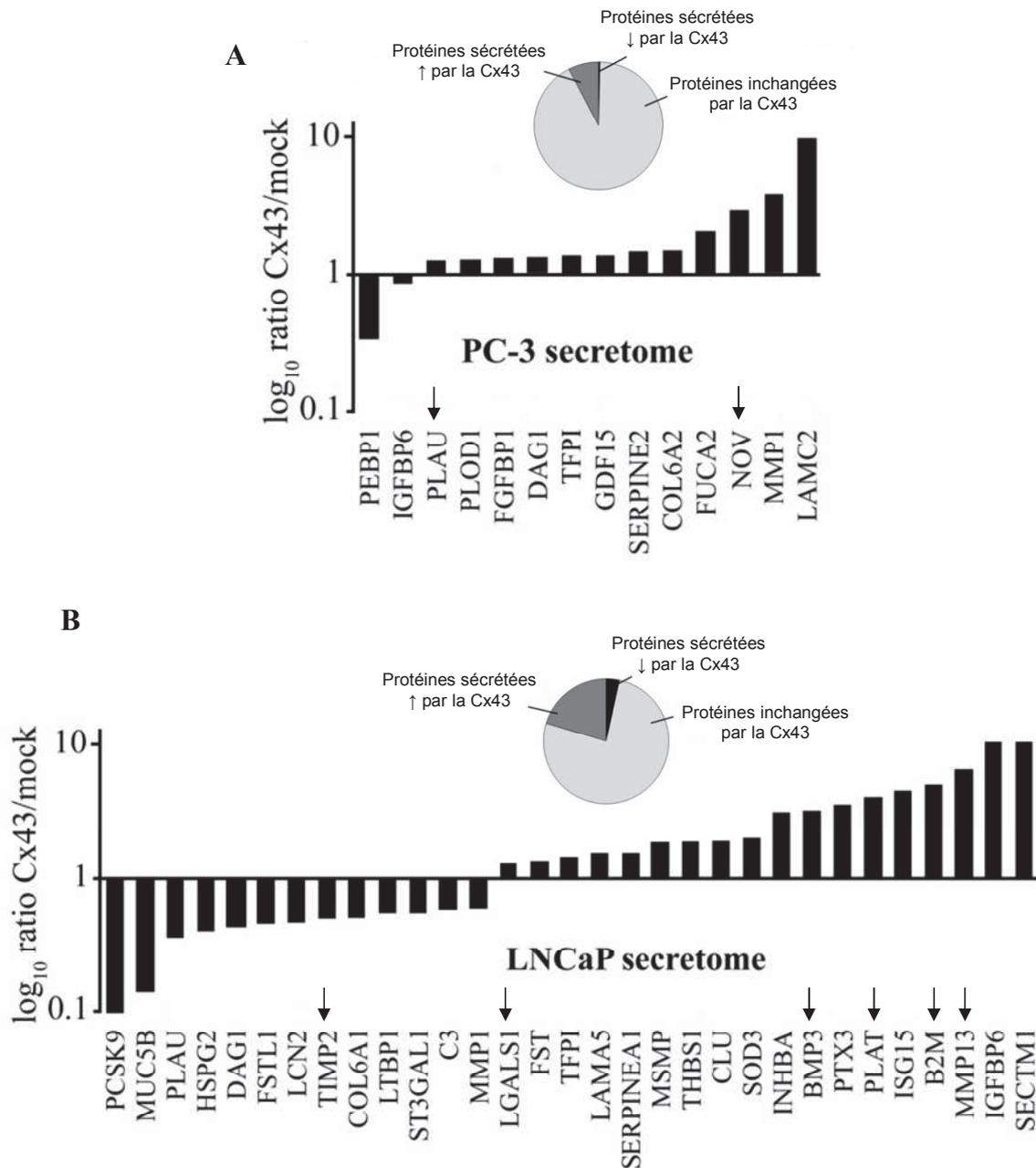
Les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. \*P<0,05 ; \*\*P<0,01.

Ainsi, la surexpression de la Cx43 entraîne une diminution de la prolifération pour les cellules PC-3 Cx43 sans modification de l'apoptose.

Par la suite, les capacités d'adhérence et d'invasion des cellules cancéreuses prostatiques ont été évaluées. L'adhérence des cellules a été testée sur trois protéines constitutives de la matrice extracellulaire : la vitronectine, la fibronectine ainsi que le collagène de type 1 (0,5 µg/mL) exprimés notamment dans le tissu osseux. Tout d'abord, les cellules PC-3 mock sont plus adhérentes que les cellules LNCaP mock. Par ailleurs, l'adhérence des différentes cellules est augmentée sur la fibronectine et le collagène de type 1 par rapport à la condition témoin sans protéine matricielle (puits traités au PBS). De plus, les cellules PC-3 Cx43 présentent une diminution significative de l'adhérence de 45% sur la vitronectine et de 18% sur la fibronectine ainsi que sur la condition témoin par rapport aux cellules PC-3 mock. Concernant l'adhérence sur le collagène de type 1, aucune variation n'a été observée pour les cellules PC-3 Cx43 (Figure 45A). A l'inverse, l'adhérence est augmentée pour les cellules LNCaP Cx43 par rapport aux cellules LNCaP mock et cet effet est observé pour toutes les protéines matricielles. En effet, l'adhérence est augmentée de 74,9% sur la vitronectine, de 41% sur la fibronectine et de 18% sur le collagène de type 1 (Figure 45B).

Les expériences effectuées en chambre de Boyden avec 25 µg de Matrigel® ont permis de mesurer les capacités invasives des cellules cancéreuses prostatiques. Dans ces conditions expérimentales, un gradient de SVF a été utilisé. En effet, dans la condition avec SVF, les cellules sont déposées sur le Matrigel® avec 0,5% de SVF et sous l'insert le milieu de culture contient 10% de SVF alors que pour la condition sans SVF, le gradient n'existe pas. Ceci a permis de mettre en évidence que les cellules cancéreuses prostatiques, quelque soit leur génotype, déclenchent l'invasion lorsqu'elles sont attirées par un environnement plus propice.

Concernant les cellules PC-3, l'invasion est augmentée de 8 fois pour les PC-3 mock et de 10 fois pour les cellules PC-3 Cx43 en présence du gradient de SVF. Mais l'invasion des cellules PC-3 Cx43 est réduite de 48% par rapport aux cellules PC-3 mock en présence du gradient de SVF (PC-3 mock :  $282,1 \pm 61,85$  cellules ; PC-3 Cx43 :  $149,1 \pm 24,48$  cellules ; Figure 46A). Pour les cellules LNCaP, le gradient de SVF agit sur leurs capacités invasives avec une augmentation de 3,8 fois pour les cellules LNCaP mock et de 15,9 fois pour les cellules LNCaP Cx43. A l'inverse des cellules PC-3, la surexpression de la Cx43 accroît les capacités invasives des cellules LNCaP en présence du gradient de SVF de 136% par rapport



**Figure 47 : Analyse comparative des protéines sécrétées des cellules cancéreuses prostatiques.**

A) En haut, répartition quantitative en secteurs des protéines communes aux cellules PC-3 mock et PC-3 Cx43, inchangées ou modifiées par la transfection. En bas, histogramme représentant les ratio (protéines des cellules PC-3 Cx43/protéines des cellules PC-3 mock). B) En haut, répartition quantitative en secteurs des protéines communes aux cellules LNCaP mock et LNCaP Cx43, inchangées ou modifiées par la transfection. En bas, histogramme représentant les ratio (protéines des cellules LNCaP Cx43/protéines des cellules LNCaP mock).

Le ratio >1 correspond aux protéines dont la sécrétion est augmentée par la surexpression de la Cx43. Le ratio <1 correspond aux protéines dont la sécrétion est diminuée par la surexpression de la Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne ± SEM, n=3.

aux cellules LNCaP mock (LNCaP mock :  $74,5 \pm 10,71$  cellules ; LNCaP Cx43 :  $175,5 \pm 42,4$  cellules ; Figure 46B).

Un traitement au GM6001, un inhibiteur de l'activité de la MMP1, la MMP2, la MMP3, la MMP8 et la MMP9, a permis de mettre en évidence que les cellules cancéreuses prostatiques utilisaient les MMPs pour digérer le Matrigel®. En effet, une diminution de 62% et de 57% est observée respectivement pour les cellules traitées PC-3 mock et PC-3 Cx43 par rapport aux cellules non traitées (PC-3 mock :  $344,8 \pm 50,43$  cellules ; PC-3 Mock GM6001 :  $131,32 \pm 32,08$  cellules ; PC-3 Cx43 :  $195 \pm 54,46$  cellules ; PC-3 Cx43 GM6001 :  $83 \pm 19,47$  cellules). Concernant les cellules LNCaP, une diminution de 33% et de 46% est observée respectivement pour les cellules traitées LNCaP mock et LNCaP Cx43 par rapport aux cellules non traitées (LNCaP mock :  $94 \pm 5,177$  cellules ; LNCaP Mock GM6001 :  $63 \pm 12,07$  cellules ; LNCaP Cx43 :  $154,6 \pm 16,02$  cellules ; LNCaP Cx43 GM6001 :  $82,83 \pm 11,59$  cellules).

Finalement, la surexpression de la Cx43 a un impact différent sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques avec une diminution des capacités d'adhérence et d'invasion pour les cellules PC-3 Cx43 et une augmentation pour les cellules LNCaP Cx43.

Afin de compléter la caractérisation phénotypique des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43, une analyse des protéines sécrétées ou sécrétome a été réalisée. Avant de procéder à une étude comparative entre les cellules mock et les cellules Cx43, une étude d'identification de toutes les protéines pour chaque type cellulaire a été effectuée. Cette analyse comparative a été difficile à cause du nombre de protéines identifiées (>500 protéines/lignées) et de la variabilité lors de la reproduction de l'expérience. Cette analyse du sécrétome a été abandonnée au profit d'une étude quantitative et comparative des protéines uniquement exprimées dans les cellules mock et les cellules Cx43. Le plus prometteur a été de faire une détermination quantitative uniquement des protéines exprimées à la fois dans les cellules mock et les cellules Cx43.

Tout d'abord, le nombre de protéines sécrétées dont l'expression est modifiée par la surexpression de la Cx43 est plus important pour les cellules LNCaP où 31 facteurs présentent une expression altérée pour 17 concernant les cellules PC-3. Parmi les facteurs d'intérêt se trouvent les protéines participant à la signalisation cellulaire, les protéines présentes dans la matrice extracellulaire et celles présentes dans l'environnement osseux (Figure 47).

Symbole des protéines	Nom	PC-3	LNCaP	Fonction	Référence
<b>Signalisation cellulaire</b>					
IGFBP6	IGF-binding protein 6	down	up	Expression et demi vie ↑ dans les cas de cancer du pancréas	Xu et al., 2009
NOV	protein NOV homolog (IGFBP9)	up		Rôle de NOV dans la ↓ de la croissance des cellules de gliomes et du potentiel tumorigénique. Facteur ayant un impact négatif sur la prolifération	Gellhaus., 2010 Sin et al., 2008
PTX3	Pentraxin-related protein		up	↑ d'expression dans le sérum de patient atteint d'un cancer du poumon et dans le cancer de la prostate	Diamandis et al., 2011 Ravenna et al., 2009
FST	follistatin		up	↑ d'expression dans le cas de cancer de la prostate avec métastase osseuse	Tumminello et al., 2010
<b>Angiogenèse</b>					
THSBS1	thrombospondin-1		up	↑ adhérence et invasion des cellules cancéreuses mammaires et est un facteur anti-angiogénique	John et al., 2010 Gustavsson et al., 2010 Goel et al., 2009
<b>Protéines de la matrice extracellulaire</b>					
DAG1	Dystroglycan	up	down	↓ d'expression dans le cancer de la prostate et dans le cancer du rein	Henry et al., 2001 Sgambato et al., 2007
MMP1	Matrix metalloproteinases 1	up	down	Impliquée dans l'invasion des cellules du cancer de l'estomac et de la prostate	Yoneda et al., 2010 Lein et al., 1998 Bao et al., 2010
PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	up	down	Clivage du plasminogène pour avoir la forme active, plasmine. Il participe à l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques	Helenius et al., 2006 Almasi et al., 2011
LAMC2	Laminin subunit gamma 2	up		Participe à la migration et à l'organisation des cellules. ↑ de son expression dans les cellules cancéreuses prostatiques résistantes aux androgènes	Edwards et al., 2003
MMP13	Matrix metalloproteinases 13		up	Son expression est associée avec les hauts grades du cancer de la prostate	Morgia et al., 2005
PLAT	Tissue-type plasminogen activator		up	Impliquée dans la migration des cellules et la migration des cellules cancéreuses du pancréas	Diaz et al., 2002
LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		down	↑ d'expression quand les cellules tumorales mammaires métastasent	Wang et al., 2011 Bauer et al., 2008
TIMP2	metalloproteinase inhibitor 2		down	TIMP2 diminue la prolifération et l'angiogenèse <i>in vivo</i> et le développement de métastases	Mendes et al., 2007 Trudel et al., 2008
<b>Environnement osseux</b>					
FGFBP1	fibroblast growth factor-binding protein 1	up		Associé à la densité minérale osseuse: ↑	Hoppman et al., 2010
GDF15	growth/differentiation factor 15	up		↓ différenciation des ostéoclastes	Vanhara et al., 2009
B2M	Beta-2-microglobulin		up	Impliqué dans l'ostéomimétisme et augmente la prolifération des ostéoblastes	Mink et al., 2010 Huang et al., 2008 Huang et al., 2006
BMP3	bone morphogenic protein 3		up	Inhibe la formation osseuse et est augmenté dans métastases osseuses lytiques	Bentley et al., 1992 Daluisi et al., 2001
LGALS1	galectin-1		up	Augmente l'activité de la PAL et diminue la sécrétion de l'ostéocalcine par les ostéoblastes	Andersen et al., 2003

**Tableau 10 : Description des protéines sécrétées d'intérêt dont l'expression est modifiée par la surexpression de la Cx43 dans les lignées cancéreuses prostatiques.**

Up: augmentation de la sécrétion, Down: diminution de la sécrétion, suite à la surexpression de la Cx43.

Concernant les cellules PC-3, la surexpression de la Cx43 entraîne une augmentation de sécrétion d'un facteur antimittotique NOV corrélant avec les résultats obtenus sur l'étude de la prolifération cellulaire. Néanmoins, quelques facteurs impliqués dans l'invasion voient aussi leur sécrétion augmentée avec la surexpression de la Cx43 comme par exemple la MMP1 (Matrix Metalloproteinase 1) ou PLAU (Urokinase-type Plasminogen Activator). Mais cette augmentation d'expression est très faible par rapport à celle du facteur NOV (Figure 47A).

Pour les cellules LNCaP, la surexpression de la Cx43 augmente la sécrétion de protéines participant à l'invasion et à la migration des cellules telles que la MMP-13 et PLAT (Tissue-type plasminogen activator) et diminue l'expression d'inhibiteurs de métalloprotéinases comme TIMP2 (Metalloproteinase inhibitor 2) corrélant avec l'accroissement de l'invasion suite à la surexpression de la Cx43. De plus, une augmentation de la sécrétion de facteurs jouant un rôle dans l'ostéomimétisme ou étant impliqué dans le renouvellement osseux tels que la  $\beta$ 2M (Beta-2-Microglobulin) et la BMP3 (Bone Morphogenic Protein 3) a été également observée (Figure 47B).

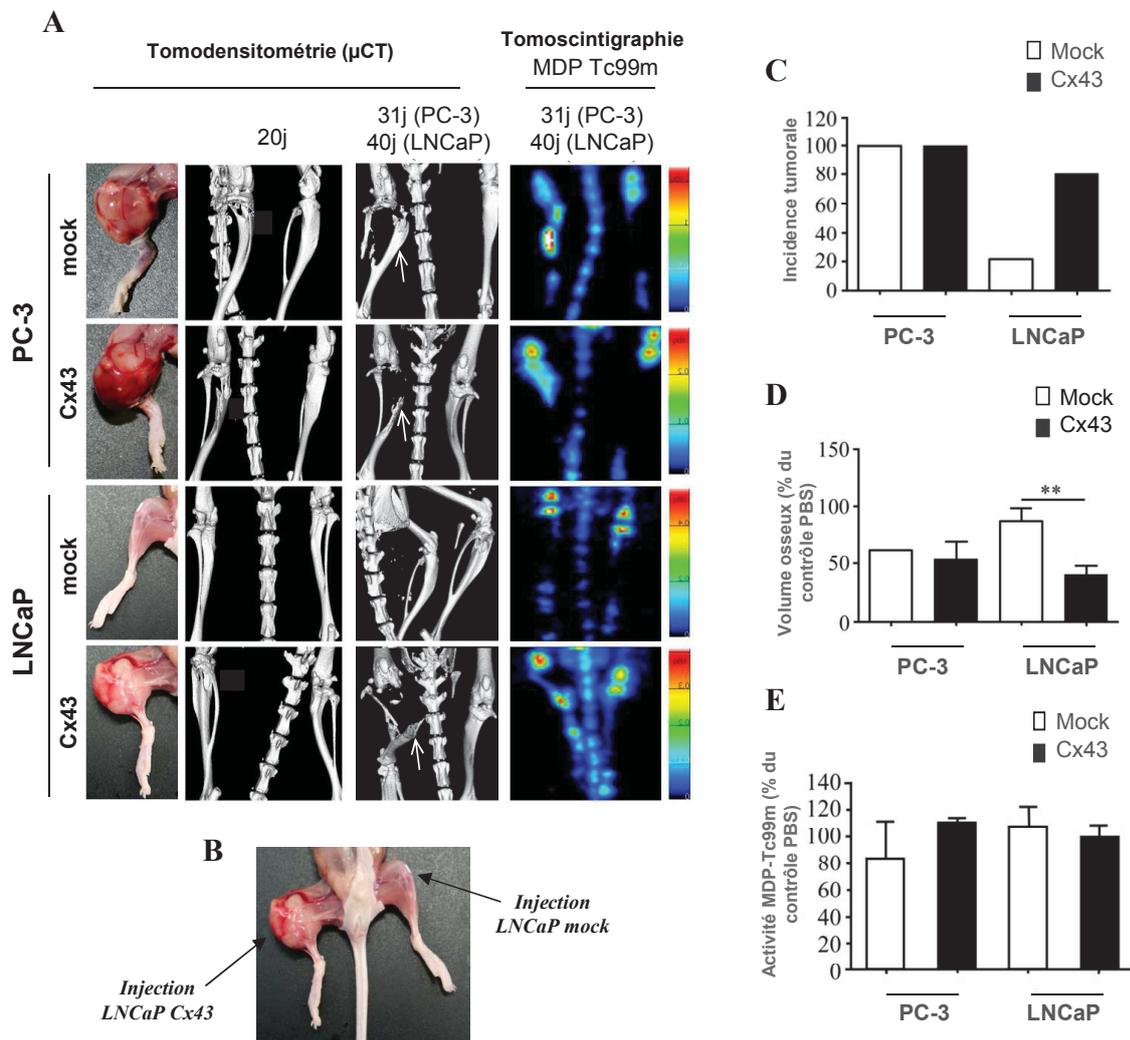
Le tableau 10 permet de résumer les facteurs sécrétés d'intérêt modifiés par la surexpression de la Cx43.

Même si certaines évolutions de facteurs sécrétés corrélerent avec le phénotype observé *in vitro*, il est difficile de conclure sur les variations d'expression des protéines et des analyses en western blot seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

## **II. Impact *in vivo* des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur le développement de métastases osseuses.**

### **1. Etude du développement de métastases osseuses suite à l'injection intra-tibiale des lignées cancéreuses surexprimant ou non la Cx43 chez la souris BALB/c Nude.**

Afin d'étudier le développement de tumeur dans le tissu osseux, les cellules tumorales prostatiques surexprimant ou non la Cx43 ont été injectées dans la tête du tibia de souris BALB/c-Nude à hauteur de  $6.10^5$  cellules dans 5  $\mu$ L de PBS. A partir de là, deux types d'analyse ont été effectuées. Tout d'abord, une analyse de tomodynamométrie suivie d'une reconstruction en 3D ont été utilisées pour suivre l'intégrité du squelette, son niveau de



**Figure 48 : Développement de métastases osseuses suite à l'injection intra-tibiale des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 chez la souris BALB/c-Nude.**

**A)** Exemple de photographies de pattes et d'images obtenues par tomographie et par tomoscintigraphie suite au développement de tumeur osseuse après injection intra-tibiale de  $6.10^5$  cellules PC-3 mock et Cx43 et des cellules LNCaP mock et Cx43. Les flèches indiquent la destruction de l'os après le développement de la tumeur ostéolytique. **B)** Photographie à J40 d'une souris injectée dans la patte droite avec les cellules LNCaP Cx43 et dans la patte gauche avec les cellules LNCaP mock. **C)** Histogramme de l'incidence tumorale pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43. **D)** Pourcentage du volume osseux résiduel par rapport au contrôle (injection PBS) après développement de la tumeur pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43. **E)** Pourcentage d'activité du MDP-Tc99m par rapport au contrôle (injection PBS) après développement de la tumeur à 31 jours pour l'injection avec les cellules PC-3 mock et Cx43 et à 40 jours pour l'injection avec les cellules LNCaP mock et Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=3$ . Les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student  $t$  pour des valeurs non appariées: \*\* $P<0,01$ .

minéralisation et donc de déterminer si la tumeur est de nature ostéolytique ou ostéoblastique. Afin de compléter ces données, une analyse de tomoscintigraphie par fixation du MDP-Tc99m va permettre d'une part de confirmer la présence de sites d'ostéogenèse et d'autre part de déterminer le développement d'éventuels sites secondaires d'ostéogenèse. Chaque analyse a été effectuée sur trois temps pour les cellules PC-3 mock et Cx43 (12<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et 31<sup>ème</sup> jours) et sur deux temps pour les cellules LNCaP mock et Cx43 (20<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> jours). En effet, pour les cellules PC-3 le développement de la tumeur était plus rapide que pour les cellules LNCaP avec un sacrifice des souris à 31 jours pour les souris injectées avec les cellules PC-3 et à 40 jours pour celles injectées avec les cellules LNCaP. Il est à noter que le développement tumoral commence à être détecté à partir du 20<sup>ème</sup> jour (Figure 48A).

La première analyse de l'incidence tumorale n'a mis en évidence aucune différence entre les souris injectées avec les cellules PC-3 mock et celles injectées avec les cellules PC-3 Cx43. En effet, dans les deux conditions, il y a eu 100% de prise tumorale. A l'inverse pour les injections avec les cellules LNCaP, une différence significative de l'incidence a été observée avec une augmentation de l'incidence de 4 fois pour les cellules LNCaP Cx43 par rapport aux cellules LNCaP mock. En effet, dans 22% des cas les souris injectées avec les cellules LNCaP mock développent des tumeurs alors que les souris injectées avec les LNCaP Cx43 développent des tumeurs dans 84% des cas (Figure 48C). Une souris a eu une double injection : les cellules LNCaP mock dans la patte gauche et les cellules LNCaP Cx43 dans la patte droite. Au bout de 40 jours, seules les cellules LNCaP Cx43 développent une tumeur (Figure 48B).

Les tumeurs se développant dans chaque condition ont un diamètre de 1 cm environ et ne présentent pas de différences morphologiques.

La deuxième analyse faite par tomодensitométrie a permis de déterminer la nature de la tumeur. Il s'avère que, dans toutes les conditions, la tumeur qui se développe est de type ostéolytique caractérisée par une dégradation très nette de l'os à 31 jours pour les souris injectées avec les cellules PC-3 mock ou Cx43 et de 40 jours pour les souris injectées avec les cellules LNCaP mock ou Cx43. Grâce à une reconstruction en 3D, une mesure du volume osseux du tibia a pu être effectuée. Cela a permis de mettre en évidence que la perte osseuse était la même pour les souris injectées avec les cellules PC3 mock ou Cx43 (47% de perte osseuse). Mais, pour les souris injectées avec les cellules LNCaP, une perte osseuse plus importante a été observée pour les cellules LNCaP Cx43 par rapport aux cellules LNCaP

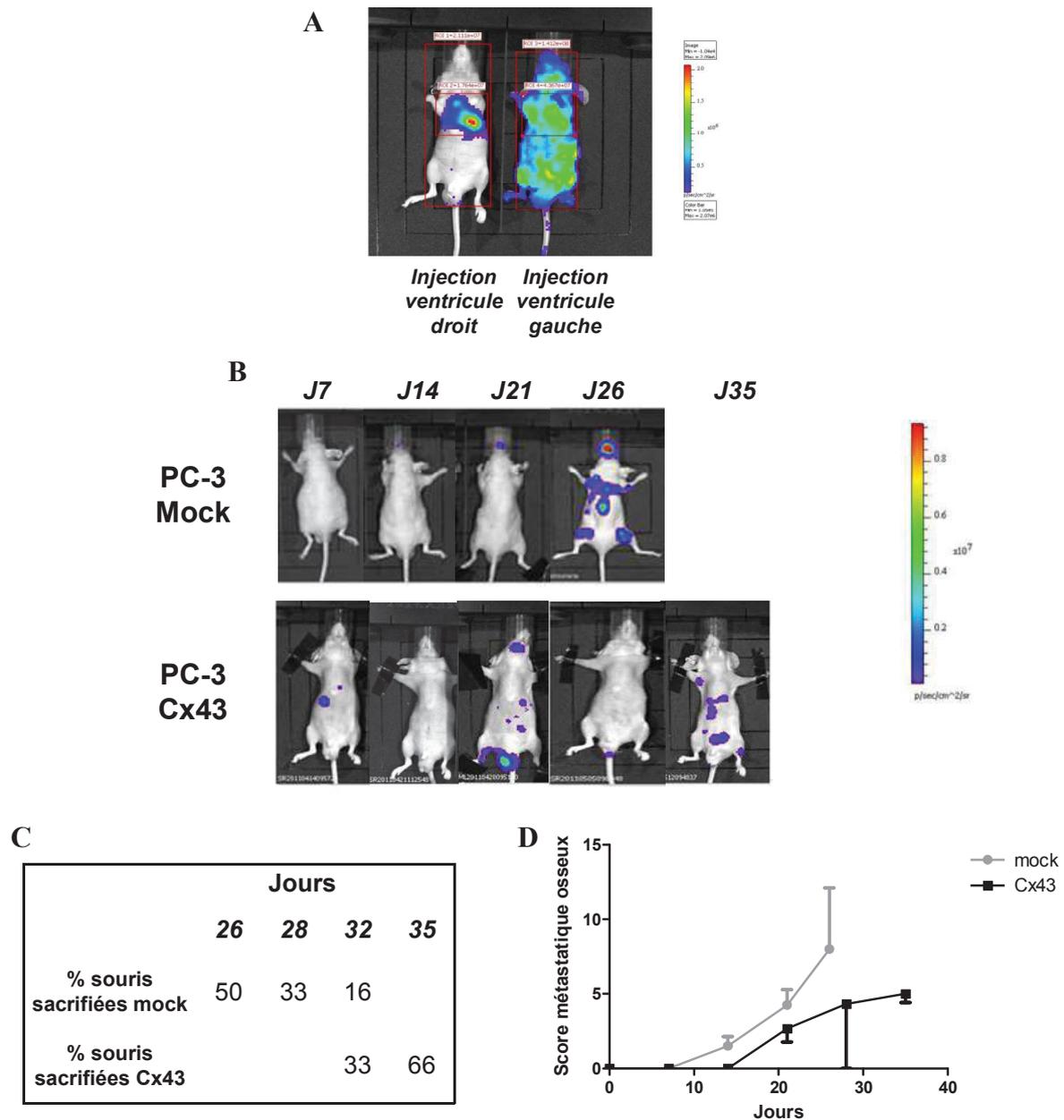
mock. En effet, les cellules LNCaP Cx43 présentes dans la tête du tibia entraînent une diminution du volume osseux de 60 % contre à peine 10% pour les cellules LNCaP mock (Figure 48D).

Enfin la dernière analyse a permis de visualiser les sites d'ostéogenèse par fixation du MDP-Tc99m sur les cristaux d'hydroxyapatite au niveau de l'os spongieux. Pour chaque condition, quand la tumeur se développait, il a pu être observé une délocalisation du site d'ostéogenèse au niveau du péroné (jonction basse tibia-péroné) mais sans variation d'intensité de la fixation du MDP-Tc99m. Ainsi, l'activité ostéogénique totale n'est pas altérée par la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques (Figure 48E).

Finalement, la surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP accroît l'implantation et le développement de tumeurs dans l'os.

## **2. Etude préliminaire de la dissémination des cellules PC-3 surexprimant ou non la Cx43 suite à l'injection intra-cardiaque chez la souris BALB/c Nude.**

Afin d'étudier l'impact de la Cx43 sur la dissémination des cellules PC-3, des injections intra-cardiaques ont été effectuées chez la souris BALB/c Nude. Préalablement, les cellules PC-3 mock ou Cx43 ont été transfectées avec un plasmide contenant le gène codant pour la luciférase afin de pouvoir localiser par la suite les cellules disséminées. Cette étude n'a été faite qu'une seule fois et les résultats obtenus sont préliminaires. Ainsi,  $1,125 \cdot 10^6$  cellules dans 100  $\mu$ L de PBS ont été injectées dans le ventricule gauche des souris. Afin de s'assurer que l'injection a été effectuée dans le ventricule gauche et non dans le ventricule droit, une injection de 2 mg luciférine a été faite 20 min après. Si la luminescence est localisée dans les poumons cela indique que l'injection des cellules a été effectuée dans le ventricule droit, mais si luminescence est répartie dans toute la souris alors l'injection intra-cardiaque gauche est validée. Un exemple d'image obtenue après l'injection des cellules est représenté figure 49A. De plus, un rapport de la luminescence thorax/corps entier a permis d'éliminer de l'étude toutes les souris dont le rapport était supérieur à 0,6. Ainsi 2 souris sur 8 ont été éliminées de l'étude pour les cellules PC-3 mock et 4 souris sur 7 pour les cellules PC-3 Cx43.



**Figure 49: Etude préliminaire de la dissémination des cellules PC-3 mock et Cx43 suite à l'injection intra-cardiaque chez la souris BALB/c-Nude.**

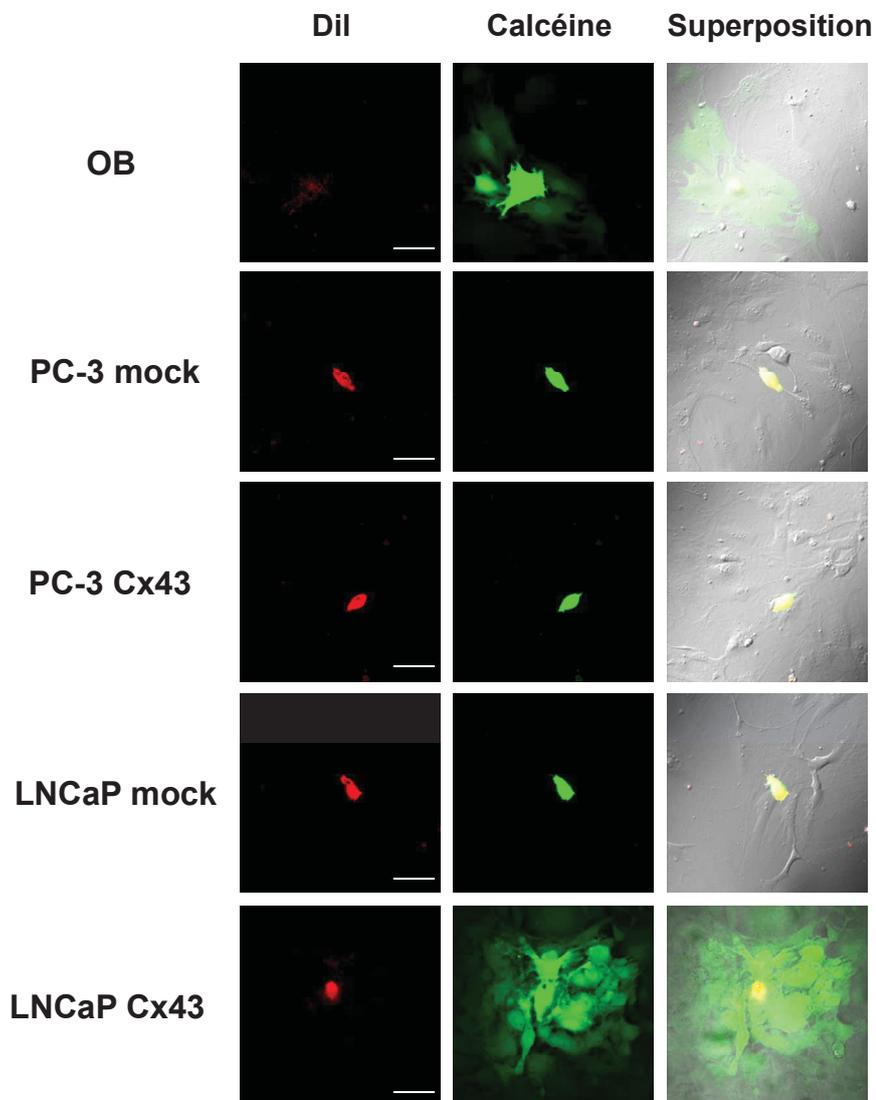
A) Exemple d'images de bioluminescence obtenues juste après l'injection de  $1,125 \cdot 10^5$  cellules tumorales prostatiques transfectées avec un plasmide contenant le gène de la luciférase. La bioluminescence présente dans le thorax correspond à une injection dans le ventricule droit, considérée comme ratée. La bioluminescence répartie dans l'organisme correspond à une injection dans le ventricule gauche, considérée comme réussie. B) Exemple d'images de bioluminescence obtenues à 7, 14, 21, 26 et 35 jours après l'injection intra-cardiaque des cellules PC-3 mock et Cx43. C) Tableau répertoriant le pourcentage de souris PC-3 mock et Cx43 sacrifiées en fonction du temps. D) Evolution du score métastatique osseux en fonction du temps. Les symboles représentent la moyenne  $\pm$  SEM des scores métastatiques,  $n=6$  souris pour les cellules PC-3 mock et  $n=3$  souris pour les cellules PC-3 Cx43.

Puis, l'imagerie de bioluminescence a été réalisée une fois par semaine environ pendant 5 semaines. En parallèle, les souris ont été pesées toutes les semaines puis plus régulièrement afin de ne pas dépasser une perte de poids de 20% ; au-delà les souris ont été euthanasiées.

Tout d'abord, suite à une perte de poids supérieure à 20%, 3, 2 et 1 souris ont été sacrifiées respectivement à J26, J28 et J35 après injection des cellules PC-3 mock. Pour les souris injectées avec les cellules PC-3 Cx43, le sacrifice a été plus tardif. En effet, une souris a été sacrifiée au bout du 32<sup>ème</sup> jour et les deux restantes ont été sacrifiées le dernier jour de l'étude à J35 (Figure 49C). Puis, la dissémination des cellules étudiée au cours du temps a permis de mettre en évidence que les cellules métastasaient principalement dans le tissu osseux. Ensuite, notre intérêt s'est porté sur les pattes antérieures et postérieures ainsi que sur la mâchoire, sites principaux de foyers métastatiques. Afin d'estimer quantitativement le développement des métastases osseuses, un score métastatique a été donné pour chaque mesure d'activité de la luciférase au niveau de ces cinq sites métastatiques, ce score étant proportionnel à l'intensité de luminescence :

- Un score de 0 correspond à l'absence de luminescence.
- Un score de 1 correspond à une luminescence entre 0 et 0,2 photons/sec/cm<sup>2</sup>.
- Un score de 2 correspond à une luminescence se situant entre 0,2 et 0,6 photons/sec/cm<sup>2</sup>.
- Un score de 3 correspond à une luminescence entre 0,6 et 0,8 photons/sec/cm<sup>2</sup>.

Les images de bioluminescence ont été enregistrées en face ventrale et en face dorsale pour chaque souris en fonction du temps. De ce fait, un score a été donné à la fois pour la face ventrale et la face dorsale pour chaque site métastatique, les deux valeurs étant par la suite additionnées. Puis pour chaque souris, à un temps donné, les scores de l'ensemble des sites métastatiques ont été additionnés permettant d'obtenir un score par souris et pour chaque temps. Enfin, pour chaque condition mock ou Cx43 et pour un temps donné, la moyenne des scores a été calculée permettant d'établir une courbe du score métastatique en fonction du temps représentée sur la figure 49D. Ainsi, pour les souris PC-3 mock, le développement de métastases semble commencer 7 jours après l'injection alors que pour les souris PC-3 Cx43 l'apparition de métastases semble plus tardive. De plus, l'évolution des métastases apparaît plus rapide et plus intense pour les souris PC-3 mock par rapport aux souris PC-3 Cx43. En



**Figure 50 : Etude du couplage hétérocellulaire entre les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 et les ostéoblastes par la technique de précharge.**

Les cellules cancéreuses prostatiques sont les cellules donneuses chargées avec un marqueur membranaire correspondant au Dil (10  $\mu$ M) et la molécule diffusible à travers les jonctions communicantes correspondant à la calcéine (5  $\mu$ M). Elles sont déposées sur les ostéoblastes.

Après 4h, une diffusion de la calcéine des cellules cancéreuses aux ostéoblastes est observable seulement pour les cellules LNCaP Cx43.

Barre d'échelle: 100  $\mu$ m.

effet, le score métastatique est de 7 à la fin de l'expérimentation à J28 pour les souris PC-3 mock alors qu'il n'ait que de 5 à J35 pour les souris PC-3 Cx43.

La dissémination ainsi que le développement de métastases osseuses semblent plus rapide et plus importante pour les cellules PC-3 mock que pour les cellules PC-3 Cx43. La Cx43 semble donc diminuer la dissémination de ces cellules.

### **III. Impact *in vitro* des lignées cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur le phénotype des ostéoblastes.**

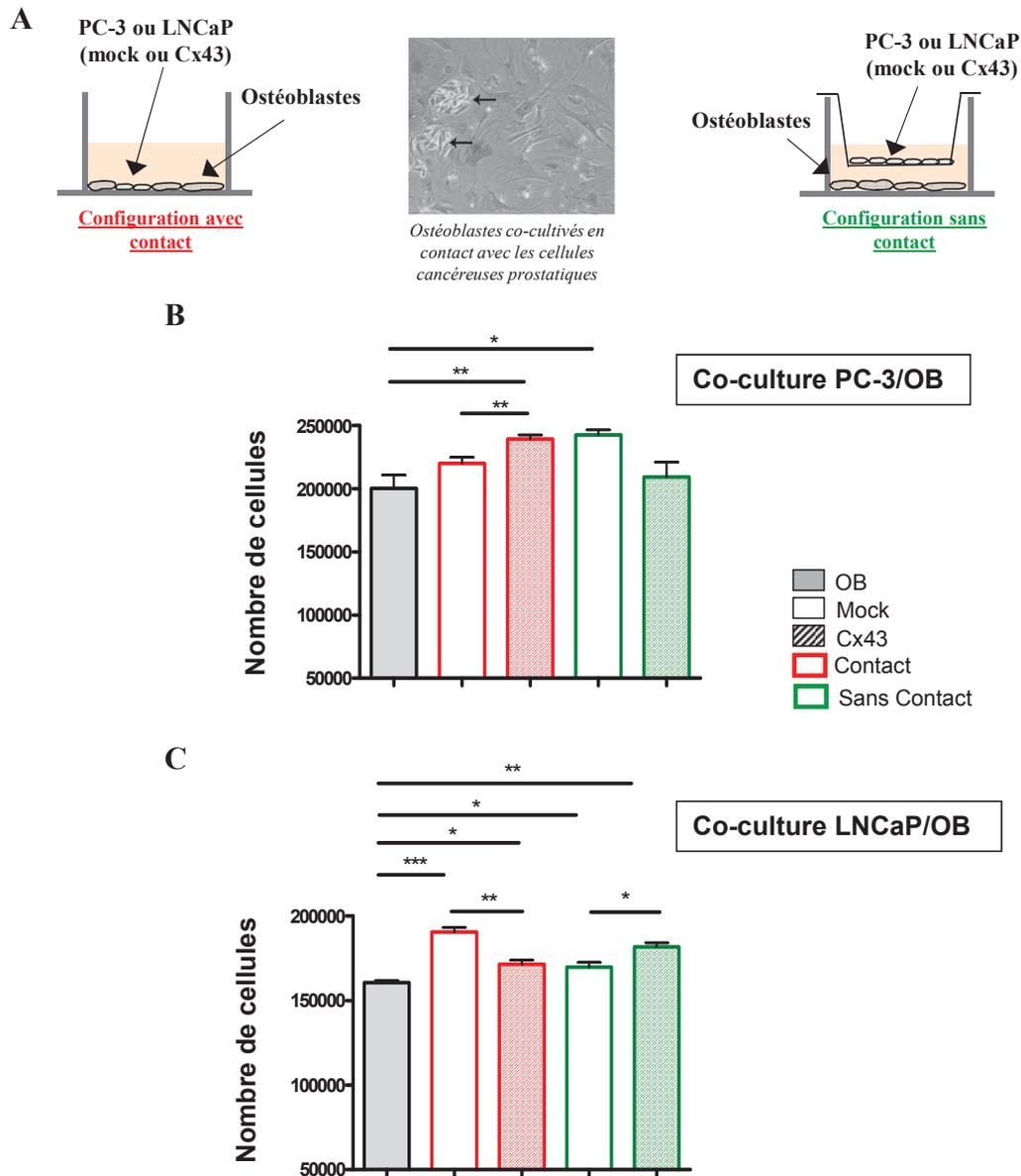
Des co-cultures avec ou sans contact ont été effectuées entre les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 et des ostéoblastes, cellules clés de la formation osseuse.

#### **1. Evaluation de la communication hétérocellulaire.**

La technique de précharge a permis d'évaluer si les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 établissaient une communication hétérocellulaire avec les ostéoblastes après 4 jours de différenciation. Dans ces conditions, les ostéoblastes sont les cellules receveuses et les cellules cancéreuses prostatiques sont les cellules donneuses préalablement chargées avec 10  $\mu$ M de Dil et 5  $\mu$ M de calcéine (Figure 50).

Tout d'abord, un contrôle a été effectué permettant de mettre en évidence une communication homocellulaire entre les ostéoblastes. En effet, il est possible de visualiser un transfert de la calcéine de l'ostéoblaste donneur aux ostéoblastes receveurs. Cette communication ostéoblastique a été préalablement caractérisée au sein du laboratoire (Geneau et al., 2010; Niger et al., 2008).

Concernant la communication hétérocellulaire, elle n'a été mise en évidence que lorsque les ostéoblastes sont en contact avec les cellules LNCaP Cx43. Pour les cellules PC-3 mock ou Cx43 ainsi que pour les cellules LNCaP mock, aucun transfert de la calcéine aux ostéoblastes n'a pu être observé. Donc, les cellules LNCaP Cx43 peuvent établir à la fois une communication homocellulaire (décrite précédemment) ainsi qu'une communication hétérocellulaire avec les ostéoblastes.



**Figure 51 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur la prolifération des ostéoblastes.**

**A)** Schéma représentant le modèle de co-culture avec les deux configurations : contact et sans contact entre les cellules cancéreuses prostatiques et les ostéoblastes. La photographie illustre la configuration avec contact et la flèche cible les cellules cancéreuses prostatiques entourées par les ostéoblastes. **B)** Histogramme représentant le nombre d'ostéoblastes mesuré par le test au bleu de méthylène après 4 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **C)** Histogramme représentant le nombre d'ostéoblastes, mesuré par le test au bleu de méthylène, après 4 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  en triplicat. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student  $t$  non apparié. \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  ; \*\*\* $P<0,001$ .

## **2. Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur la prolifération des ostéoblastes.**

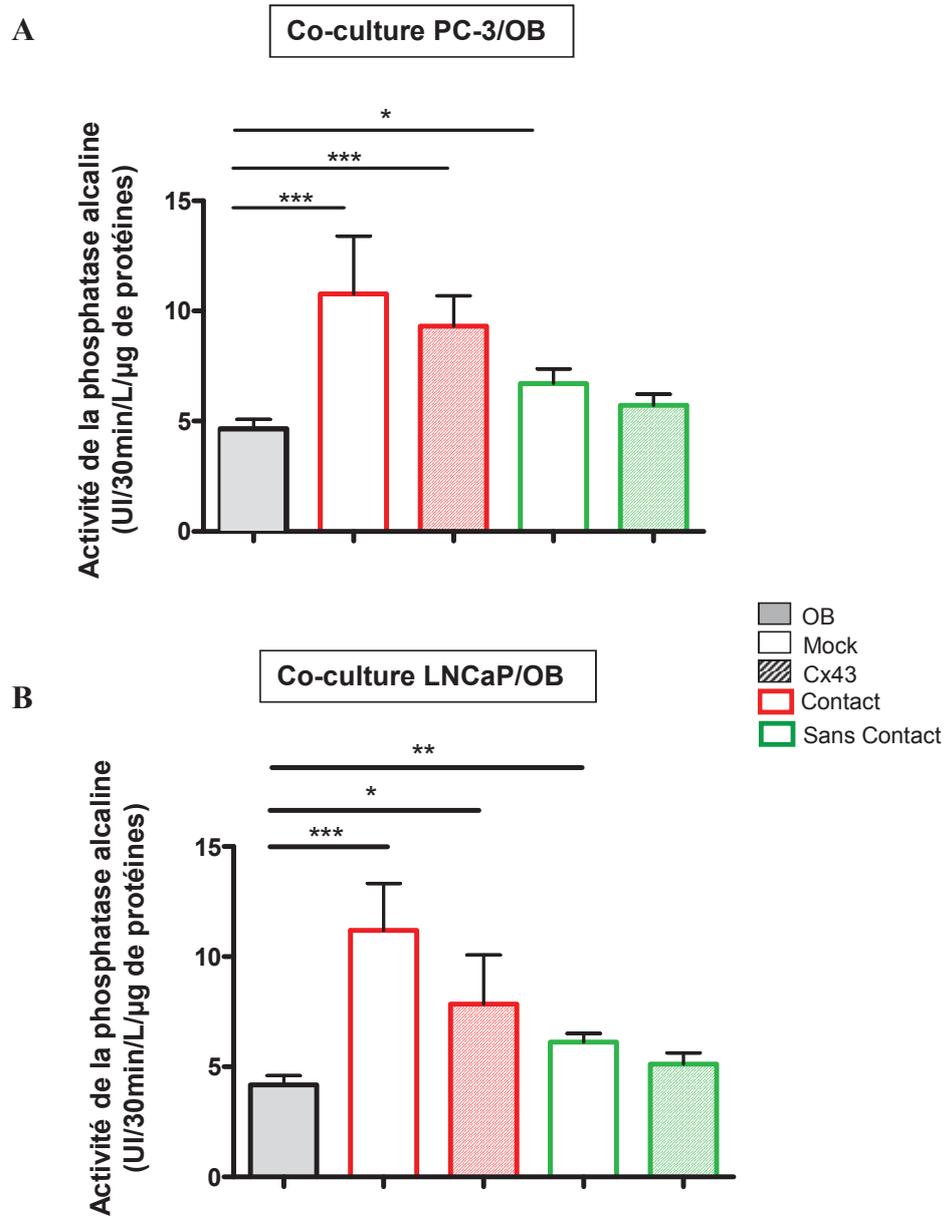
L'étude de la prolifération des ostéoblastes co-cultivés en contact ou non avec les cellules cancéreuses prostatiques a été effectuée après 4 jours de culture pour pouvoir se situer dans la phase exponentielle de croissance des ostéoblastes (Geneau et al., 2010).

De plus, pour éviter de prendre en compte le nombre de cellules cancéreuses prostatiques dans la configuration en contact, il a été nécessaire d'évaluer la proportion des ostéoblastes par rapport aux cellules totales. Le jour de l'ensemencement, le ratio était de 1/10 en faveur des ostéoblastes. Donc, pour chaque configuration en contact, les cellules ont été colorées à l'éosine/hématoxyline et un comptage des ostéoblastes et des cellules prostatiques a été effectué. Ainsi, il a été possible de définir un ratio permettant de déterminer la proportion des cellules cancéreuses prostatiques par rapport aux ostéoblastes après 4 jours de co-culture :

- Dans la condition PC-3 mock en contact avec les ostéoblastes : le rapport des cellules est de 1/5 caractérisé par une prolifération plus importante des cellules PC-3 mock.
- Dans les trois autres conditions (PC-3 Cx43/ostéoblastes, LNCaP mock/ostéoblastes, LNCaP Cx43/ostéoblastes) : le rapport reste inchangé.

La coloration au bleu de méthylène a permis par la suite d'évaluer le nombre d'ostéoblastes dans les différentes conditions de co-culture.

Pour la co-culture avec les cellules PC-3, une augmentation de la prolifération de 10% et de 18% a été observée respectivement pour les ostéoblastes co-cultivés en contact avec les cellules PC-3 mock et les cellules PC-3 Cx43 par rapport aux ostéoblastes cultivés seuls (Ostéoblastes seuls :  $2,004.10^5 \pm 1,03. 10^4$  cellules). L'impact des cellules PC-3 Cx43 en contact sur la prolifération des ostéoblastes est légèrement plus important par rapport aux cellules PC-3 mock avec une augmentation de 8%. Concernant la configuration sans contact pour la co-culture avec les cellules PC-3 mock, les ostéoblastes ont une augmentation de la prolifération de 21% par rapport aux ostéoblastes cultivés seuls. Ainsi, les cellules PC-3 accroissent la prolifération des ostéoblastes lorsqu'elles sont co-cultivées en contact avec un effet légèrement plus important pour les cellules PC-3 Cx43. Mais pour la configuration sans



**Figure 52 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'activité de la phosphatase alcaline (exprimée en UI/30min/L/µg de protéines) après 2 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'activité de la phosphatase alcaline (exprimée en UI/30min/L/µg de protéines) après 2 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4 en triplicat. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test de Student *t* pour des valeurs non appariées. \*P<0,05 ; \*\*P<0,01 ; \*\*\*P<0,001.

contact, seul les cellules PC-3 mock augmentent la prolifération des ostéoblastes (Figure 51B).

Concernant la co-culture avec les cellules LNCaP, la prolifération des ostéoblastes est augmentée quels que soient la configuration et le génotypage des cellules LNCaP par rapport à la condition où les ostéoblastes sont cultivés seuls (Ostéoblastes seuls :  $1,6.10^5 \pm 1,28.10^3$  cellules). Dans la configuration en contact, les cellules LNCaP mock augmentent de 10% la prolifération des ostéoblastes par rapport aux cellules LNCaP Cx43. A l'inverse, dans la configuration sans contact, les cellules LNCaP Cx43 ont un impact plus important avec une augmentation de 12% de la prolifération des ostéoblastes par rapport aux cellules LNCaP mock. Ainsi, la surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP influence la prolifération des ostéoblastes caractérisée notamment par une diminution de la prolifération lorsque les cellules sont en contact direct (Figure 51C).

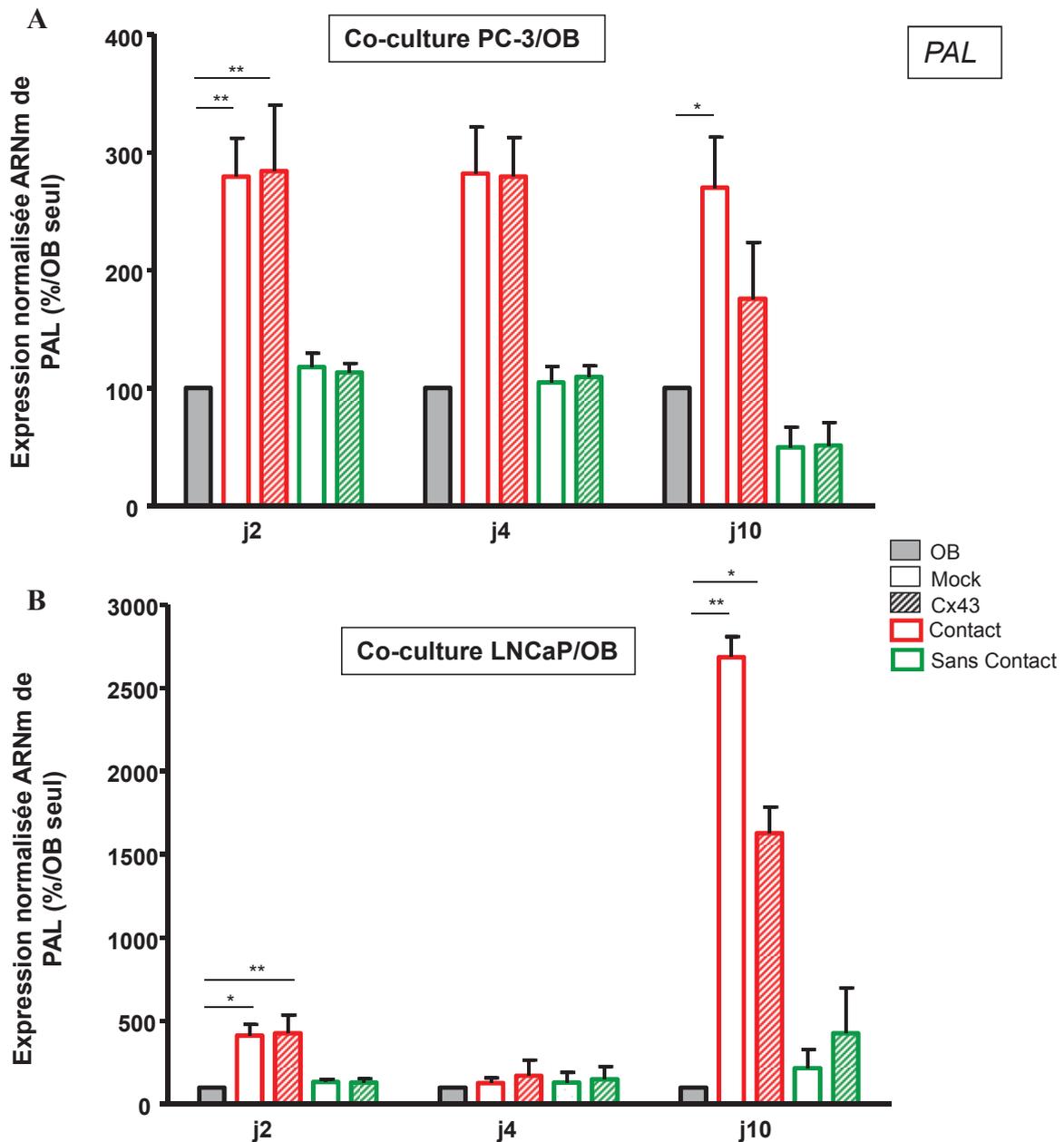
### **3. Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur la différenciation des ostéoblastes.**

#### ***3.1. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline.***

L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée dans les mêmes configurations de co-culture avec ou sans contact avec les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43. Etant un critère précoce de la différenciation ostéoblastique, l'activité de la phosphatase alcaline a été effectuée après 2 jours de co-culture.

Comme pour l'étude sur la prolifération des ostéoblastes, il a été nécessaire de s'affranchir des cellules cancéreuses prostatiques dans la condition en contact. D'une part, aucune activité de la phosphatase alcaline n'a été observée dans les cellules cancéreuses prostatiques. De plus, une évaluation de la quantité protéique des cellules cancéreuses prostatiques (cultivées seules) a permis de soustraire cette valeur de la quantité protéique totale obtenue dans la configuration en contact.

Tout d'abord, les cellules PC-3 mock et les cellules PC-3 Cx43 augmentent l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes respectivement de 133% et de 98% lorsque les cellules sont co-cultivées en contact par rapport aux ostéoblastes cultivés seuls (activité phosphatase alcaline :  $4,668 \pm 0,419$  UI/30min/L/ $\mu$ g de protéines). De plus, une augmentation



**Figure 53 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline (PAL) dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de la phosphatase alcaline mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de la phosphatase alcaline par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$ .

de 38% de l'activité de la phosphatase alcaline a pu également être observée dans la configuration sans contact seulement lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés avec les cellules PC-3 mock. L'impact des cellules PC-3 mock ou Cx43 sur l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes est plus important dans la configuration en contact (Figure 52A).

Puis, le même profil a été également observé lors de la co-culture avec les cellules LNCaP. En effet, dans la configuration en contact, les cellules LNCaP mock ou Cx43 accroissent l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes respectivement de 167% et de 86% par rapport aux ostéoblastes cultivés seuls (activité phosphatase alcaline :  $4,183 \pm 0,420$  UI/30min/L/ $\mu$ g de protéines). Une augmentation de 46% a été observée dans la configuration sans contact seulement pour la co-culture des ostéoblastes avec les cellules LNCaP mock. Comme pour les cellules PC-3, l'impact sur l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes est plus important dans la configuration en contact (Figure 52B).

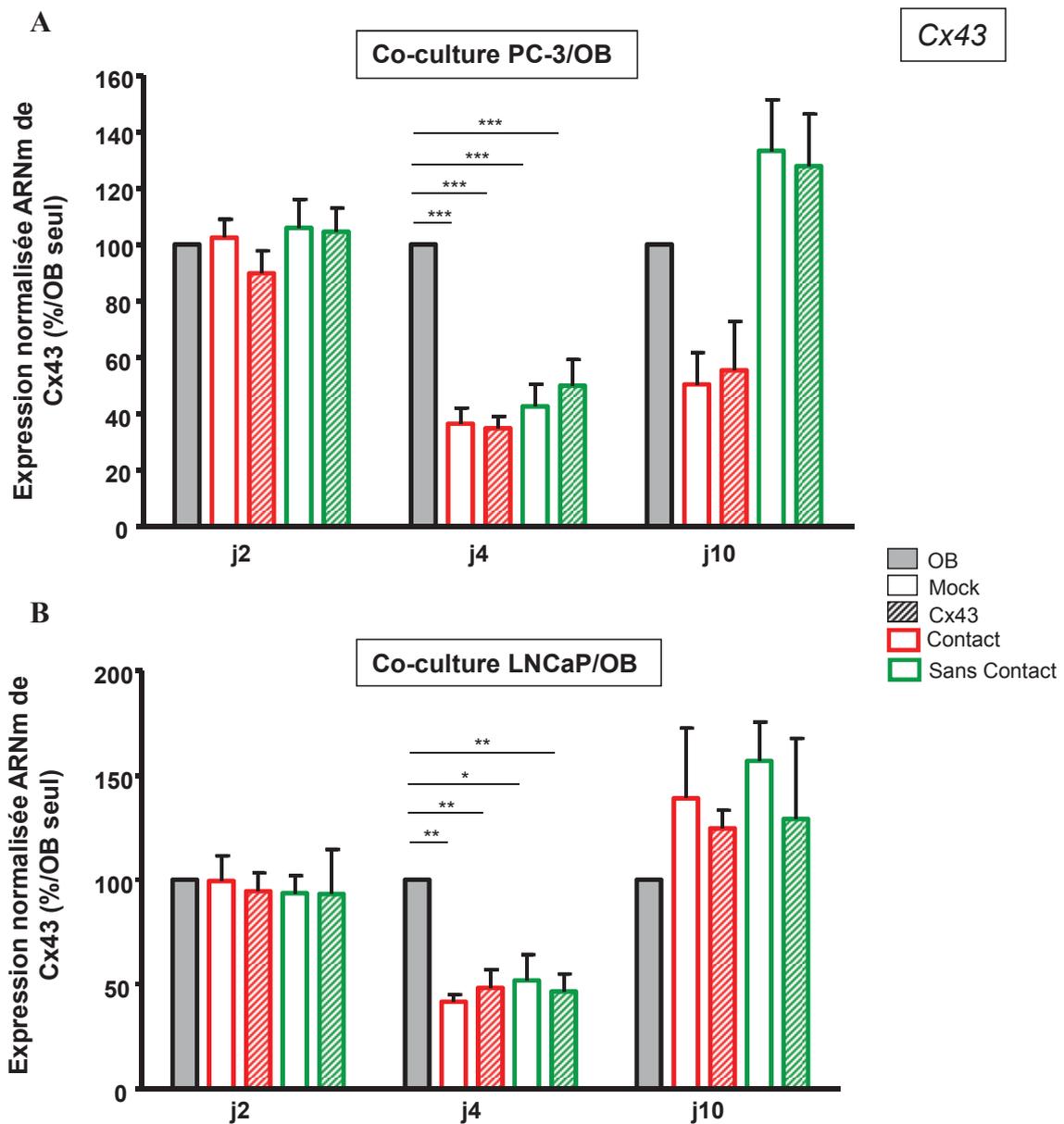
Néanmoins, aucune différence significative n'a pu être observée entre la co-culture avec les cellules mock et les cellules Cx43 dans la configuration en contact, aussi bien pour les cellules PC-3 que pour les cellules LNCaP.

### ***3.2. Effet sur l'expression génique de marqueurs de différenciation ostéoblastique.***

Cette étude a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment correspondant aux co-cultures avec ou sans contact entre les ostéoblastes et les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43. De plus, l'analyse a été faite sur trois temps, à 2 jours (J2), 4 jours (J4) et 10 jours (J10) de différenciation pour observer l'évolution des marqueurs de différenciation.

Pour s'affranchir des cellules cancéreuses prostatiques dans la configuration en contact, l'utilisation d'amorces spécifiques murines permet de cibler les ADNc murins des ostéoblastes. Enfin, sept marqueurs ont été étudiés : la phosphatase alcaline (PAL), la Cx43, le Cbfa1, l'ostéocalcine (OCN), l'ostéopontine (OPN), le RANKL et l'ostéoprotégérine (OPG). Les valeurs ont été normalisées par rapport à la condition où les ostéoblastes sont cultivés seuls.

Concernant la phosphatase alcaline, il est intéressant de noter que son évolution à J2 suit le même profil observé lors de la mesure de son activité. En effet, le taux d'expression de



**Figure 54 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de la Cx43 dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de la Cx43 mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de la Cx43 par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  ; \*\*\*  $P<0,001$ .

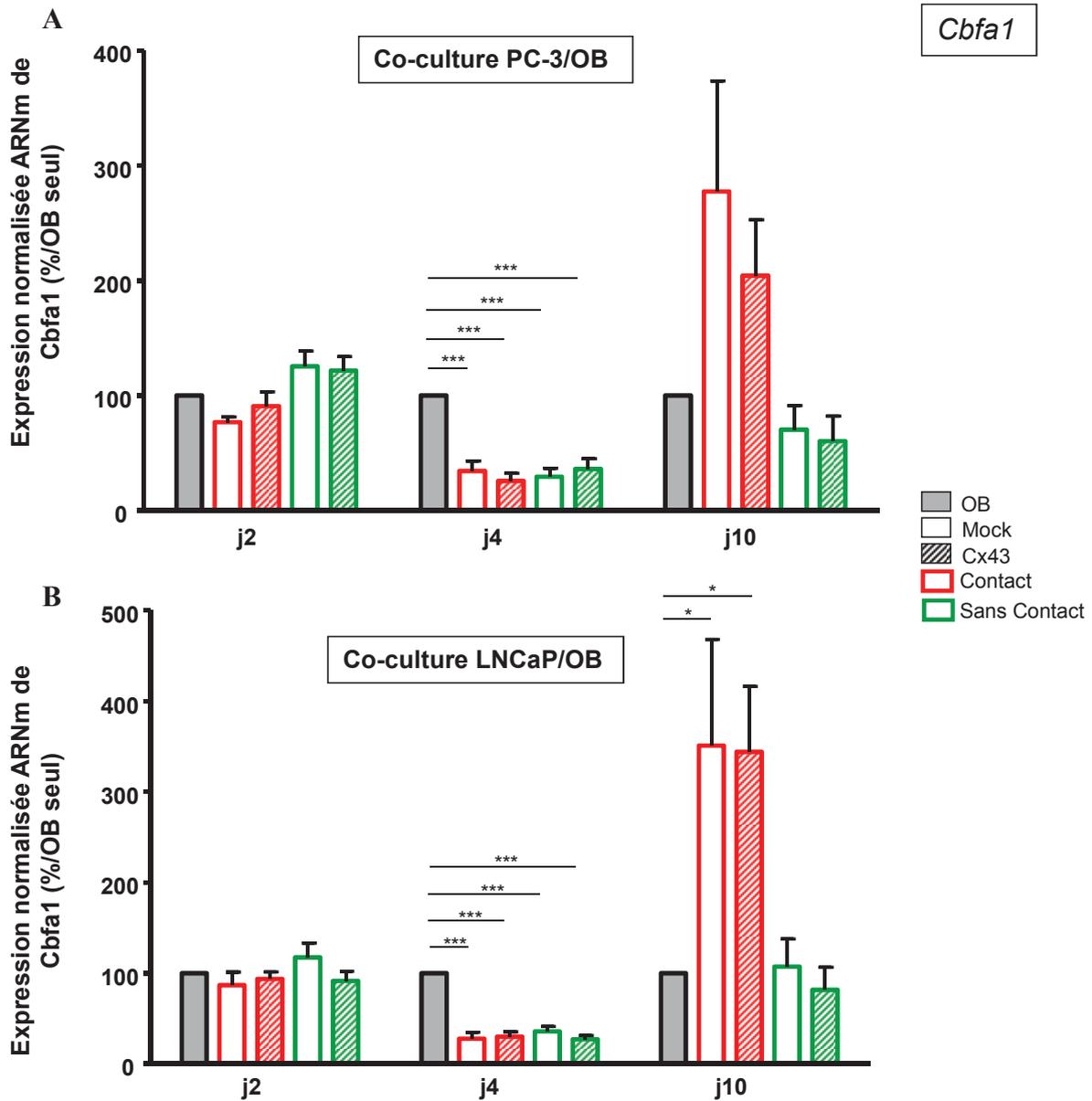
son ARNm est fortement augmenté lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés en contact avec les cellules cancéreuses prostatiques mock ou Cx43. Pour la co-culture avec les cellules PC-3, une augmentation de 280% est observée pour les cellules PC-3 mock et également pour les cellules PC-3 Cx43 (Figure 53A). Mais l'impact des cellules LNCaP est plus important car le taux d'ARNm de la phosphatase alcaline dans les ostéoblastes est augmenté de 415% aussi bien en contact avec les cellules LNCaP mock et les cellules LNCaP Cx43 (Figure 53B).

Durant la différenciation des ostéoblastes, les cellules PC-3 mock et Cx43 augmentent de 2,8 fois l'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline des ostéoblastes lorsqu'ils sont co-cultivés en contact, et ce pour J4 et J10. Les cellules LNCaP n'ont pas d'impact sur l'expression de la phosphatase alcaline à J4, mais à J10 elles stimulent de nouveau cette expression en contact mais de manière plus importante qu'à J2. En effet, une augmentation de 27 fois et de 17 fois a été observée respectivement pour les cellules LNCaP mock et les cellules LNCaP Cx43.

Donc les cellules cancéreuses prostatiques augmentent l'expression en ARNm de la phosphatase alcaline des ostéoblastes seulement lorsque les cellules sont co-cultivées en contact, à part à J4 pour les cellules LNCaP.

La Cx43 impliquée dans la différenciation des ostéoblastes a été également étudiée. En effet, son expression en co-culture varie significativement après 4 jours de co-culture aussi bien avec les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (Figure 54A et B). A J2, son expression n'est pas modifiée mais à J4 une diminution de 40% et de 46% est observée respectivement pour les co-cultures avec les cellules PC-3 et les cellules LNCaP. Cette diminution est observée pour les deux configurations testées : avec ou sans contact entre les cellules. Puis après 10 jours de différenciation, l'expression de la Cx43 est augmentée pour revenir à des niveaux comparables à ceux obtenus avec les ostéoblastes cultivés seuls. Mais, cette augmentation reste plus faible pour les ostéoblastes co-cultivés en contact avec les cellules PC-3.

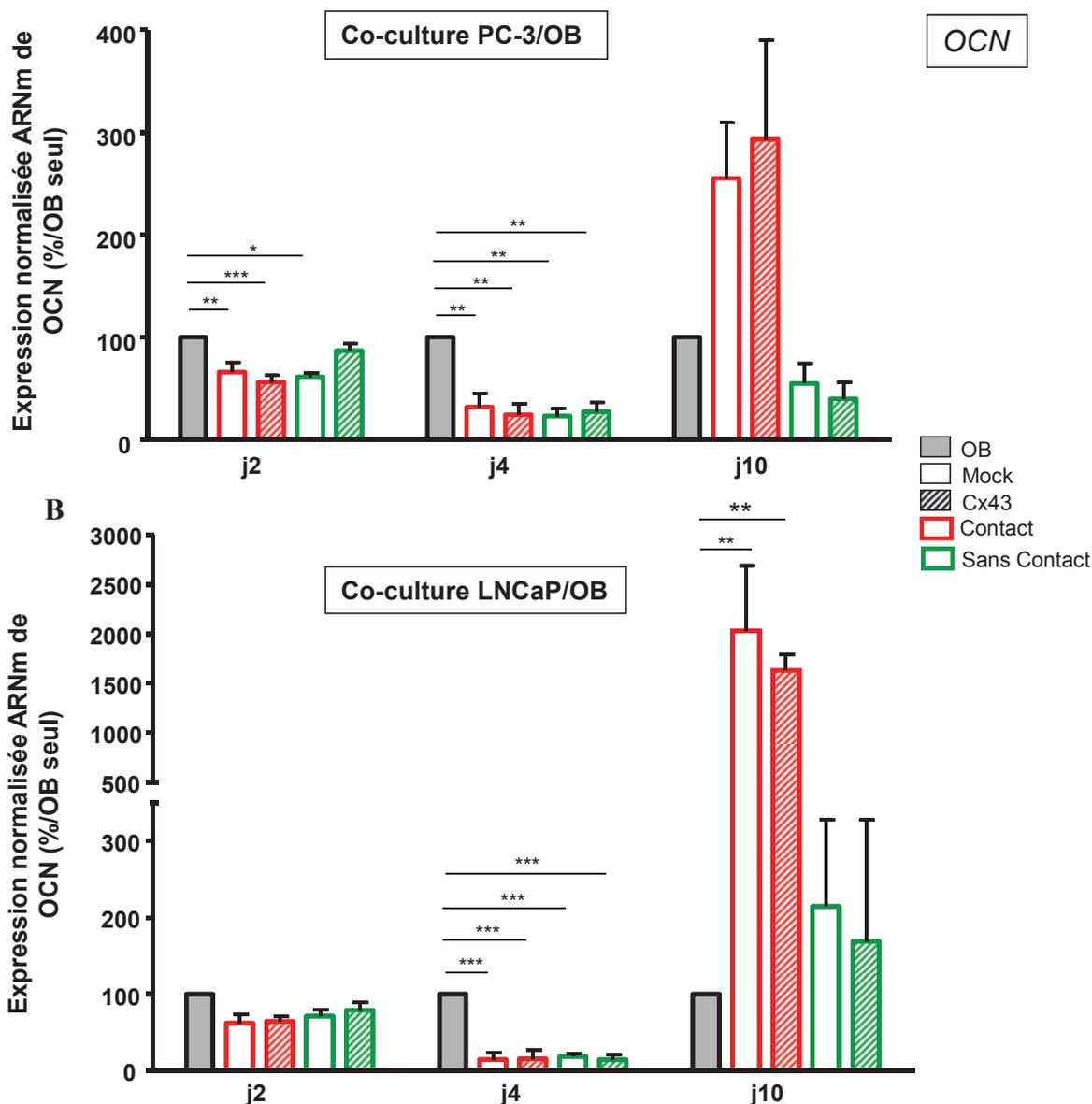
Trois marqueurs suivent le même type de profil d'expression lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés avec les cellules cancéreuses prostatiques : il s'agit de l'ostéocalcine, l'ostéopontine et du Cbfa1. En effet, à J2 les cellules cancéreuses prostatiques ne modifient pas l'expression de ces facteurs quelle que soit la configuration étudiée sauf pour les cellules PC-3 dans la configuration en contact qui diminuent (de 20% à 40%) l'expression de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine (Figure 55, 56 et 57).



**Figure 55 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de Cbfa1 dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de Cbfa1 mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de Cbfa1 par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

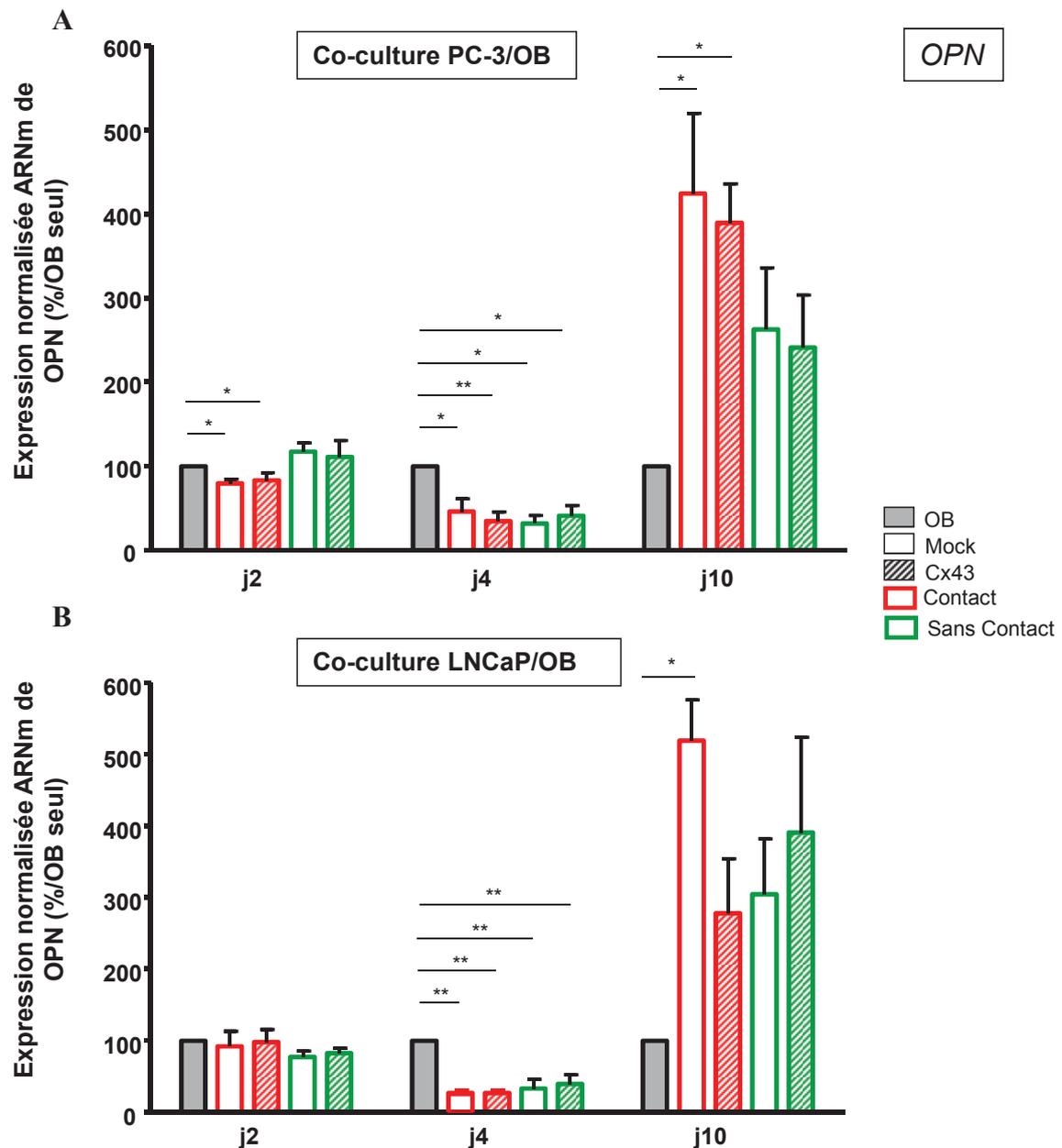
Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4 pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*P<0,05; \*\*\* P<0,001.



**Figure 56 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de l'ostéocalcine (OCN) dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéocalcine mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéocalcine par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  ; \*\*\*  $P<0,001$ .



**Figure 57 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de l'ostéopontine (OPN) dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéopontine mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéopontine par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

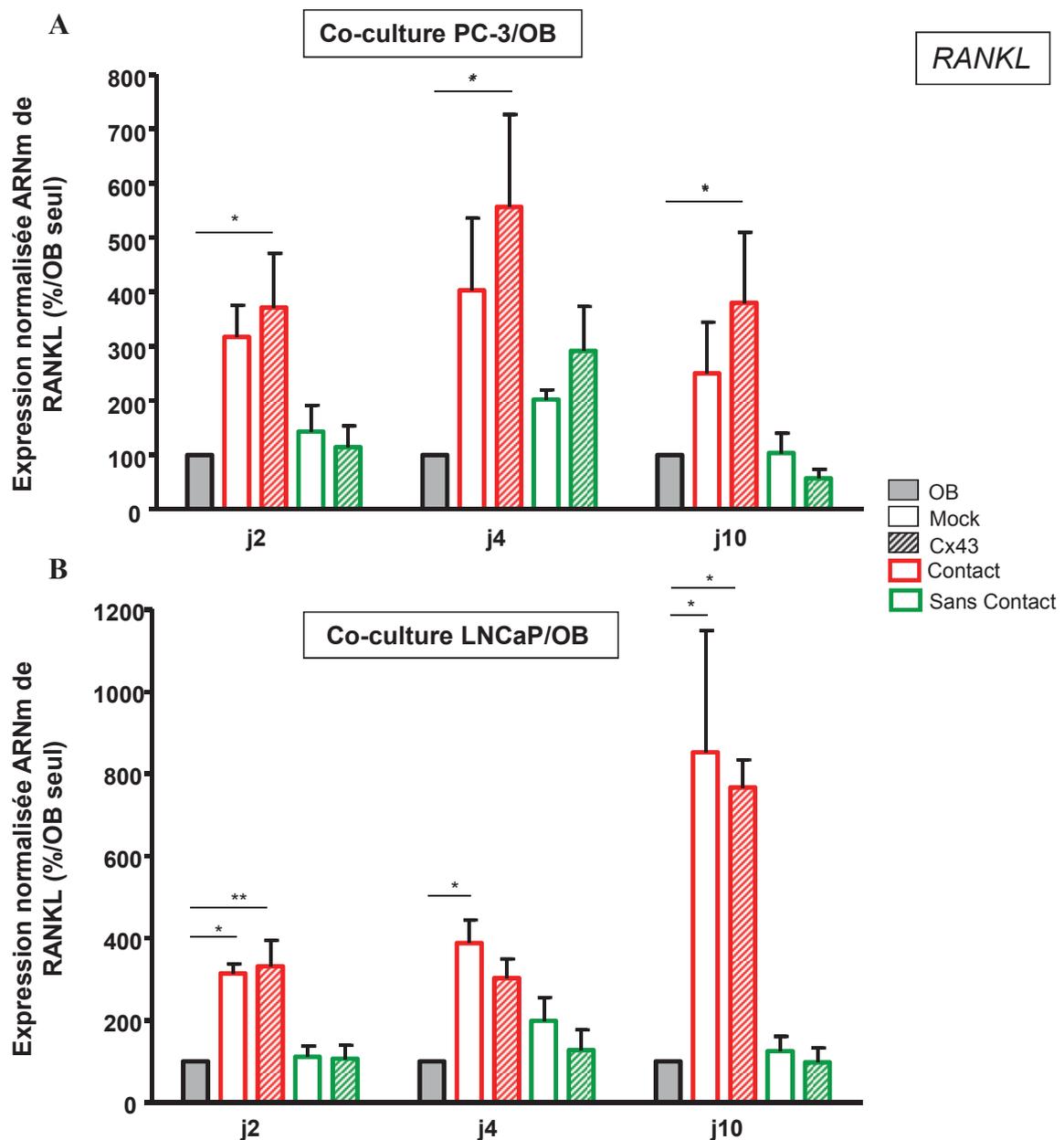
Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$ .

A J4, il y a toujours un effet marqué de diminution des critères de différenciation quels que soient la configuration et le niveau d'expression de la Cx43. En effet, pour Cbfa1 une diminution de 70% et de 75% est observée respectivement pour la co-culture avec les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (Figure 55). Concernant l'ostéocalcine, une diminution de 75% et de 85% est observée respectivement pour les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (Figure 56). Enfin, pour l'ostéopontine une diminution de 65% et de 70% est observée respectivement pour la co-culture avec les cellules PC-3 et les cellules LNCaP (Figure 57). Donc au quatrième jour de co-culture, les cellules cancéreuses altèrent fortement la capacité de différenciation des ostéoblastes.

Puis à J10, une augmentation de l'expression des critères a été observée uniquement en contact avec un impact significatif pour la co-culture avec les cellules LNCaP mais non significatif pour la co-culture avec les cellules PC-3. En effet pour Cbfa1, une augmentation significative de 348% est observée lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés en contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43 (Figure 55B). Concernant l'ostéocalcine, une augmentation importante de 18 fois est observée pour la co-culture en contact avec les cellules LNCaP (Figure 56B). Enfin, une augmentation d'expression de l'ostéopontine de 400% et de 520% est observée respectivement pour les ostéoblastes co-cultivés en contact avec les cellules PC-3 et les cellules LNCaP mock (Figure 57). Ainsi, l'augmentation d'expression de ces trois facteurs à 10 jours de différenciation est plus importante lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés en contact avec les cellules LNCaP sans effet du niveau d'expression de la Cx43.

Ainsi, les cellules cancéreuses prostatiques semblent diminuer les critères de différenciation avec un effet précoce pour l'ostéopontine, l'ostéocalcine et Cbfa-1 à quatre jours de co-culture. Néanmoins, le niveau de la Cx43 ne semble pas modifier cette capacité de diminution de la différenciation.

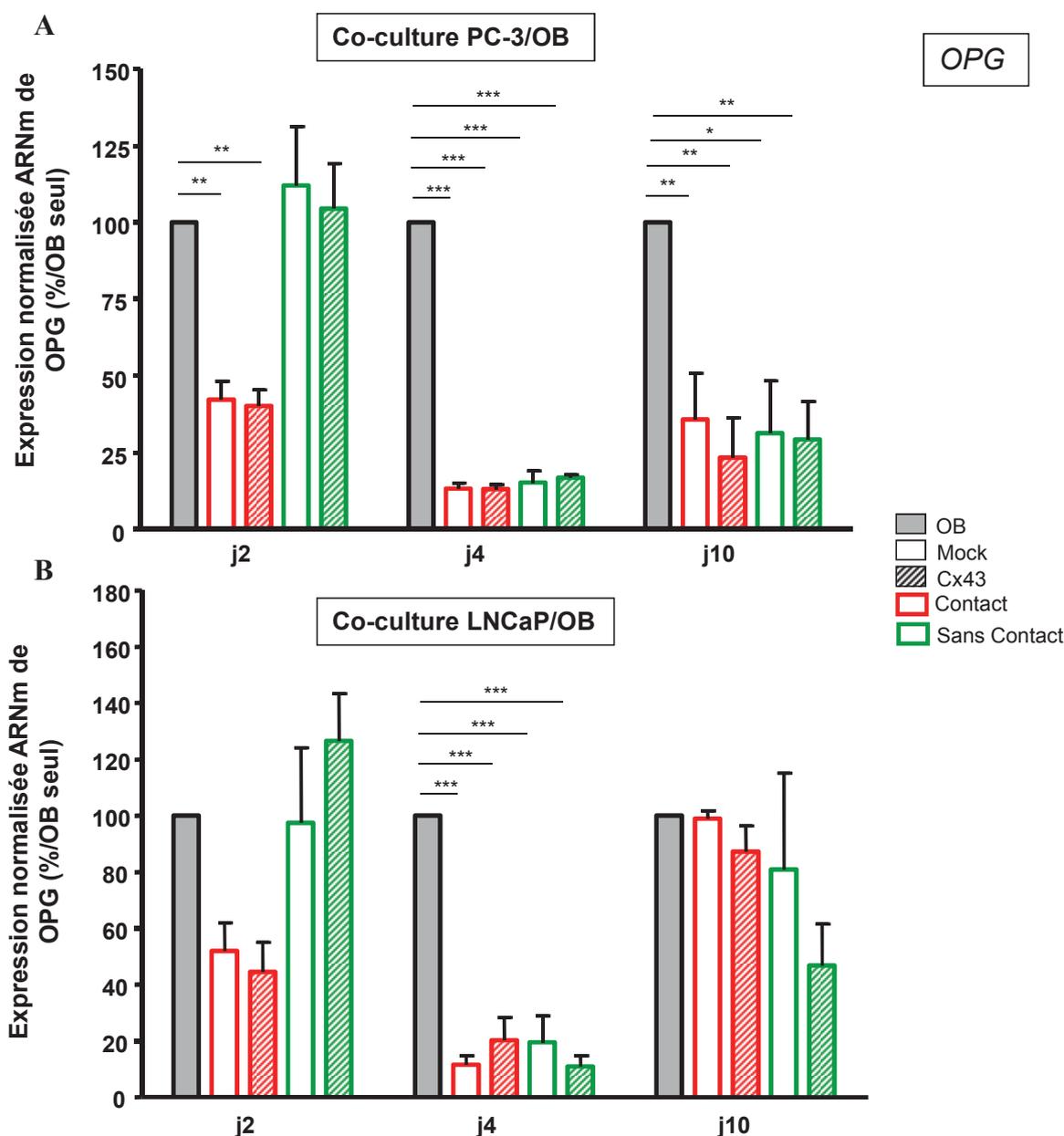
Etant donné les résultats obtenus *in vivo* suite aux injections intra-tibiales démontrant des tumeurs ostéolytiques, il semblait important d'étudier deux facteurs exprimés par les ostéoblastes impliqués dans l'activation des ostéoclastes : le RANKL (activateur) et l'ostéoprotégérine (inhibiteur). Concernant le RANKL, son expression est augmentée lorsque les ostéoblastes sont co-cultivés en contact avec les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43, à tous les temps étudiés (Figure 58). Pour la co-culture avec les cellules PC-3, l'augmentation en contact est statistiquement significative pour les cellules PC-



**Figure 58 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de RANKL dans les ostéoblastes.**

A) Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de RANKL mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. B) Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de RANKL par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4 pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*P<0,05 ; \*\*P<0,01.



**Figure 59 : Impact des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 sur l'expression de l'ARNm de l'ostéoprotégérine (OPG) dans les ostéoblastes.**

**A)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéoprotégérine mesurée par RT-qPCR par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules PC-3 mock ou Cx43. **B)** Histogramme représentant l'expression normalisée de l'ARNm de l'ostéoprotégérine par rapport à la condition contrôle (ostéoblastes cultivés seuls) après 2, 4, et 10 jours de co-culture avec ou sans contact avec les cellules LNCaP mock ou Cx43.

Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=4 pour chaque condition. Les barres grises correspondent à la configuration où les ostéoblastes sont seuls, les barres rouges à la configuration avec contact et les barres vertes à la configuration sans contact. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*P<0,05 ; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

3 Cx43 (augmentation de 370% à J2, 557% à J4 et 380% à J10 ; Figure 58A). Pour la co-culture avec les cellules LNCaP, l'augmentation d'expression de RANKL est observée à la fois pour les ostéoblastes co-cultivés avec les cellules LNCaP mock et les cellules LNCaP Cx43. En effet à J2, une augmentation de 315% est observée, alors qu'à J10 elle correspond à 852% pour la co-culture avec les cellules LNCaP mock et de 766% avec les cellules LNCaP Cx43. Mais à J4, l'augmentation d'expression de RANKL n'est significative que pour la co-culture avec les cellules LNCaP mock correspondant à un accroissement de 387,5% (Figure 58B).

Enfin, l'augmentation d'expression de RANKL est plus importante pour la co-culture avec les cellules LNCaP que pour les cellules PC-3 à J10.

A l'inverse, les co-cultures avec les cellules cancéreuses prostatiques ont un effet inhibiteur sur l'expression de l'ostéoprotégérine. Cet effet est significatif quels que soient le temps étudié pour les cellules PC-3 et seulement au 4<sup>ème</sup> jour de co-culture pour les cellules LNCaP (diminution de 75%) (Figure 59). Mais à J2, une diminution significative de 60% est observée seulement dans la configuration en contact avec les cellules PC-3 alors qu'à J10, une diminution de 65% environ est mise en évidence dans les deux configurations étudiées (Figure 59A).

Enfin, un calcul du ratio RANKL/OPG a permis d'observer que ce rapport était principalement modifié dans la configuration en contact. En effet, pour la co-culture avec les cellules PC-3, le rapport est augmenté respectivement de 10, 20 et de 8 fois après 2 jours, 4 jours et 10 jours de différenciation. Il n'y a que pour le 4<sup>ème</sup> jour où le ratio est augmenté de 10 fois dans la configuration sans contact. Concernant la co-culture avec les cellules LNCaP, le rapport RANKL/OPG suit le même type de variation. En effet, le rapport est augmenté dans la configuration en contact de 10, 20 et de 25 fois après 2 jours, 4 jours et 10 jours de différenciation. De plus, après 4 jours de différenciation, ce ratio est aussi augmenté de 10 fois dans la configuration sans contact.

Ainsi, les cellules cancéreuses prostatiques augmentent l'expression de RANKL des ostéoblastes principalement lorsque les cellules sont co-cultivées en contact. Parallèlement, elles diminuent l'expression de l'ostéoprotégérine.

En résumé, les co-cultures des cellules cancéreuses prostatiques avec les ostéoblastes ont permis d'observer d'une part qu'elles influencent la différenciation ostéoblastique sans effet majeur du niveau d'expression de la Cx43 dans les lignées cancéreuses (Tableau 11). En effet, une diminution d'expression des marqueurs de différenciation tels que la Cx43,

	J2		J4		J10	
	<i>Contact</i>	<i>Sans contact</i>	<i>Contact</i>	<i>Sans contact</i>	<i>Contact</i>	<i>Sans contact</i>
<b>PAL</b>						
<b>Cx43</b>						
<b>OCN</b>						
<b>OPN</b>						
<b>Cbfa1</b>						
<b>RANKL</b>						
<b>OPG</b>						

 Effet des cellules PC-3  
 Effet des cellules LNCaP

**Tableau 11 : Récapitulatif des résultats obtenus en co-culture sur l'expression de marqueurs de différenciation des ostéoblastes.**

Une diminution des marqueurs de différenciation à J4 et une augmentation d'expression de RANKL sont observées par rapport aux ostéoblastes cultivés seuls. La surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP ne modifient pas leur impact sur la différenciation ostéoblastique.

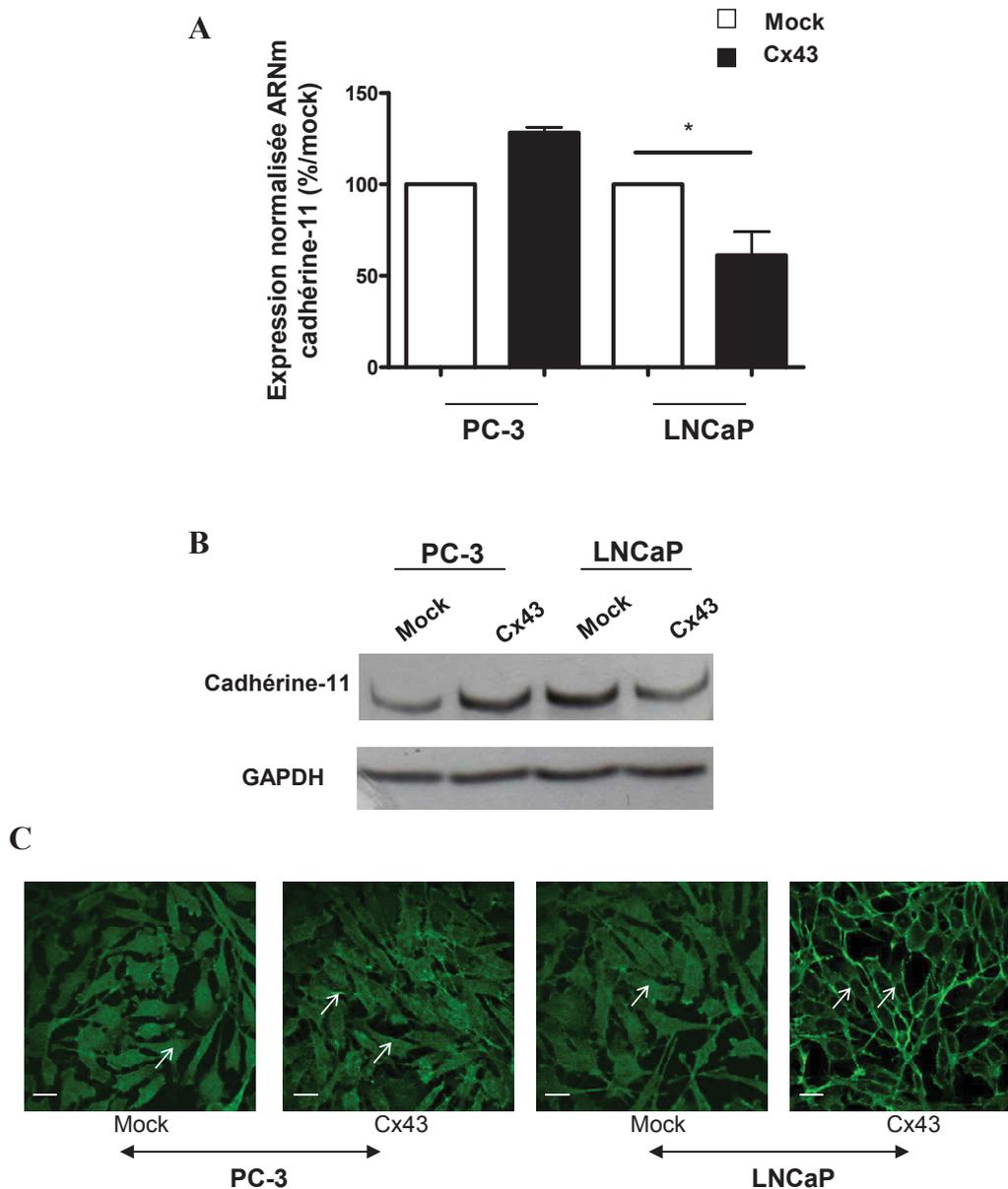
l'ostéocalcine, l'ostéopontine, Cbfa1 est très importante au quatrième jour de différenciation dans les deux configurations étudiées. Pour certains de ces facteurs, leur expression est augmentée principalement dans la configuration en contact au 10<sup>ème</sup> jour de différenciation. L'expression de la phosphatase alcaline, quant à elle, est augmentée uniquement dans la configuration en contact. Enfin, l'expression des facteurs impliqués dans le contrôle de l'activation des ostéoclastes, RANKL et OPG, est également influencée par les co-cultures avec les cellules cancéreuses. En effet, l'expression de RANKL est augmentée seulement dans la configuration en contact pour tous les temps étudiés alors que l'expression de l'ostéoprotégérine est diminuée principalement au 4<sup>ème</sup> jour de différenciation pour la co-culture avec les cellules LNCaP et à tous les temps pour la co-culture avec les cellules PC-3.

Donc, la co-culture avec des cellules cancéreuses prostatiques ralentit les capacités de différenciation quelle que soit la configuration étudiée. De plus, elle semble activer les processus résorbant uniquement en cas de contact direct entre les cellules cancéreuses prostatiques et les ostéoblastes.

#### **IV. Etude préliminaire de l'expression de la cadhérine-11 dans les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43.**

La cadhérine-11, fortement exprimée dans les ostéoblastes, participent aux métastases osseuses des cellules tumorales mammaires et prostatiques. Pour les cellules tumorales mammaires, la diminution de la Cx43 entraîne également une diminution d'expression de la cadhérine-11 et de leur potentiel métastatique (Chu et al., 2008; Li et al., 2008a). De plus, nous avons démontré que l'impact des cellules cancéreuses prostatiques sur la différenciation des ostéoblastes en co-culture avait un effet plus important dans la configuration en contact. Ainsi, il semble intéressant d'étudier l'expression de la cadhérine-11 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP sur exprimant ou non la Cx43.

La cadhérine-11 a été étudiée par RT-qPCR pour évaluer le niveau d'expression de l'ARN messager et par western blot pour évaluer le niveau d'expression protéique. Ainsi, l'expression de la cadhérine-11 semble être augmentée dans les cellules PC-3 Cx43 par rapport aux cellules PC-3 mock. En effet, par western blot, la bande obtenue à 110 kDa correspondant à la cadhérine-11 est plus intense pour les cellules PC-3 Cx43 (Figure 60B). Néanmoins, la variation du niveau d'expression de l'ARNm observée pour les cellules PC-3



**Figure 60 : Evaluation de l'expression et de la localisation de la cadhérine-11 dans les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 .**

**A)** Niveau d'expression de l'ARNm de la cadhérine-11. Les histogrammes représentent les valeurs relatives normalisées à 100% par rapport aux cellules mock. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  SEM, n=3. Les barres blanches correspondent aux cellules mock et les barres noires aux cellules Cx43. L'analyse statistique est effectuée par un test Anova à une entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*P<0,05. **B)** Exemple de western blot de la cadhérine-11 obtenu pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43. **C)** Immunolocalisation de la cadhérine-11 dans les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock et Cx43. Les flèches blanches permettent de cibler l'immunomarquage de la cadhérine-11 principalement dans le cytoplasme pour les cellules PC-3 mock et Cx43 et les cellules LNCaP mock. Le marquage pour les cellules LNCaP Cx43 est très nettement localisé à la membrane plasmique.

Barre d'échelle: 100  $\mu$ m.

Cx43 n'est pas significative. Concernant les cellules LNCaP, l'effet inverse est observé. Une diminution de 39% d'expression de l'ARNm de la cadhérine-11 et de la protéine est observée pour les cellules LNCaP Cx43 (Figure 60A et B).

De manière intéressante, l'immunolocalisation de la cadhérine-11 permet de montrer que le marquage de la protéine semble être principalement cytoplasmique pour les cellules PC-3 mock et Cx43 ainsi que pour les cellules LNCaP mock. Pour les cellules LNCaP Cx43, le marquage est nettement plus intense à la membrane plasmique qu'elles soient ou non en contact avec les cellules adjacentes (Figure 60C).

Donc pour les cellules LNCaP Cx43, une diminution d'expression de la cadhérine-11 est observée mais son immunomarquage semble être plus intense à la membrane plasmique.

*Discussion*

## Discussion.

La surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques ayant des caractéristiques métastatiques différentes a permis tout d'abord d'étudier l'impact de cette connexine sur le potentiel métastatique de ces cellules. Ainsi, il a été nécessaire de vérifier que la surexpression de la Cx43 n'entraînait pas la modification d'expression des autres connexines connues pour être exprimées dans la prostate telle que la Cx26, la Cx32 et la Cx45. Dans nos conditions expérimentales, aucune variation d'expression n'a été mise en évidence, permettant de conclure que les effets observés par la suite sont dus aux seules variations de la Cx43.

Les résultats obtenus *in vitro* ont montré un impact différent de la surexpression de la Cx43 sur les cellules PC-3 et les cellules LNCaP. En effet, la Cx43 est localisée à la membrane et est fonctionnelle pour les cellules LNCaP Cx43 alors que pour les cellules PC-3, elle est restreinte au cytoplasme et ne permet pas d'établir de communication intercellulaire. Lors d'études antérieures, les équipes de Wang et de Govindarajan ont également surexprimé la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP. Ils ont observé des résultats similaires où la Cx43 était localisée dans le cytoplasme pour les cellules PC-3 alors que pour les cellules LNCaP, elle était membranaire et fonctionnelle (Govindarajan et al., 2002; Wang et al., 2007a). Ainsi, la comparaison de nos résultats avec ces deux études précédentes a permis de valider notre modèle d'étude. Mais dans nos conditions, les niveaux de surexpression de la Cx43 diffèrent puisque l'augmentation est plus faible (environ de trois fois) restant à des niveaux physiologiques. Le niveau d'expression des transcrits de la Cx43 dans une lignée de cellules épithéliales normales immortalisées (RWPE) a été vérifié. Les niveaux d'ARNm sont effectivement comparables à ceux des cellules PC-3 et LNCaP Cx43 (ARNm de Cx43 en % de GAPDH : PC-3 Cx43 : 68% ; LNCaP Cx43 : 45% ; RWPE : 55,2%).

L'impact de la Cx43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques entraîne une diminution de la prolifération des cellules PC-3 sans modification de l'apoptose. A l'inverse pour les cellules LNCaP, la Cx43 membranaire n'a aucun effet sur la prolifération de ces cellules. Fukushima et al. avait également mis en évidence un ralentissement de la prolifération des cellules PC-3 suite à la surexpression de la Cx43 (Fukushima et al., 2007). Dans des conditions comparables, il a été montré que la transfection de la Cx43 mutée au

niveau de la seconde boucle extracellulaire aboutissait à une localisation cytoplasmique de cette dernière accompagnée d'une diminution de la croissance des cellules tumorales du col de l'utérus et des cellules tumorales de la vessie (Krutovskikh et al., 2000; Olbina and Eckhart, 2003). D'autres études portant sur des cellules de gliomes T98G ont également montré que la Cx43 localisée dans le cytoplasme aboutissait à une diminution de la prolifération cellulaire (Huang et al., 1998b). Enfin, la surexpression de la Cx43 dans des cellules tumorales mammaires peut également entraîner une diminution de la prolifération indépendante du couplage intercellulaire tout comme pour les cellules PC-3 qui n'établissent pas de communication intercellulaire (Qin et al., 2002). Il reste à savoir comment la Cx43 cytoplasmique peut influencer la prolifération des cellules PC-3. Certaines études suggèrent une action directe de la Cx43 sur l'expression de gènes grâce à son domaine C-terminal. En effet, la surexpression du domaine C-terminal de la Cx43 entraîne une diminution de la prolifération des cellules Hela ou des cellules neuro2a, avec une localisation nucléaire de ce domaine (Dang et al., 2003; Moorby and Patel, 2001). Certains suggèrent que le domaine C-terminal de la Cx43 peut se scinder afin de migrer dans le noyau pour activer ou réprimer l'expression de gènes (Crespin et al., 2010). Enfin, Govindarajan et son équipe ont conclu que ce problème était peut être dû à un problème d'adressage de la Cx43 à la membrane. En effet, ils ont observé une localisation de la Cx43 dans des vésicules d'endocytose pour les cellules LNCaP alors que pour les cellules PC-3 aucune observation n'a été faite. Ils se sont intéressés également aux protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire telles que l' $\alpha$ -caténine. Ils ont observé, suite à la surexpression de l' $\alpha$ -caténine, une augmentation de l'expression de la Cx43 à la membrane plasmique pour les cellules PC-3 (Govindarajan et al., 2002).

Mais pour les cellules LNCaP, il a été montré que la surexpression de la Cx43 entraînait une diminution de la prolifération cellulaire (Govindarajan et al., 2002; Mehta et al., 1999). Dans ces deux études, la surexpression de la Cx43 a été effectuée à l'aide d'un ADNc de rat alors que dans notre étude la surexpression a été faite avec la séquence humaine de la Cx43. Par la suite, ils ont établi des clones pour obtenir une lignée homogène de cellules LNCaP Cx43. Etant donné qu'une tumeur est caractérisée par son hétérogénéité cellulaire, dans notre étude, la totalité des cellules transfectées ont été utilisées afin d'éviter d'avoir un lot homogène de cellules. Ayant une autre approche de la surexpression de la Cx43, il ne semble pas surprenant d'obtenir des résultats différents de ceux obtenus dans d'autres études.

Dans notre étude, la surexpression de la Cx43 ne semble pas modifier l'apoptose spontanée des cellules cancéreuses prostatiques. D'une manière intéressante, cette observation

a été mise en évidence par l'équipe de Wang pour les cellules LNCaP. Les auteurs ont également montré que la Cx43 membranaire augmentait la sensibilité au TNF $\alpha$  induisant l'apoptose des cellules (Wang et al., 2007a). Néanmoins, dans les cellules épithéliales normales prostatiques de rat, il semble que le niveau d'expression de la Cx43 soit sensible aux androgènes. En effet, les rats castrés ont une augmentation d'expression de la Cx43 associée à une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques. La ré-introduction d'androgènes permet de stimuler la prolifération des cellules épithéliales et de diminuer l'expression de la Cx43. Dans ce cas, la Cx43 favoriserait l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques (Huynh et al., 2001). A l'inverse, la Cx26, après transfection, induit l'apoptose des cellules PC-3 et des cellules LNCaP (Tanaka and Grossman, 2004). Dans un modèle de cancer du foie, la Cx43 membranaire semble protéger les cellules de l'apoptose favorisant la survie cellulaire médiée par le benzopyrène (Tekpli et al., 2010). A l'inverse, pour une autre lignée de cancer hépatique, la Cx43 membranaire favorise l'apoptose des cellules SK-Hep-1 (Liu et al., 2009). Ainsi, l'impact des connexines sur l'apoptose des cellules cancéreuses semble être dépendant du type cellulaire mais également de la connexine étudiée.

La suite de l'étude porte sur l'analyse des capacités d'adhérence et d'invasion des cellules cancéreuses prostatiques après surexpression de la Cx43. Ainsi, l'adhérence et l'invasion des cellules PC-3 Cx43 sont diminuées alors que pour les cellules LNCaP, la Cx43 accroît significativement ces capacités. L'augmentation de l'adhérence et de l'invasion des cellules LNCaP peut être liée à une augmentation du potentiel métastatique de ces cellules. En effet, lors des processus invasifs, les cellules cancéreuses doivent lyser la matrice extracellulaire et doivent également adhérer à la matrice extracellulaire pour générer une force de traction (Friedl and Wolf, 2008; Ilima and Friedl, 2009). De plus, l'adhérence de ces cellules est plus importante sur le collagène de type 1, matrice extracellulaire constitutive de l'os.

De la même façon, il a été montré que la surexpression de la Cx43 dans des cellules de gliomes C6 était capable d'accroître leur capacité d'adhérence et d'invasion. La Cx43 dans les cellules C6, tout comme dans les cellules LNCaP, est localisée à la membrane plasmique et est responsable d'une communication fonctionnelle (Bates et al., 2007; Lin et al., 2002). D'autres études au laboratoire ont mis en évidence que les cellules de gliomes U251 présentaient une diminution de l'invasion et de l'adhérence suite à l'utilisation d'une stratégie antisens contre la Cx43 (Strale et al., 2011). La surexpression de la Cx26 entraîne également l'augmentation de l'invasion de cellules de mélanomes BL6 et participe également à

l'invasion des cellules tumorales mammaires (Ito et al., 2000; Naoi et al., 2007). Ainsi pour ces modèles, les connexines et notamment la Cx43 participent à l'invasion et à l'adhérence des cellules tumorales. Cependant, pour d'autres types cellulaires tels que des cellules tumorales pulmonaires, la surexpression de la Cx43 engendre l'effet inverse caractérisé par la diminution de l'invasion des cellules associée à une diminution d'expression de la MMP-2 alors que la Cx43 est localisée à la membrane plasmique (Zhao et al., 2011). De même, la transfection de la Cx32 dans des cellules de gliomes n'augmente pas leurs capacités invasives (Fry et al., 2001). Concernant la localisation cytoplasmique des connexines, il s'avèrent que la Cx32 cytoplasmique dans cellules tumorales hépatiques HuH7 entraîne une augmentation des capacités d'adhérence et d'invasion de ces cellules (Omori et al., 2007). Tout comme l'apoptose et la prolifération cellulaire, l'impact des connexines dans l'invasion et l'adhérence des cellules diffère en fonction du modèle et du type de connexine étudiée.

Les études *in vitro* faites sur l'impact de la Cx43 sur la prolifération et l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques ont pu être complétées par l'analyse des protéines sécrétées ou sécrétome faite en collaboration avec l'équipe du Docteur Naus à l'Université de British Columbia à Vancouver. Le terme de sécrétome a été utilisé par Tjalsma en 2000 pour décrire toutes les protéines libérées par une cellule ou un tissu à travers les différents mécanismes de sécrétion (Tjalsma et al., 2000). Ainsi, il a été possible d'établir un comparatif des protéines sécrétées entre les cellules mock et les cellules Cx43. De plus, une sélection des protéines a été effectuée afin de se focaliser sur celles participant à la progression tumorale ou celles présentes dans l'environnement osseux. Ainsi, la surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP entraîne une modification plus importante du sécrétome. En effet, 31 protéines contre 14 pour les cellules PC-3 ont une variation d'expression suite à la surexpression de la Cx43.

Concernant les cellules PC-3 Cx43, une augmentation de sécrétion du facteur NOV a été observée. Il a été montré que la diminution d'expression de NOV par les cellules de mélanomes augmente leur capacité métastatique (Fukunaga-Kalabis et al., 2008). De plus, lorsque ce facteur est surexprimé dans des cellules de gliomes ou des cellules tumorales mammaires, la prolifération cellulaire est diminuée (Gupta et al., 2001; Sin et al., 2009). Ainsi, NOV diminue la prolifération cellulaire et la progression des cellules tumorales. Cette augmentation de la sécrétion de NOV permettrait d'expliquer en partie les résultats obtenus sur les cellules PC-3 Cx43 caractérisés par une diminution de la prolifération cellulaire et des capacités d'adhérence et d'invasion. Néanmoins, certaines protéines sécrétées impliquées

dans l'invasion ont une augmentation d'expression telles que la MMP-1 ou PLAU. La MMP1 est une protéine dégradant le collagène de type 1 alors que PLAU permet de dégrader la matrice extracellulaire. Les deux ont été retrouvés impliqués dans l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques (Henry et al., 2001; Lein et al., 1998; Yoneda et al., 2010). Ceci peut être expliqué par le fait que techniquement les cellules sont privées de SVF pendant 24h avant le prélèvement du surnageant de culture. L'absence de sérum dans le milieu de culture 24h avant la récupération du surnageant peut affecter la prolifération cellulaire mais également la production de protéines ainsi que leur sécrétion (Hasan et al., 1999; Levin et al., 2010; Zander and Bemark, 2008). Enfin, deux facteurs présents dans l'environnement osseux présentent une augmentation de sécrétion suite à la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3. Il s'agit de FGF1 (Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1) qui participe à l'augmentation de la densité minérale osseuse et de GDF15 (Growth/Differentiation Factor 15) qui est associé à la diminution de la différenciation des ostéoclastes (Hoppman et al., 2010; Vanhara et al., 2009). Ces deux facteurs semblent donc favoriser la croissance osseuse à l'inverse des cellules PC-3 connues pour développer des tumeurs lytiques. Est-ce que la Cx43 présente dans les cellules PC-3 diminue leur activité ostéolytique ? Récemment il a été montré que GDF15 diminuait l'invasion des cellules PC-3 en chambre de Boyden corrélant ainsi avec la diminution de l'invasion pour les cellules PC-3 Cx43 (Cheng et al., 2011). Ainsi, certains facteurs impliqués dans le ralentissement de la prolifération, dans l'invasion et dans le renouvellement osseux ont une sécrétion augmentée suite à la surexpression de la Cx43 dans les cellules PC-3.

Concernant les cellules LNCaP, les facteurs d'intérêt modifiés par la surexpression de la Cx43 sont plus nombreux. De façon intéressante, certains facteurs comme PTX3 ou FST dont l'expression est augmentée dans le sérum de patient atteint d'un cancer de la prostate ont une sécrétion accrue pour les cellules LNCaP Cx43 (Diamandis et al., 2011; Ravenna et al., 2009). De plus, la sécrétion de facteurs impliqués dans l'invasion cellulaire tels que la MMP-13 (collagénase) et PLAT est augmentée dans les cellules LNCaP Cx43 par rapport aux cellules LNCaP mock alors qu'elle est diminuée pour un inhibiteur des métalloprotéinases tel que TIMP-2. Ces résultats sont donc en corrélation avec l'augmentation de l'invasion des cellules LNCaP Cx43 mesurée *in vitro*. Enfin des facteurs impliqués dans le remodelage osseux tels que la  $\beta$ 2M, la BMP-3 ou encore LGALS1 voient leur sécrétion par les cellules LNCaP Cx43 augmenter. La  $\beta$ 2M a été montré comme favorisant la progression tumorale des cellules cancéreuses prostatiques aussi bien dans les cellules PC-3 que dans les cellules LNCaP (Huang et al., 2006). Il s'avère que la  $\beta$ 2M interagirait avec son récepteur présent à la membrane plasmique des cellules cancéreuses et accentuerait la transition épithélio-

mésenchymateuse en augmentant l'expression de la vimentine et de la N-cadhérine (Josson et al., 2011). Ainsi pour les cellules LNCaP, la surexpression de la Cx43 semble augmenter la sécrétion d'un grand nombre de protéines participant à l'invasion et au remodelage osseux.

L'analyse du sécrétome permet donc d'une part de confirmer les résultats obtenus *in vitro* sur l'impact de la Cx43 sur la prolifération ou l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques et d'autre part de mettre en évidence que la Cx43 influence la sécrétion de protéines indépendamment de la communication intercellulaire pour les cellules PC-3. A l'inverse, pour les cellules LNCaP Cx43 la communication intercellulaire semble amplifier la sécrétion de facteurs agressifs et ostéolytiques. L'utilisation de bloqueurs de la communication tels que l'acide glycyrrhétinique ou encore les peptides mimétiques GAP27 permettrait de confirmer ou non le rôle de la communication cellulaire dans la sécrétion de protéines.

Il est à noter que l'analyse du sécrétome est une technique assez récente et très peu de données sur l'impact de la Cx43 sur la sécrétion de protéines sont disponibles dans la littérature.

Globalement, la caractérisation des cellules cancéreuses prostatiques nous indique que la Cx43 accroît le potentiel métastatique des cellules LNCaP. A l'inverse pour les cellules PC-3, il apparaît que la Cx43 semble diminuer leur capacité métastatique. Dans ce contexte, il nous a donc paru intéressant de déterminer si la Cx43 modifiait l'impact osseux des cellules cancéreuses prostatiques *in vivo*. Ainsi, l'injection intra-tibiale a permis de confirmer que la surexpression de la Cx43 rendait les cellules LNCaP plus agressives. L'incidence tumorale ainsi que la perte du volume osseux sont plus importants pour les cellules LNCaP Cx43 que pour les cellules LNCaP mock. L'apparition de tumeurs ostéolytiques a été tout d'abord surprenante pour les cellules LNCaP qui ont été montrées comme ostéoblastiques dans d'autres études (Yonou et al., 2003; Yonou et al., 2004). Mais il s'avère que cette lignée peut être mixte c'est-à-dire, soit développer des lésions lytiques ou ostéoblastiques (Corey et al., 2002). Dans nos conditions expérimentales, l'évolution lytique semble donc prédominer. La BMP-3 est un facteur connu pour inhiber la formation osseuse et est associé à la formation de métastases ostéolytiques (Bentley et al., 1992; Daluiski et al., 2001; Gamer et al., 2009). Dans notre étude, la sécrétion de ce facteur est augmentée après surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP. Il pourrait participer à l'augmentation d'incidence des tumeurs lytiques lorsque les cellules LNCaP Cx43 sont injectées dans la tête du tibia des souris.

Les cellules PC-3 développent également des tumeurs ostéolytiques mais aucun effet de la Cx43 sur le développement des tumeurs n'a pu être observé. Il a été montré que l'injection intra-fémorale des cellules PC-3 entraîne également le développement de tumeurs ostéolytiques (Kaighn et al., 1979; Wu et al., 1998) associé à une forte présence des ostéoclastes à l'interface os/tumeur (Fizazi et al., 2003).

De plus, les cellules PC-3 natives sont des cellules à la base très agressives dont la surexpression de la Cx43 modifie leur caractéristique *in vitro* mais pas *in vivo* après injection intra-tibiale. Il nous a donc semblé intéressant de déterminer si la Cx43 dans les cellules PC-3 influençait leur dissémination au sein de l'organisme après injection intra-cardiaque chez la souris. Lors d'une étude préliminaire de bioluminescence, nous avons donc suivi la dissémination des cellules PC-3 marquées par la luciférase et évalué l'impact de la surexpression de la Cx43. Il apparaît que, dans nos conditions, la Cx43 semble diminuer le développement métastatique osseux des cellules PC-3. En effet, les souris PC-3 Cx43 développent plus tardivement des métastases osseuses par rapport aux souris PC-3 mock nécessitant un sacrifice plus précoce de ces dernières. De plus, le site de métastase privilégié des cellules est clairement le tissu osseux, avec une préférence pour les pattes antérieures et postérieures ainsi que la mâchoire. Ainsi, il apparaît que la surexpression de la Cx43 cytoplasmique diminue la dissémination et l'invasion des cellules PC-3 *in vivo*.

L'injection intra-cardiaque des cellules LNCaP est à envisager même s'il a été montré dans une étude antérieure que les cellules natives n'entraînaient pas le développement de métastases osseuses (Wu et al., 1998). En effet, nos travaux montrent que la Cx43 accroît *in vitro* l'invasion et l'adhérence des cellules LNCaP et augmente *in vivo* l'incidence des tumeurs après injection intra-tibiale. De plus, il a été montré que l'expression de la Cx43 et de la Cx26 est augmentée dans les métastases des cellules cancéreuses prostatiques et mammaires. Elles participeraient d'une part à l'ostéomimétisme et d'autre part à la transition inverse de l'EMT pour permettre le développement de métastases (Bellahcene et al., 2007; Chao et al., 2011; Clezardin and Teti, 2007). Une autre étude a également montré que l'expression de la Cx43 était augmentée lors du développement de métastases dans les ganglions lymphatiques d'un cancer de l'estomac. Cette variation d'expression de la Cx43 était associée à une re-expression de la E-cadhérine caractéristique de la transition inverse de l'EMT (Tang et al., 2011). Concernant le cancer du sein, la Cx43 semble être impliquée dans le développement de métastases des ganglions lymphatiques (Kanczuga-Koda et al., 2006). A l'inverse, des études plus récentes semblent indiquer que la Cx43 a un effet inhibiteur sur le développement de métastases pulmonaires (Li et al., 2008b; Plante et al., 2011). Enfin, dans

des cellules de mélanome, la Cx43 est aussi associée à un phénotype métastatique agressif. En effet, la surexpression de PAR-1 (Protease-Activated Receptor-1), impliquée dans les métastases des cellules de mélanomes, entraîne une augmentation d'expression de la Cx43 et une diminution de PAR-1 réduit le développement de métastases ainsi que le niveau d'expression de la Cx43 (Villares et al., 2009). Le rôle de la Cx43 dans le développement des métastases semblent être dépendant du type cellulaire mais également du foyer métastatique. Ainsi, il semble nécessaire d'évaluer son implication dans la dissémination des cellules LNCaP et de déterminer le site privilégié pour le développement des métastases.

Il s'avère que l'interaction des cellules cancéreuses prostatiques avec le micro-environnement osseux chez l'homme entraîne majoritairement l'apparition de lésions ostéoblastiques caractérisées par l'augmentation de la formation osseuse et donc de la densité minérale osseuse. Cependant, des études cliniques ont montré une augmentation d'expression de marqueurs ostéoblastiques (phosphatase alcaline) mais également de marqueurs de la résorption osseuse (collagène de type 1) dans le sérum de patients atteints d'un cancer de la prostate avec métastases osseuses. De plus, en comparant ces sérums avec le sérum de patients atteints d'un cancer du sein avec métastases ostéolytiques, ils ont observé que les marqueurs de la résorption osseuse sont plus élevés dans le sérum de patients atteints d'un cancer de la prostate avec métastases ostéoblastiques (Demers et al., 2000; Demers et al., 2003; Garnero et al., 2000).

L'étape importante dans le développement des métastases osseuses de type ostéoblastique apparaît donc être tout d'abord la résorption de la matrice osseuse, mais le mécanisme reste encore peu connu.

Pour comprendre l'impact de la Cx43 sur le développement de tumeurs osseuses constatées *in vivo*, des co-cultures avec ou sans contact ont été effectuées entre les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 et des ostéoblastes issus de calvarias de souris. La culture des ostéoblastes murins a été mise au point et validée précédemment au laboratoire (Geneau et al., 2007; Geneau et al., 2010).

Avant l'analyse des co-cultures, il a été important de déterminer une possible communication hétérocellulaire entre les cellules cancéreuses prostatiques et les ostéoblastes. Ainsi les cellules LNCaP Cx43 peuvent établir des échanges par le transfert de molécules intercellulaires alors que pour les cellules PC-3, aucune communication directe n'existe avec les ostéoblastes. C'est la première fois qu'une communication hétérocellulaire par jonctions

communicantes entre des cellules cancéreuses prostatiques et des ostéoblastes a été mise en évidence. Précédemment, il a été montré que des cellules tumorales mammaires pouvaient établir une communication hétérocellulaire avec les ostéoblastes. Il s'avère que la communication homocellulaire entre les cellules tumorales mammaires est plus faible que cette communication hétérocellulaire. Ainsi, les auteurs en ont conclu que l'établissement d'une communication hétérocellulaire était importante pour le développement de métastases osseuses (Donahue et al., 2003; Kapoor et al., 2004). Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer si la communication hétérocellulaire influençait le phénotype des ostéoblastes par comparaison avec les cellules PC-3 qui n'établissent pas de communication hétérocellulaire.

La co-culture avec les cellules cancéreuses prostatiques a mis en évidence une augmentation modérée de la prolifération des ostéoblastes (facteur de 1,25). En effet, des études précédentes avaient montré que des cellules cancéreuses prostatiques MDA PCa 2a, qui développent des lésions ostéoblastiques, augmentaient le nombre d'ostéoblastes de 3,5 fois après 4 jours de co-culture sans contact direct. De plus, dans cette étude, l'impact des cellules PC-3 et des cellules LNCaP sur la prolifération des ostéoblastes avait également été étudié démontrant une absence d'effet pour la co-culture avec les cellules LNCaP et une légère diminution pour les cellules PC-3 (Yang et al., 2001). Une étude portant sur l'impact du milieu conditionné de cellules tumorales mammaires HT-39 sur la prolifération des ostéoblastes a montré que le milieu conditionné ne modifiait pas la prolifération des cellules. A l'inverse, elle diminue l'expression de marqueurs de différenciation ostéogénique. Ces cellules, comme la majorité des cellules tumorales mammaires, développent des tumeurs ostéolytiques (Bunyaratavej et al., 2000). Dans notre étude, l'augmentation de la prolifération des ostéoblastes étant très faible, cela semble être lié au fait que les cellules cancéreuses prostatiques développent des lésions ostéolytiques. Une prolifération accrue des ostéoblastes semble donc être importante pour le développement de lésions ostéocondensantes.

De plus, il a été observé un effet de la surexpression de la Cx43 sur la prolifération des ostéoblastes. Tout d'abord, les cellules LNCaP Cx43 en contact augmentent plus faiblement la prolifération des ostéoblastes que les cellules LNCaP mock. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans de nombreux cas, lorsque la connexine est présente à la membrane, elle diminue la prolifération des cellules (Herrero-Gonzalez et al., 2010; Huang et al., 2001; Lee and Rhee, 2011; Seul et al., 2004; Xu et al., 2008). Même si la Cx43 ne modifie pas la prolifération des cellules LNCaP Cx43 par une communication homocellulaire, elle semble altérer la prolifération des ostéoblastes par une communication hétérocellulaire. Néanmoins, dans la

configuration sans contact, l'effet inverse est observé mais est moins marqué. En effet, les cellules LNCaP Cx43 possèdent un niveau d'expression de la  $\beta$ 2M plus élevé que les cellules LNCaP mock. Cette  $\beta$ 2M a été décrite précédemment comme activateur de la prolifération des ostéoblastes pouvant donc expliquer cette légère augmentation de la prolifération. Concernant la co-culture avec les cellules PC-3, la surexpression de la Cx43 augmente la prolifération des ostéoblastes dans la configuration en contact et n'a aucun effet dans la configuration sans contact. La Cx43 cytoplasmique semble empêcher aux cellules PC-3 de ralentir la prolifération cellulaire des ostéoblastes alors que la communication hétérocellulaire avec les cellules LNCaP semble la diminuer.

Lors de l'étude de l'impact des cellules cancéreuses sur la différenciation ostéoblastique, il semble que la Cx43 ne modifie pas l'impact des cellules LNCaP et des cellules PC-3 sur le phénotype des ostéoblastes. De plus, il apparaît que les lignées cancéreuses prostatiques ralentissent la différenciation des ostéoblastes. En effet, la majorité des facteurs étudiés tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la Cx43 ainsi que Cbfa1 présente une diminution significative d'expression du 2<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> jour de co-culture accompagnée d'une augmentation d'expression le 10<sup>ème</sup> jour de co-culture. Seule la phosphatase alcaline montre une augmentation d'expression à tous les temps étudiés et dans la configuration en contact. Ce résultat a été également observé pour des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 connues pour développer des lésions ostéolytiques. En effet, le milieu conditionné de ces cellules mis au contact des ostéoblastes entraîne une diminution d'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que l'ostéocalcine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse (Mercer et al., 2004). Comme dans notre cas, des co-cultures avec ces mêmes cellules surexprimant la Cx43 et des ostéoblastes n'ont montré aucun impact de la Cx43 sur l'expression des marqueurs ostéogéniques par rapport aux co-cultures avec les cellules MDA-MB-231 mock (McLachlan et al., 2007). De plus, LGALS1 (galectine-1) est un facteur qui a été mis en évidence lors de l'analyse du sécrétome et qui présente une augmentation d'expression suite à la surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP. Ce facteur est impliqué dans l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que dans la diminution de l'expression de l'ostéocalcine par les ostéoblastes (Andersen et al., 2003). Ceci pourrait expliquer le fait que la phosphatase alcaline présente une augmentation d'expression alors que les autres facteurs voient leur expression diminuer. Néanmoins, aucun impact de la Cx43 lors de l'analyse de la différenciation des ostéoblastes en co-culture n'a été observé.

Des co-cultures entre des calvaria et les cellules PC-3 ont permis de montrer une diminution d'expression de marqueurs ostéogéniques tels que l'ostéocalcine, DKK1 et une augmentation d'expression de RANKL et de TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) dans les calvaria. Néanmoins, cette étude a été également effectuée avec les cellules LNCaP mettant en évidence un effet inverse avec une augmentation d'expression des marqueurs ostéogéniques et une diminution des facteurs activant la différenciation ostéoclastique (Nordstrand et al., 2009). Dans notre étude, les cellules LNCaP développent *in vivo* des tumeurs lytiques, ce qui est corroboré par l'absence d'augmentation de l'expression des facteurs ostéogéniques par les ostéoblastes. Il s'avère également que l'ostéocalcine et l'ostéopontine sont des facteurs impliqués dans la progression tumorale des cellules cancéreuses prostatiques et mammaires (Anborgh et al., 2011; Gardner et al., 2009). L'augmentation d'expression de ces facteurs par les ostéoblastes mesurée après dix jours de co-culture pourrait ainsi accroître l'agressivité des cellules et permettre par la suite aux cellules de développer des tumeurs lytiques.

Dans notre étude, il a été difficile de prolonger la différenciation des ostéoblastes au-delà de dix jours. En effet, la mesure de la minéralisation après vingt et un jours de différenciation par la coloration au Von Kossa n'a pu être effectuée à cause de la lyse des ostéoblastes après 15 jours de co-culture. A ces stades tardifs, les cellules cancéreuses prostatiques dans la configuration en contact se développent, en dépit des ostéoblastes, recouvrant quasiment la totalité de la boîte de culture.

Dans notre étude, une augmentation du ratio RANKL/Ostéoprotégérine a été démontrée *in vitro* avec un impact plus important dans la configuration en contact. D'autres études ont également montré que le milieu conditionné des cellules PC-3 pouvait diminuer la minéralisation des ostéoblastes MC3-T3 accompagnée d'une augmentation d'expression du RANKL et une diminution d'expression de l'ostéoprotégérine (Morrissey et al., 2010). De même, le ratio RANKL/Ostéoprotégérine est augmenté lors de l'ajout du milieu conditionné de cellules LNCaP sur des ostéoblastes MC3-T3 (Inoue et al., 2005).

Ainsi, il se pourrait que les cellules cancéreuses prostatiques participent à l'activation des précurseurs ostéoclastiques en augmentant l'expression du RANKL par les ostéoblastes. Il a été montré que la co-culture des cellules PC-3 avec des ostéoblastes dans la configuration sans contact entraîne une diminution de l'activité des ostéoblastes. Mais, la co-culture des cellules PC-3 avec des ostéoclastes RAW 264.7 accroît leur activité caractérisé par une augmentation de la cathepsine K et TRAP (Akech et al., 2010). Enfin, une étude a mis en

évidence que les ostéoblastes en contact avec les cellules PC-3 augmentent l'expression de facteurs impliqués dans l'ostéoclastogenèse tels que l'IL-8 et l'IL-6. Par la suite, le milieu de cette co-culture mis en contact avec des ostéoclastes active leur différenciation. Dans cette étude, les ostéoblastes influencent donc les cellules PC-3 en augmentant l'agressivité de ces dernières (Shiirevnyamba et al., 2010).

Les expériences de co-culture en 2D permettent d'étudier l'interaction entre deux types cellulaires. Néanmoins, le microenvironnement osseux comprenant différents types cellulaires (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes...) ainsi que des vaisseaux sanguins et des facteurs de croissance, est très important pour le développement de la tumeur, ceci n'est pas pris en compte dans le système de co-culture en 2D. Mais, de nouvelles études émergent utilisant des co-cultures en 3D qui impliquent au minimum trois types cellulaires et une matrice extracellulaire. Ainsi, il a été montré que la co-culture en 3D des cellules PC-3 en présence de cellules endothéliales et d'ostéoblastes augmentait la prolifération des cellules PC-3 mais plus lentement que pour la co-culture en 2D (Hsiao et al., 2009).

A cause de l'absence d'effet de la Cx43 sur le ratio RANKL/OPG en configuration contact, il a semblé intéressant d'étudier d'autres molécules participant à l'adhérence cellulaire telles que la cadhérine-11. La cadhérine-11, très exprimée par les ostéoblastes, a été montrée dans de nombreuses études comme étant impliquée dans l'invasion et dans le développement de métastases osseuses des cellules tumorales mammaires et prostatiques. En effet, l'équipe de Pishvaian a mis en évidence que les cellules épithéliales mammaires n'exprimaient pas la cadhérine-11 alors que les cellules tumorales invasives l'exprimaient avec une localisation à la membrane plasmique (Pishvaian et al., 1999). De plus, elle permet une augmentation de l'adhérence, de l'invasion et du développement de lésions ostéolytiques des cellules tumorales mammaires (Feldes et al., 2002; Tamura et al., 2008). Concernant le cancer de la prostate, il s'avère également que l'expression de la cadhérine-11 est augmentée lorsque les cellules ont métastasé dans l'os (Tomita et al., 2000). De plus, une étude a établi une corrélation entre le niveau d'expression de la Cx43 et de la cadhérine-11 dans des cellules tumorales mammaires MDA-MET. Mais, dans cette étude, il s'avère que la surexpression de la Cx43 à la membrane plasmique diminue les capacités métastatiques des cellules tumorales accompagnées d'une diminution d'expression de la cadhérine-11 (Li et al., 2008a). Ainsi, nous nous sommes donc demandé si la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques pouvait entraîner une modification d'expression ou de la localisation de la

cadhérine-11. De manière intéressante, la surexpression de la Cx43 dans les cellules LNCaP entraîne une localisation membranaire de la cadhérine-11 alors que pour les autres cellules, sa localisation est principalement cytoplasmique. Ainsi, cette localisation membranaire de la cadhérine-11 pourrait être un des mécanismes permettant d'expliquer l'augmentation d'agressivité lytique des cellules LNCaP, mesurées dans nos conditions expérimentales. En effet, des études précédentes avaient montré que seules les cellules PC-3 exprimaient la cadhérine-11 et non des cellules LNCaP (Chu et al., 2008; Lee et al., 2010). Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer le lien entre la Cx43 et la cadhérine-11 et le mécanisme de réadressage constaté dans les cellules LNCaP.

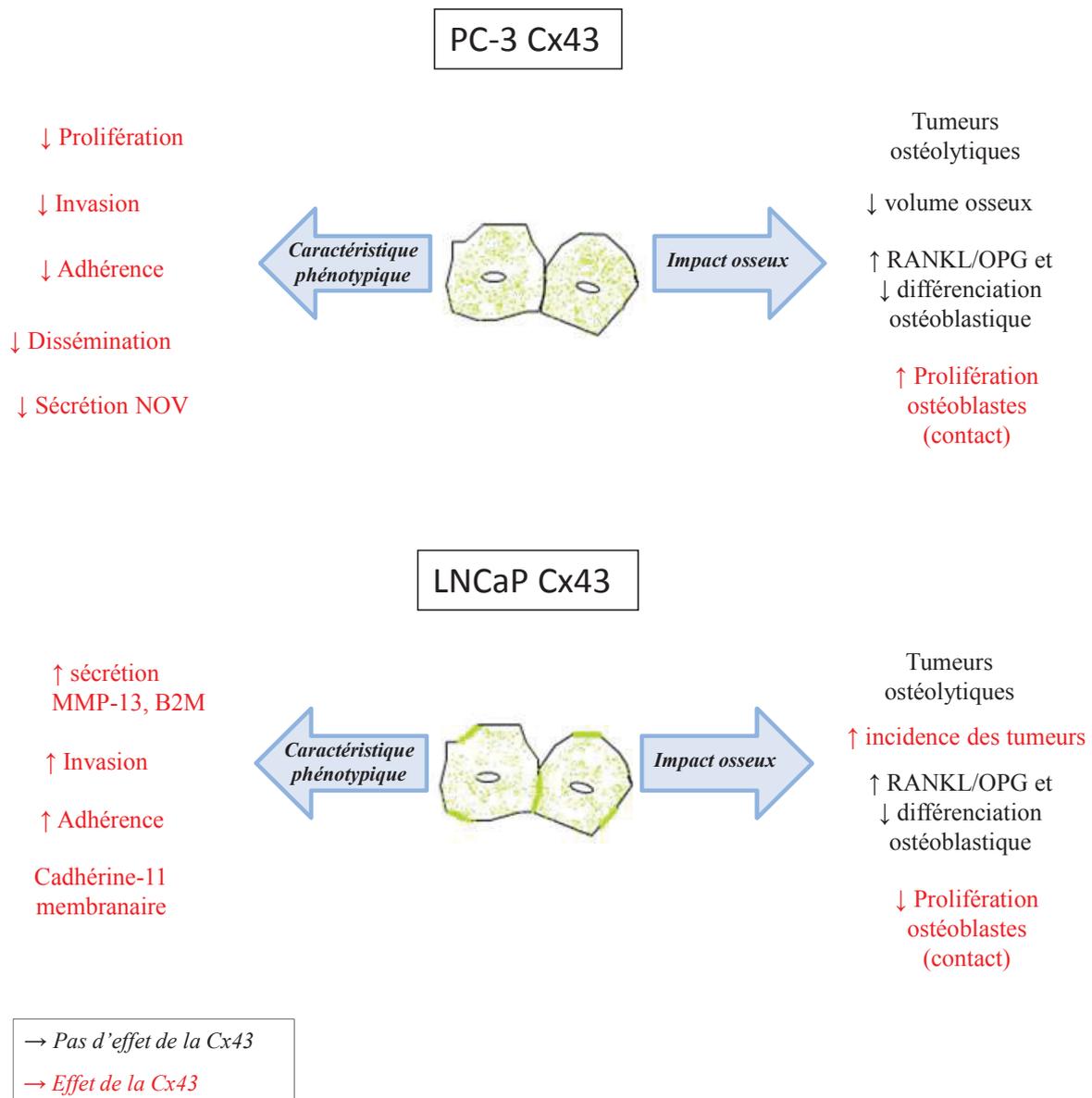
*Conclusion  
et  
Perspectives*

## Conclusion et perspectives.

Les résultats portant sur la surexpression de la Cx43 dans des cellules cancéreuses prostatiques ont permis d'observer un impact différent sur le potentiel métastatique en fonction du type cellulaire étudié (Figure 61). Il s'avère que pour des cellules faiblement métastatiques, les cellules LNCaP, la présence de la Cx43 à la membrane plasmique semble accroître leur agressivité aussi bien *in vitro* avec l'analyse de l'adhérence et de l'invasion qu'*in vivo* suite aux injections intra-tibiales. En effet, le développement de tumeurs ostéolytiques est plus important par rapport aux cellules LNCaP mock. A l'inverse pour les cellules PC-3 très invasives, la Cx43 surexprimée dans le cytoplasme entraîne une diminution des capacités invasives de ces cellules *in vitro* mais aussi *in vivo* avec un effet observé lors des injections intra-cardiaques (études préliminaires). Néanmoins, aucun effet directement lié à la surexpression de la Cx43 sur le phénotype des ostéoblastes n'a été observé à part une légère modification de la prolifération cellulaire. Les cellules cancéreuses prostatiques semblent ralentir la différenciation des ostéoblastes avec une augmentation d'expression de RANKL mais sans influence également de la Cx43.

Il serait intéressant de pouvoir adresser la Cx43 à la membrane plasmique dans les cellules PC-3 afin d'évaluer si ces cellules ont une modification de leur potentiel métastatique. En effet, l'impact de la Cx43 dans les deux types cellulaires étudiés PC-3 et LNCaP est opposé. Donc, il se pourrait que la localisation de la Cx43 soit importante dans le processus métastatique des cellules cancéreuses prostatiques. Il a été observé suite à l'utilisation d'une forte concentration de calcium dans le milieu de culture une augmentation d'expression de la Cx43 à la membrane plasmique dans des cellules Hela. De plus, la surexpression de la E-cadhérine (dépendante du calcium) permet l'expression de la Cx43 à la membrane plasmique dans ces mêmes cellules (Jongen et al., 1991; Nambara et al., 2007). Il serait intéressant de tester la surexpression de la E-cadhérine dans les cellules PC-3 qui ont en perdu l'expression. L'expression des cadhérines semble importante pour la localisation et l'établissement de la communication intercellulaire.

La Cx43 présente dans le cytoplasme des cellules PC-3 entraîne une diminution de la prolifération. Il a été montré par l'utilisation de bloqueur de la communication intercellulaire, une diminution de la prolifération de cellules de foie caractérisée par une diminution



**Figure 61 : Schéma représentant l'impact de la Cx43 sur le potentiel métastatique et l'impact osseux des cellules cancéreuses prostatiques.**

La Cx43 diminue la prolifération ainsi que les capacités d'invasion et d'adhérence des cellules PC-3. Elle semble participer également à la diminution de leur dissémination après injection intra-cardiaque. A l'inverse, pour les cellules LNCaP (peu agressives), la surexpression de la Cx43 accroît leur capacité d'invasion et d'adhérence ainsi que leur capacité à développer des métastases osseuses. Néanmoins les deux types cellulaires influencent la différenciation ostéoblastique (Ralentissement de la différenciation et augmentation d'expression de facteurs activant l'ostéoclastogenèse) sans impact de la Cx43.

d'expression des cyclines D1, cyclines D2, cyclines D4 (Uyama et al., 2003). Une étude portant sur des fibroblastes de poumons a mis en évidence que la fermeture des jonctions communicantes était associée à une augmentation de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S accompagnée d'une expression de p53 (Gilleron et al., 2009). Le groupe de Zhang, quant à lui, a mis en évidence un rôle de la Cx43 ne passant pas nécessairement par l'établissement de la communication intercellulaire dans la régulation de la prolifération cellulaire. En effet, la surexpression de la Cx43 dans des cellules d'ostéosarcomes est associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et une diminution d'expression des cyclines 2 et 4 (Zhang et al., 2001). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des cyclines afin de comprendre le rôle de la Cx43 dans le ralentissement de la prolifération des cellules PC-3.

L'angiogenèse, étape importante dans l'invasion tumorale, peut être influencée par le niveau d'expression des connexines dans les cellules tumorales. En effet, l'expression de la Cx43 dans des cellules de gliomes augmente la tubulogénèse des cellules HUVEC et ce par une interaction directe (Zhang et al., 2003a). La surexpression de la Cx43 dans des cellules tumorales mammaires augmente le développement de micro-métastases après injection des cellules dans le poumon. Ceci serait facilité par l'augmentation de l'adhérence des cellules tumorales sur les cellules endothéliales vasculaires (Elzarrad et al., 2008).

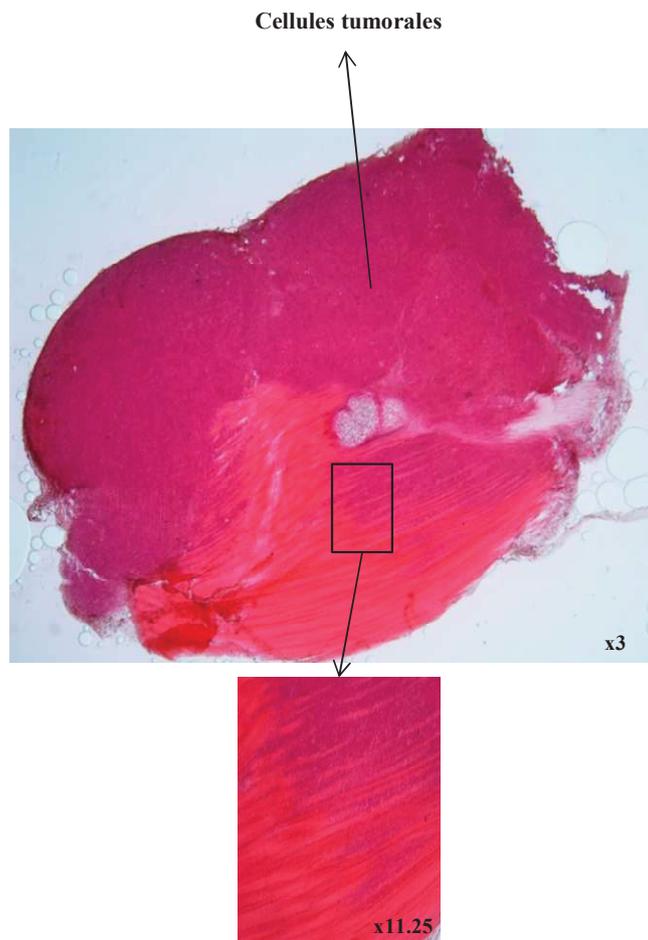
Il a été montré une communication hétérocellulaire entre les cellules endothéliales et des cellules tumorales mammaires permettant d'accroître la diapédèse (Pollmann et al., 2005). La communication hétérocellulaire est nécessaire aux cellules tumorales pour effectuer la diapédèse. De plus, il a été montré pour des cellules de mélanomes qu'une diminution d'expression de la Cx43 était associée à une diminution de l'adhérence sur les cellules endothéliales vasculaires (Villares et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant d'effectuer des cocultures avec des cellules HUVEC afin de déterminer si les cellules cancéreuses prostatiques (principalement les cellules LNCaP Cx43) établissent une communication intercellulaire avec les cellules endothéliales afin d'approfondir la caractérisation sur leur potentiel métastatique.

Comme décrit précédemment les jonctions communicantes ont un rôle dans le développement. En effet, il a été montré un rôle de la Cx26 et de la Cx43 dans la migration des neurones de la zone ventriculaire (Elias et al., 2007; Fushiki et al., 2003). De plus, la Cx43 a également une implication dans la migration des cellules de la crête neurale chez la souris (Huang et al., 1998a). Dans le cas de cancers, la Cx26 est associée à une augmentation de la migration des cellules de mélanome, tout comme la Cx32 dans les cellules cancéreuses

du foie (les cellules HUH7) (Ito et al., 2006; Li et al., 2007). Cela signifie que les connexines ont un rôle important dans la migration des cellules. Ainsi, par vidéo microscopie, il serait possible d'évaluer le rôle de la Cx43 dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques. Pour compléter cette analyse, l'utilisation de bloqueurs de la communication tels que la carbenoxolone ou encore l'acide 18 $\alpha$ -glycyrrhétinique permettrait de déterminer si l'effet observé est dépendant ou non de la communication jonctionnelle. De plus, il permettrait de déterminer si l'adhérence des cellules ainsi que l'invasion des cellules LNCaP Cx43 est régie par la communication intercellulaire ou si cela passe par un autre mécanisme.

L'injection intra-cardiaque permet de suivre la dissémination des cellules cancéreuses prostatiques. Une injection orthotopique de ces mêmes cellules permettrait d'étudier le processus métastatique dans son ensemble. En effet, les cellules peuvent proliférer dans la prostate et seraient amenées à initier par la suite les processus de néoangiogenèse pour métastaser dans d'autres organes. Cette approche permettrait d'évaluer le rôle de la Cx43 dans le développement de la tumeur primaire et ensuite d'analyser le développement de métastases osseuses. Des injections orthotopiques des cellules PC-3 ou des cellules LNCaP ont été effectuées pour évaluer le développement de tumeur au sein de la prostate et également d'observer le développement des métastases. Les auteurs se sont rendus compte que les cellules PC-3 métastasaient principalement dans le tissu osseux tandis que les cellules LNCaP avaient une préférence pour les ganglions lymphatiques (Pettaway et al., 1996; Tsingotjidou et al., 2003; Wang et al., 1999). Ainsi, il serait intéressant d'étudier si les cellules LNCaP surexprimant la Cx43 ont une préférence plus marquée pour le tissu osseux par rapport aux cellules LNCaP mock.

Il s'avère que les deux lignées cellulaires étudiées, après injection intra-tibiale chez la souris, permettent le développement de tumeurs ostéolytiques. Hors, dans la majorité des cas chez l'homme, les métastases osseuses du cancer de la prostate sont ostéocondensantes. Quel est le rôle de la Cx43 dans le développement de métastases ostéoblastiques ? Pour cela, la surexpression de la Cx43 dans des cellules connues pour développer des métastases ostéocondensantes telles que les cellules C4-2 permettrait d'évaluer le rôle de la Cx43 dans le potentiel métastatique de ce type de cellules. Cette étude permettrait également d'évaluer si la Cx43 dans les cellules C4-2 influence le phénotype des ostéoblastes dans la configuration en contact lors des expériences de co-culture. Les souris TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate) est un modèle développé par l'équipe de Gingrich en 1996. Ces souris



**Figure 62 : Exemple d'une coupe de tumeur obtenue après injection intra-tibiale des cellules LNCaP Cx43 colorée à l'hématoxyline/éosine.**

Le cadre noir permet de mettre en évidence l'infiltration des cellules tumorales entre les fibres musculaires squelettiques (x11,25).

développent des cancers de la prostate avec métastases pulmonaires et ganglionnaires (Gingrich et al., 1996). Il serait intéressant d'augmenter l'expression de la Cx43 et d'évaluer si par la suite les cellules cancéreuses prostatiques développent des métastases osseuses.

Les tumeurs obtenues après injection intra-tibiale ont été colorées à l'hématoxyline/éosine permettant de mettre en évidence que les cellules tumorales étaient regroupées en masse uniforme avec infiltrations dans le muscle squelettique environnant (Figure 62). De plus, aucune zone nécrotique n'a pu être mise en évidence et les tumeurs ne présentent pas de différences morphologiques. Suite à ce travail préliminaire, il faudrait approfondir l'analyse histopathologiques des tumeurs. En effet, il serait intéressant de réaliser un marquage TRAP qui permettrait de déterminer si les cellules tumorales sont en contact direct ou non avec les ostéoclastes. En effet, il a été montré suite à l'analyse de tumeurs ostéolytiques dues à un cancer mammaire que les ostéoclastes étaient localisés à proximité de la tumeur (Nakamura et al., 2008). De même, après injection intra-tibiale des cellules PC-3, des coupes de tumeurs ont mis en évidence la présence d'ostéoblastes mais également d'ostéoclastes à l'interface os/tumeur (Akech et al., 2010; Shiirevnyamba et al., 2010). Des études ont mis en évidence une activation et une différenciation des ostéoclastes lorsqu'ils étaient co-cultivés avec les cellules PC-3 (Araujo et al., 2009; Mizutani et al., 2009). En effet, les cellules PC-3 ainsi que les cellules LNCaP expriment RANKL et peuvent donc activer la différenciation des ostéoclastes pour permettre la résorption de la matrice osseuse (Penno et al., 2009). De plus, il a été montré une augmentation d'expression de RANKL sur des coupes de tumeurs de la prostate de patients ayant métastasé dans l'os (Brown et al., 2001). Dans notre étude, un impact de la Cx43 sur le développement de tumeurs composées de cellules LNCaP a été observé. Néanmoins la co-culture entre les ostéoblastes et les cellules cancéreuses prostatiques n'a pas permis de mettre en évidence un impact de la Cx43 dans la différenciation des ostéoblastes.

De plus, au vu des résultats obtenus sur l'augmentation d'expression de RANKL par les ostéoblastes en co-culture avec les cellules LNCaP et les cellules PC-3 ainsi que le développement de tumeurs lytiques *in vivo*, il semble intéressant d'effectuer des co-cultures entre les cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non la Cx43 et des ostéoclastes. Ainsi, il sera possible de déterminer si la Cx43 dans les cellules PC-3 et les cellules LNCaP participent au dialogue avec les ostéoclastes. Une question reste donc à être élucidée : Le développement de tumeurs ostéolytiques passe-t-il par une activation directe ou indirecte des ostéoclastes ou des ostéoblastes par les cellules tumorales prostatiques surexprimant la Cx43 ?

Enfin, dans notre étude, il a été montré que les cellules cancéreuses prostatiques influençaient le phénotype des ostéoblastes. Mais, il serait intéressant d'étudier le dialogue inverse et d'évaluer si les ostéoblastes modifient le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques. De plus, la présence de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques peut également influencer le dialogue entre les deux types cellulaires. Des études ont évalué l'impact du milieu conditionné de cellules stromales osseuses sur l'expression de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse. Il s'est avéré que le milieu conditionné augmentait l'expression de ces deux protéines dans les cellules LNCaP et pouvait accroître leur prolifération (Huang et al., 2005; Li et al., 2010). Une étude a été effectuée sans androgènes permettant de mettre en évidence que l'environnement osseux suffit pour la prolifération et la progression des cellules LNCaP (Wang et al., 2009). De plus, les cellules stromales en contact avec les cellules PC-3 accroissent l'invasion de ces dernières à travers le collagène de type 1 et le milieu conditionné de moelle osseuse augmente la prolifération de ces mêmes cellules (Chackal-Roy et al., 1989; Nabha et al., 2008).

Ainsi, dans notre étude, la Cx43 semble être impliquée dans le processus métastatique des cellules cancéreuses prostatiques et également dans le développement de métastases osseuses. Dans notre modèle d'étude, sa fonction semble être dépendante d'une part de l'agressivité initiale des cellules cancéreuses prostatiques et d'autre part de sa localisation cellulaire.

# *Bibliographie*

## Bibliographie

**Achbarou, A., Kaiser, S., Tremblay, G., Ste-Marie, L. G., Brodt, P., Goltzman, D., and Rabbani, S. A.** (1994). Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Cancer Res* 54, 2372-2377.

**Adams, J. M., and Cory, S.** (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19, 488-496.

**Adwan, H., Bauerle, T., Najajreh, Y., Elazer, V., Golomb, G., and Berger, M. R.** (2004). Decreased levels of osteopontin and bone sialoprotein II are correlated with reduced proliferation, colony formation, and migration of GFP-MDA-MB-231 cells. *Int J Oncol* 24, 1235-1244.

**Ahmad, S., Diez, J. A., George, C. H., and Evans, W. H.** (1999). Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem J* 339 ( Pt 2), 247-253.

**Ahmad, S., and Evans, W. H.** (2002). Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J* 365, 693-699.

**Ai, Z., Fischer, A., Spray, D. C., Brown, A. M., and Fishman, G. I.** (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105, 161-171.

**Akech, J., Wixted, J. J., Bedard, K., van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T. A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Languino, L. R., Altieri, D. C., et al.** (2010). Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene* 29, 811-821.

**Alam, A. S., Gallagher, A., Shankar, V., Ghatei, M. A., Datta, H. K., Huang, C. L., Moonga, B. S., Chambers, T. J., Bloom, S. R., and Zaidi, M.** (1992). Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 130, 3617-3624.

**Alford, A. I., Jacobs, C. R., and Donahue, H. J.** (2003). Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled. *Bone* 33, 64-70.

**Allagnat, F., Klee, P., Waeberg G., Meda, P., and Haefliger J.-A.** (2011). Connexin36 down-regulation by pro-inflammatory cytokines contributes to beta-cell apoptosis. International Gap Junction Conference 2011.

**Almasi, C. E., Brasso, K., Iversen, P., Pappot, H., Hoyer-Hansen, G., Dano, K., and Christensen, I. J.** (2011). Prognostic and predictive value of intact and cleaved forms of the urokinase plasminogen activator receptor in metastatic prostate cancer. *Prostate* 71, 899-907.

**Anborgh, P. H., Mutrie, J. C., Tuck, A. B., and Chambers, A. F.** (2011). Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* 5, 111-122.

**Andersen, H., Jensen, O. N., Moiseeva, E. P., and Eriksen, E. F.** (2003). A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18, 195-203.

**Anderson, J. M., and Van Itallie, C. M.** (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 269, G467-475.

**Anderson, P. H., and Atkins, G. J.** (2008). The skeleton as an intracrine organ for vitamin D metabolism. *Mol Aspects Med* 29, 397-406.

**Anzini, P., Neuberg, D. H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K. V., Suter, U., and Martini, R.** (1997). Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 17, 4545-4551.

**Araujo, J. C., Poblenz, A., Corn, P., Parikh, N. U., Starbuck, M. W., Thompson, J. T., Lee, F., Logothetis, C. J., and Darnay, B. G.** (2009). Dasatinib inhibits both osteoclast activation and prostate cancer PC-3-cell-induced osteoclast formation. *Cancer Biol Ther* 8, 2153-2159.

**Archard, H. O., and Denys, F. R.** (1979). Development of annular gap junctions in guinea pig epithelia. *J Oral Pathol* 8, 187-197.

**Arita, K., Akiyama, M., Tsuji, Y., McMillan, J. R., Eady, R. A., and Shimizu, H.** (2002). Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development. *J Histochem Cytochem* 50, 1493-1500.

**Arya, M., Patel, H. R., McGurk, C., Tatoud, R., Klocker, H., Masters, J., and Williamson, M.** (2004). The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol* 4, 291-303.

**Aspenberg, P., Jeppsson, C., and Economides, A. N.** (2001). The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *J Bone Miner Res* 16, 497-500.

**Atkinson, M. M., Lampe, P. D., Lin, H. H., Kollander, R., Li, X. R., and Kiang, D. T.** (1995). Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 9), 3079-3090.

**Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., and Gupta, A. K.** (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17, 77S-83S.

**Auerbach, R., Lu, W. C., Pardon, E., Gumkowski, F., Kaminska, G., and Kaminski, M.** (1987). Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo. *Cancer Res* 47, 1492-1496.

- Autzen, P., Robson, C. N., Bjartell, A., Malcolm, A. J., Johnson, M. I., Neal, D. E., and Hamdy, F. C.** (1998). Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br J Cancer* 78, 1219-1223.
- Ayad, W. A., Locke, D., Koreen, I. V., and Harris, A. L.** (2006). Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J Biol Chem* 281, 16727-16739.
- Bader, P., and Weingart, R.** (2006). Pitfalls when examining gap junction hemichannels: interference from volume-regulated anion channels. *Pflugers Arch* 452, 396-406.
- Bai, S., Spray, D. C., and Burk, R. D.** (1993). Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim Biophys Acta* 1216, 197-204.
- Bailleul, B., Brown, K., Ramsden, M., Akhurst, R. J., Fee, F., and Balmain, A.** (1989). Chemical induction of oncogene mutations and growth factor activity in mouse skin carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 81, 23-27.
- Bao, W., Fu, H. J., Jia, L. T., Zhang, Y., Li, W., Jin, B. Q., Yao, L. B., Chen, S. Y., and Yang, A. G.** (2010). HER2-mediated upregulation of MMP-1 is involved in gastric cancer cell invasion. *Arch Biochem Biophys* 499, 49-55.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., et al.** (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83, 706-716.
- Bates, D. C., Sin, W. C., Aftab, Q., and Naus, C. C.** (2007). Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia* 55, 1554-1564.
- Bauer, M., Eickhoff, J. C., Gould, M. N., Mundhenke, C., Maass, N., and Friedl, A.** (2008). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 108, 389-397.
- Beardslee, M. A., Laing, J. G., Beyer, E. C., and Saffitz, J. E.** (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83, 629-635.
- Becker, D. L., and Davies, C. S.** (1995). Role of gap junctions in the development of the preimplantation mouse embryo. *Microsc Res Tech* 31, 364-374.
- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M., and Birchmeier, W.** (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108, 2435-2447.
- Bellahcene, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clezardin, P., and Castronovo, V.** (2007). Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101, 135-148.

- Bentley, H., Hamdy, F. C., Hart, K. A., Seid, J. M., Williams, J. L., Johnstone, D., and Russell, R. G.** (1992). Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer* *66*, 1159-1163.
- Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F., and Fischbeck, K. H.** (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* *262*, 2039-2042.
- Berthon, P., Valeri, A., Cohen-Akenine, A., Drelon, E., Paiss, T., Wohr, G., Latil, A., Millasseau, P., Mellah, I., Cohen, N., et al.** (1998). Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet* *62*, 1416-1424.
- Bertram, J. S.** (2001). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* *21*, 167-223.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P. G.** (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* *19*, 180-192.
- Billaud, M., Lohman, A. W., Straub, A. C., Looft-Wilson, R., Johnstone, S. R., Araj, C. A., Best, A. K., Chekeni, F. B., Ravichandran, K. S., Penuela, S., et al.** (2011). Pannexin1 regulates alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. *Circ Res* *109*, 80-85.
- Bittman, K. S., and LoTurco, J. J.** (1999). Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cereb Cortex* *9*, 188-195.
- Blasco, M. A.** (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* *6*, 611-622.
- Bond, S. R., Lau, A., Penuela, S., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Laird, D. W., and Naus, C. C.** (2011). Pannexin3 is a novel target for Runx2, expressed by osteoblasts and mature growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*.
- Bos, J. L.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* *49*, 4682-4689.
- Boutwell, R. K.** (1964). Some Biological Aspects of Skin Carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res* *4*, 207-250.
- Brauner, T., and Hulser, D. F.** (1990). Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids. *Invasion Metastasis* *10*, 31-48.
- Brigati, C., Noonan, D. M., Albini, A., and Benelli, R.** (2002). Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* *19*, 247-258.
- Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E., and Hall, D. M.** (2010). Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* *112*, 3-25.
- Brown, J. M., Corey, E., Lee, Z. D., True, L. D., Yun, T. J., Tondravi, M., and Vessella, R. L.** (2001). Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology* *57*, 611-616.

- Brubaker, K. D., Corey, E., Brown, L. G., and Vessella, R. L.** (2004). Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem* 91, 151-160.
- Brubaker, K. D., Vessella, R. L., True, L. D., Thomas, R., and Corey, E.** (2003). Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res* 18, 222-230.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., and Monyer, H.** (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13644-13649.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., et al.** (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268.
- Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., and Uhm, J. H.** (2007). Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 82, 1271-1286.
- Bunyaratavej, P., Hullinger, T. G., and Somerman, M. J.** (2000). Bone morphogenetic proteins secreted by breast cancer cells upregulate bone sialoprotein expression in preosteoblast cells. *Exp Cell Res* 260, 324-333.
- Burdsal, C. A., Damsky, C. H., and Pedersen, R. A.** (1993). The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118, 829-844.
- Burra, S., Nicolella, D. P., Francis, W. L., Freitas, C. J., Mueschke, N. J., Poole, K., and Jiang, J. X.** (2010). Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13648-13653.
- Bussard, K. M., Gay, C. V., and Mastro, A. M.** (2008). The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev* 27, 41-55.
- Bussemakers, M. J., Van Bokhoven, A., Tomita, K., Jansen, C. F., and Schalken, J. A.** (2000). Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 85, 446-450.
- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C.** (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9, M57-60.
- Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Morris, V. L., Groom, A. C., Chambers, A. F., and MacDonald, I. C.** (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60, 2541-2546.
- Campo McKnight, D. A., Sosnoski, D. M., Koblinski, J. E., and Gay, C. V.** (2006). Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. *J Cell Biochem* 97, 288-302.
- Carmeliet, P.** (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.

- Celetti, S. J., Cowan, K. N., Penuela, S., Shao, Q., Churko, J., and Laird, D. W.** (2010). Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* *123*, 1363-1372.
- Chackal-Roy, M., Niemeyer, C., Moore, M., and Zetter, B. R.** (1989). Stimulation of human prostatic carcinoma cell growth by factors present in human bone marrow. *J Clin Invest* *84*, 43-50.
- Chao, Y., Wu, Q., Acquafondata, M., Dhir, R., and Wells, A.** (2011). Partial Mesenchymal to Epithelial Reverting Transition in Breast and Prostate Cancer Metastases. *Cancer Microenviron*.
- Charhon, S. A., Chapuy, M. C., Delvin, E. E., Valentin-Opran, A., Edouard, C. M., and Meunier, P. J.** (1983). Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia. *Cancer* *51*, 918-924.
- Chen, T., Wang, L. H., and Farrar, W. L.** (2000). Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* *60*, 2132-2135.
- Chen, Y. C., Sosnoski, D. M., and Mastro, A. M.** (2010). Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. *Breast Cancer Res* *12*, 215.
- Cheng, J. C., Chang, H. M., and Leung, P. C.** (2011). Wild-type p53 attenuates cancer cell motility by inducing growth differentiation factor-15 expression. *Endocrinology* *152*, 2987-2995.
- Cheng, S. L., Shin, C. S., Towler, D. A., and Civitelli, R.** (2000). A dominant negative cadherin inhibits osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* *15*, 2362-2370.
- Cherian, P. P., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L. F., Sprague, E., and Jiang, J. X.** (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* *16*, 3100-3106.
- Christiansen, J. J., and Rajasekaran, A. K.** (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* *66*, 8319-8326.
- Chu, K., Cheng, C. J., Ye, X., Lee, Y. C., Zurita, A. J., Chen, D. T., Yu-Lee, L. Y., Zhang, S., Yeh, E. T., Hu, M. C., *et al.*** (2008). Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* *6*, 1259-1267.
- Chung, D. J., Castro, C. H., Watkins, M., Stains, J. P., Chung, M. Y., Szejnfeld, V. L., Willecke, K., Theis, M., and Civitelli, R.** (2006). Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci* *119*, 4187-4198.
- Civitelli, R., Bacskai, B. J., Mahaut-Smith, M. P., Adams, S. R., Avioli, L. V., and Tsien, R. Y.** (1994). Single-cell analysis of cyclic AMP response to parathyroid hormone in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* *9*, 1407-1417.

- Civitelli, R., Beyer, E. C., Warlow, P. M., Robertson, A. J., Geist, S. T., and Steinberg, T. H.** (1993). Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest* 91, 1888-1896.
- Civitelli, R., Ziambaras, K., Warlow, P. M., Lecanda, F., Nelson, T., Harley, J., Atal, N., Beyer, E. C., and Steinberg, T. H.** (1998). Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 68, 8-21.
- Clair, C., Chalumeau, C., Tordjmann, T., Poggioli, J., Erneux, C., Dupont, G., and Combettes, L.** (2001). Investigation of the roles of Ca(2+) and InsP(3) diffusion in the coordination of Ca(2+) signals between connected hepatocytes. *J Cell Sci* 114, 1999-2007.
- Clezardin, P., and Teti, A.** (2007). Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis* 24, 599-608.
- Cohen-Salmon, M., Ott, T., Michel, V., Hardelin, J. P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D. C., Wangemann, P., Willecke, K., and Petit, C.** (2002). Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 12, 1106-1111.
- Condorelli, D. F., Parenti, R., Spinella, F., Trovato Salinaro, A., Belluardo, N., Cardile, V., and Cicirata, F.** (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10, 1202-1208.
- Constantin, B., and Cronier, L.** (2000). Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol* 196, 1-65.
- Cook, G. B., and Watson, F. R.** (1968). Events in the natural history of prostate cancer: using salvage curves, mean age distributions and contingency coefficients. *J Urol* 99, 87-96.
- Cooper, C. R., Chay, C. H., Gendernalik, J. D., Lee, H. L., Bhatia, J., Taichman, R. S., McCauley, L. K., Keller, E. T., and Pienta, K. J.** (2003). Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 97, 739-747.
- Cooper, C. R., McLean, L., Walsh, M., Taylor, J., Hayasaka, S., Bhatia, J., and Pienta, K. J.** (2000). Preferential adhesion of prostate cancer cells to bone is mediated by binding to bone marrow endothelial cells as compared to extracellular matrix components in vitro. *Clin Cancer Res* 6, 4839-4847.
- Corey, E., Quinn, J. E., Bladou, F., Brown, L. G., Roudier, M. P., Brown, J. M., Buhler, K. R., and Vessella, R. L.** (2002). Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: intra-tibial injection of human prostate cancer cells. *Prostate* 52, 20-33.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C., and Nedergaard, M.** (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15735-15740.

**Cowles, E. A., Brailey, L. L., and Gronowicz, G. A.** (2000). Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 52, 725-737.

**Crespin, S., Bechberger, J., Mesnil, M., Naus, C. C., and Sin, W. C.** (2010). The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J Cell Biochem* 110, 589-597.

**Cronier, L., Bastide, B., Herve, J. C., Deleze, J., and Malassine, A.** (1994). Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135, 402-408.

**Cronier, L., Crespin, S., Strale, P. O., Defamie, N., and Mesnil, M.** (2009). Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11, 323-338.

**Cronier, L., Frendo, J. L., Defamie, N., Pidoux, G., Bertin, G., Guibourdenche, J., Pointis, G., and Malassine, A.** (2003). Requirement of gap junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation. *Biol Reprod* 69, 1472-1480.

**Cronier, L., Herve, J. C., Deleze, J., and Malassine, A.** (1997). Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation. *Microsc Res Tech* 38, 21-28.

**Curtin, K. D., Zhang, Z., and Wyman, R. J.** (1999). Drosophila has several genes for gap junction proteins. *Gene* 232, 191-201.

**D'Hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Bultynck, G., and Himpens, B.** (2009). Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *Bioessays* 31, 953-974.

**Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E. R.** (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-120.

**Daja, M. M., Niu, X., Zhao, Z., Brown, J. M., and Russell, P. J.** (2003). Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6, 15-26.

**Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M. E., Gamer, L. W., Agius, E., Stevenson, S. L., Cox, K., Rosen, V., and Lyons, K. M.** (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* 27, 84-88.

**Dang, X., Doble, B. W., and Kardami, E.** (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem* 242, 35-38.

**Davies, T. C., Barr, K. J., Jones, D. H., Zhu, D., and Kidder, G. M.** (1996). Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev Genet* 18, 234-243.

**de Crombrugge, B., Lefebvre, V., and Nakashima, K.** (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13, 721-727.

**de la Mata, J., Uy, H. L., Guise, T. A., Story, B., Boyce, B. F., Mundy, G. R., and Roodman, G. D.** (1995). Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 95, 2846-2852.

**de la Piedra, C., Castro-Errecaborde, N. A., Traba, M. L., Mendez-Davila, C., Garcia-Moreno, C., Rodriguez de Acuna, L., and Rodriguez-Molina, J.** (2003). Bone remodeling markers in the detection of bone metastases in prostate cancer. *Clin Chim Acta* 331, 45-53.

**de Pina-Benabou, M. H., Szostak, V., Kyzozis, A., Rempe, D., Uziel, D., Urban-Maldonado, M., Benabou, S., Spray, D. C., Federoff, H. J., Stanton, P. K., and Rozental, R.** (2005). Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. *Stroke* 36, 2232-2237.

**de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Beertsen, W., van der Neut, R., and Everts, V.** (2005). Effect of CD44 deficiency on in vitro and in vivo osteoclast formation. *J Cell Biochem* 94, 954-966.

**Debiais, F., Hott, M., Graulet, A. M., and Marie, P. J.** (1998). The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 13, 645-654.

**Debiais, F., Lefevre, G., Lemonnier, J., Le Mee, S., Lasmoles, F., Mascarelli, F., and Marie, P. J.** (2004). Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent, -beta-catenin-independent signaling pathway. *Exp Cell Res* 297, 235-246.

**Decrock, E., De Vuyst, E., Vinken, M., Van Moorhem, M., Vranckx, K., Wang, N., Van Laeken, L., De Bock, M., D'Herde, K., Lai, C. P., et al.** (2009). Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model. *Cell Death Differ* 16, 151-163.

**Demers, L. M., Costa, L., and Lipton, A.** (2000). Biochemical markers and skeletal metastases. *Cancer* 88, 2919-2926.

**Demers, L. M., Costa, L., and Lipton, A.** (2003). Biochemical markers and skeletal metastases. *Clin Orthop Relat Res*, S138-147.

**Derangeon, M., Bourmeyster, N., Plaisance, I., Pinet-Charvet, C., Chen, Q., Duthe, F., Popoff, M. R., Sarrouilhe, D., and Herve, J. C.** (2008). RhoA GTPase and F-actin dynamically regulate the permeability of Cx43-made channels in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 283, 30754-30765.

**Dermietzel, R., Hwang, T. K., and Spray, D. S.** (1990). The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat Embryol (Berl)* 182, 517-528.

**Derynck, R., and Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.

- Desai, B., Rogers, M. J., and Chellaiah, M. A.** (2007). Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 6, 18.
- DeVries, S. H., and Schwartz, E. A.** (1992). Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J Physiol* 445, 201-230.
- Diamandis, E. P., Goodglick, L., Planque, C., and Thornquist, M. D.** (2011). Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 2395-2399.
- Diaz, V. M., Planaguma, J., Thomson, T. M., Reventos, J., and Paciucci, R.** (2002). Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 122, 806-819.
- Dicke, N., Pielensticker, N., Degen, J., Hecker, J., Tress, O., Bald, T., Gellhaus, A., Winterhager, E., and Willecke, K.** (2011). Peripheral lymphangiogenesis in mice depends on ectodermal connexin-26 (Gjb2). *J Cell Sci* 124, 2806-2815.
- Diez, J. A., Ahmad, S., and Evans, W. H.** (1999). Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur J Biochem* 262, 142-148.
- Dimitroff, C. J., Descheny, L., Trujillo, N., Kim, R., Nguyen, V., Huang, W., Pienta, K. J., Kutok, J. L., and Rubin, M. A.** (2005). Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* 65, 5750-5760.
- Dimitroff, C. J., Lechpammer, M., Long-Woodward, D., and Kutok, J. L.** (2004). Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* 64, 5261-5269.
- Dixon, K., and Koprás, E.** (2004). Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14, 441-448.
- Donahue, H. J., McLeod, K. J., Rubin, C. T., Andersen, J., Grine, E. A., Hertzberg, E. L., and Brink, P. R.** (1995). Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *J Bone Miner Res* 10, 881-889.
- Donahue, H. J., Saunders, M. M., Li, Z., Mastro, A. M., Gay, C. V., and Welch, D. R.** (2003). A potential role for gap junctions in breast cancer metastasis to bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3, 156-161.
- Dong, Z., Saliganan, A. D., Meng, H., Nabha, S. M., Sabbota, A. L., Sheng, S., Bonfil, R. D., and Cher, M. L.** (2008). Prostate cancer cell-derived urokinase-type plasminogen activator contributes to intraosseous tumor growth and bone turnover. *Neoplasia* 10, 439-449.
- Doty, S. B.** (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33, 509-512.

- Dougherty, K. M., Blomme, E. A., Koh, A. J., Henderson, J. E., Pienta, K. J., Rosol, T. J., and McCauley, L. K.** (1999). Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma. *Cancer Res* 59, 6015-6022.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., and Karsenty, G.** (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13, 1025-1036.
- Duffy, H. S., Fort, A. G., and Spray, D. C.** (2006). Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv Cardiol* 42, 1-17.
- Duflot-Dancer, A., Mesnil, M., and Yamasaki, H.** (1997). Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes. *Oncogene* 15, 2151-2158.
- Dunstan, C. R., Felsenberg, D., and Seibel, M. J.** (2007). Therapy insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 42-55.
- Dupont, E., el Aoumari, A., Briand, J. P., Fromaget, C., and Gros, D.** (1989). Cross-linking of cardiac gap junction connexons by thiol/disulfide exchanges. *J Membr Biol* 108, 247-252.
- Dutt, S. S., and Gao, A. C.** (2009). Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol* 5, 1403-1413.
- Ebihara, L.** (2003). New roles for connexons. *News Physiol Sci* 18, 100-103.
- Echetebe, C. O., Ali, M., Izban, M. G., MacKay, L., and Garfield, R. E.** (1999). Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. *Mol Hum Reprod* 5, 757-766.
- Edlund, M., Sung, S. Y., and Chung, L. W.** (2004). Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *J Cell Biochem* 91, 686-705.
- Edwards, J., Krishna, N. S., Witton, C. J., and Bartlett, J. M.** (2003). Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5271-5281.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R. A., Hulser, D. F., and Willecke, K.** (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129, 805-817.
- Elias, L. A., Wang, D. D., and Kriegstein, A. R.** (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901-907.
- Elmardi, A. S., Katchburian, M. V., and Katchburian, E.** (1990). Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int* 46, 239-245.

- Elzarrad, M. K., Haroon, A., Willecke, K., Dobrowolski, R., Gillespie, M. N., and Al-Mehdi, A. B.** (2008). Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med* 6, 20.
- Erlebacher, A., and Derynck, R.** (1996). Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 132, 195-210.
- Escaff, S., Fernandez, J. M., Gonzalez, L. O., Suarez, A., Gonzalez-Reyes, S., Gonzalez, J. M., and Vizoso, F. J.** (2010). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer* 102, 922-929.
- Eugenin, E. A., Branes, M. C., Berman, J. W., and Saez, J. C.** (2003). TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol* 170, 1320-1328.
- Evans, W. H., De Vuyst, E., and Leybaert, L.** (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* 397, 1-14.
- Ewing, J.** (1928). *Metastasis in neoplastic diseases*. Philadelphia, Saunders, WB.
- Falk, M. M., Kumar, N. M., and Gilula, N. B.** (1994). Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 127, 343-355.
- Fallon, R. F., and Goodenough, D. A.** (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90, 521-526.
- Felding-Habermann, B., O'Toole, T. E., Smith, J. W., Fransvea, E., Ruggeri, Z. M., Ginsberg, M. H., Hughes, P. E., Pampori, N., Shattil, S. J., Saven, A., and Mueller, B. M.** (2001). Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1853-1858.
- Feldman, B. J., and Feldman, D.** (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Feltes, C. M., Kudo, A., Blaschuk, O., and Byers, S. W.** (2002). An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 62, 6688-6697.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarron, M., and Blanco-Jerez, L.** (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, E151-157.
- Ferrara, N.** (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 789-791.
- Ferrari, S. L., Traianedes, K., Thorne, M., Lafage-Proust, M. H., Genever, P., Cecchini, M. G., Behar, V., Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., and Suva, L. J.** (2000). A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res* 15, 198-208.

- Festuccia, C., Dolo, V., Guerra, F., Violini, S., Muzi, P., Pavan, A., and Bologna, M.** (1998). Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 16, 513-528.
- Filson, A. J., Azarnia, R., Beyer, E. C., Loewenstein, W. R., and Brugge, J. S.** (1990). Tyrosine phosphorylation of a gap junction protein correlates with inhibition of cell-to-cell communication. *Cell Growth Differ* 1, 661-668.
- Fizazi, K., Yang, J., Peleg, S., Sikes, C. R., Kreimann, E. L., Daliani, D., Olive, M., Raymond, K. A., Janus, T. J., Logothetis, C. J., et al.** (2003). Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res* 9, 2587-2597.
- Fladmark, K. E., Gjertsen, B. T., Molven, A., Mellgren, G., Vintermyr, O. K., and Doskeland, S. O.** (1997). Gap junctions and growth control in liver regeneration and in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 25, 847-855.
- Foote, C. I., Zhou, L., Zhu, X., and Nicholson, B. J.** (1998). The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J Cell Biol* 140, 1187-1197.
- Foster, J. R.** (1997). The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis. *J Comp Pathol* 116, 113-144.
- Foulds, L.** (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339.
- Fournier, G., Valeri, A., Mangin, P., and Cussenot, O.** (2004). [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol (Paris)* 38, 187-206.
- Fournier, P. G., Chirgwin, J. M., and Guise, T. A.** (2006). New insights into the role of T cells in the vicious cycle of bone metastases. *Curr Opin Rheumatol* 18, 396-404.
- Fowler, J. E., Jr., Lau, J. L., Ghosh, L., Mills, S. E., and Mounzer, A.** (1988). Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol* 139, 857-861.
- Frendo, J. L., Cronier, L., Bertin, G., Guibourdenche, J., Vidaud, M., Evain-Brion, D., and Malassine, A.** (2003). Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci* 116, 3413-3421.
- Friedl, P., and Wolf, K.** (2008). Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68, 7247-7249.
- Fry, T., Evans, J. H., and Sanderson, M. J.** (2001). Propagation of intercellular calcium waves in C6 glioma cells transfected with connexins 43 or 32. *Microsc Res Tech* 52, 289-300.

- Fujimoto, E., Satoh, H., Negishi, E., Ueno, K., Nagashima, Y., Hagiwara, K., Yamasaki, H., and Yano, T.** (2004). Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: possible involvement of Her-2. *Mol Carcinog* 40, 135-142.
- Fukunaga-Kalabis, M., Martinez, G., Telson, S. M., Liu, Z. J., Balint, K., Juhasz, I., Elder, D. E., Perbal, B., and Herlyn, M.** (2008). Downregulation of CCN3 expression as a potential mechanism for melanoma progression. *Oncogene* 27, 2552-2560.
- Fukushima, M., Hattori, Y., Yoshizawa, T., and Maitani, Y.** (2007). Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *Int J Oncol* 30, 225-231.
- Furshpan, E. J., and Potter, D.D** (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol*, 289-325.
- Fushiki, S., Perez Velazquez, J. L., Zhang, L., Bechberger, J. F., Carlen, P. L., and Naus, C. C.** (2003). Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 304-314.
- Gabriels, J. E., and Paul, D. L.** (1998). Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res* 83, 636-643.
- Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y., and Ellisman, M. H.** (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Gamer, L. W., Cox, K., Carlo, J. M., and Rosen, V.** (2009). Overexpression of BMP3 in the developing skeleton alters endochondral bone formation resulting in spontaneous rib fractures. *Dev Dyn* 238, 2374-2381.
- Garcia, T., Jackson, A., Bachelier, R., Clement-Lacroix, P., Baron, R., Clezardin, P., and Pujuguet, P.** (2008). A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25, 33-42.
- Gardner, T. A., Lee, S. J., Lee, S. D., Li, X., Shirakawa, T., Kwon, D. D., Park, R. Y., Ahn, K. Y., and Jung, C.** (2009). Differential expression of osteocalcin during the metastatic progression of prostate cancer. *Oncol Rep* 21, 903-908.
- Garnero, P., Buchs, N., Zekri, J., Rizzoli, R., Coleman, R. E., and Delmas, P. D.** (2000). Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer. *Br J Cancer* 82, 858-864.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyann, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B.** (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280, 33132-33140.

- Geimonen, E., Jiang, W., Ali, M., Fishman, G. I., Garfield, R. E., and Andersen, J.** (1996). Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* *271*, 23667-23674.
- Gellhaus, A., Wotzlaw, C., Otto, T., Fandrey, J., and Winterhager, E.** (2010). More insights into the CCN3/Connexin43 interaction complex and its role for signaling. *J Cell Biochem* *110*, 129-140.
- Gemel, J., Valiunas, V., Brink, P. R., and Beyer, E. C.** (2004). Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. *J Cell Sci* *117*, 2469-2480.
- Geneau, G., Defamie, N., Mesnil, M., and Cronier, L.** (2007). Endothelin1-induced Ca(2+) mobilization is altered in calvarial osteoblastic cells of Cx43(+/-) mice. *J Membr Biol* *217*, 71-81.
- Geneau, G., Lamiche, C., Niger, C., Strale, P. O., Clarhaut, J., Defamie, N., Debais, F., Mesnil, M., and Cronier, L.** (2010). Effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexin43: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43+/- and Cx43+/+ mice. *Cell Tissue Res* *340*, 103-115.
- Gerido, D. A., and White, T. W.** (2004). Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim Biophys Acta* *1662*, 159-170.
- Giepmans, B. N., Hengeveld, T., Postma, F. R., and Moolenaar, W. H.** (2001a). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* *276*, 8544-8549.
- Giepmans, B. N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M., and Moolenaar, W. H.** (2001b). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* *11*, 1364-1368.
- Giepmans, B. N., Verlaan, I., and Moolenaar, W. H.** (2001c). Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes* *8*, 219-223.
- Gilleron, J., Carette, D., Durand, P., Pointis, G., and Segretain, D.** (2009). Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 1381-1390.
- Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Morton, R. A., Boyce, B. F., DeMayo, F. J., Finegold, M. J., Angelopoulou, R., Rosen, J. M., and Greenberg, N. M.** (1996). Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res* *56*, 4096-4102.
- Goel, H. L., Moro, L., Murphy-Ullrich, J. E., Hsieh, C. C., Wu, C. L., Jiang, Z., and Languino, L. R.** (2009). Beta1 integrin cytoplasmic variants differentially regulate expression of the antiangiogenic extracellular matrix protein thrombospondin 1. *Cancer Res* *69*, 5374-5382.
- Goldberg, G. S., Moreno, A. P., and Lampe, P. D.** (2002). Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* *277*, 36725-36730.

**Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N. M., Horwitz, J., and Gilula, N. B.** (1997). Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* *91*, 833-843.

**Goodenough, D. A.** (1992). The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin Cell Biol* *3*, 49-58.

**Goodenough, D. A., and Paul, D. L.** (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a002576.

**Goodenough, D. A., Paul, D. L., and Jesaitis, L.** (1988). Topological distribution of two connexin32 antigenic sites in intact and split rodent hepatocyte gap junctions. *J Cell Biol* *107*, 1817-1824.

**Govindarajan, R., Chakraborty, S., Johnson, K. E., Falk, M. M., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Mehta, P. P.** (2010). Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells. *Mol Biol Cell* *21*, 4089-4107.

**Govindarajan, R., Zhao, S., Song, X. H., Guo, R. J., Wheelock, M., Johnson, K. R., and Mehta, P. P.** (2002). Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha-catenin. *J Biol Chem* *277*, 50087-50097.

**Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., and Wagner, E. F.** (1995). Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet* *11*, 436-441.

**Guerrier, A., Fonlupt, P., Morand, I., Rabilloud, R., Audebet, C., Krutovskikh, V., Gros, D., Rousset, B., and Munari-Silem, Y.** (1995). Gap junctions and cell polarity: connexin32 and connexin43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain. *J Cell Sci* *108 (Pt 7)*, 2609-2617.

**Guillotin, B., Bourget, C., Remy-Zolghadri, M., Bareille, R., Fernandez, P., Conrad, V., and Amedee-Vilamitjana, J.** (2004). Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* *14*, 325-332.

**Guise, T. A., Yin, J. J., and Mohammad, K. S.** (2003). Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* *97*, 779-784.

**Gupta, N., Wang, H., McLeod, T. L., Naus, C. C., Kyurkchiev, S., Advani, S., Yu, J., Perbal, B., and Weichselbaum, R. R.** (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol* *54*, 293-299.

**Gustavsson, H., Wang, W., Jennbacken, K., Welen, K., and Damber, J. E.** (2009). ADAMTS1, a putative anti-angiogenic factor, is decreased in human prostate cancer. *BJU Int* *104*, 1786-1790.

**Habermann, H., Ray, V., Habermann, W., and Prins, G. S.** (2002). Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* *167*, 655-660.

**Halestrap, A. P.** (2006). Mitochondria and preconditioning: a connexin connection? *Circ Res* *99*, 10-12.

- Hall, C. L., Bafico, A., Dai, J., Aaronson, S. A., and Keller, E. T.** (2005). Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 65, 7554-7560.
- Hall, J., and Angele, S.** (1999). Radiation, DNA damage and cancer. *Mol Med Today* 5, 157-164.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harada, S., and Rodan, G. A.** (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355.
- Harris, A. L.** (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34, 325-472.
- Harris, R. J., and Symon, L.** (1984). Extracellular pH, potassium, and calcium activities in progressive ischaemia of rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 178-186.
- Hasan, N. M., Adams, G. E., and Joiner, M. C.** (1999). Effect of serum starvation on expression and phosphorylation of PKC-alpha and p53 in V79 cells: implications for cell death. *Int J Cancer* 80, 400-405.
- Helenius, M. A., Savinainen, K. J., Bova, G. S., and Visakorpi, T.** (2006). Amplification of the urokinase gene and the sensitivity of prostate cancer cells to urokinase inhibitors. *BJU Int* 97, 404-409.
- Henry, M. D., Cohen, M. B., and Campbell, K. P.** (2001). Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum Pathol* 32, 791-795.
- Herrero-Gonzalez, S., Gangoso, E., Giaume, C., Naus, C. C., Medina, J. M., and Tabernero, A.** (2010). Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* 29, 5712-5723.
- Hibbs, M. L., Quilici, C., Kountouri, N., Seymour, J. F., Armes, J. E., Burgess, A. W., and Dunn, A. R.** (2007). Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *J Immunol* 178, 6435-6443.
- Hoang, Q. V., Qian, H., and Ripps, H.** (2010). Functional analysis of hemichannels and gap-junctional channels formed by connexins 43 and 46. *Mol Vis* 16, 1343-1352.
- Hober, R.** (1936). The permeability of red blood corpuscles to organic anions. *J Cell Comp Physiol*, 367-391.
- Hobisch, A., Eder, I. E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H., and Culig, Z.** (1998). Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 58, 4640-4645.

**Hoppman, N., McLenithan, J. C., McBride, D. J., Shen, H., Bruder, J., Bauer, R. L., Shaffer, J. R., Liu, J., Streeten, E. A., Shuldiner, A. R., et al.** (2010). A common variant in fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1) is associated with bone mineral density and influences gene expression in vitro. *Bone* 47, 272-280.

**Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., and Murphy, G. P.** (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43, 1809-1818.

**Houghton, F. D.** (2005). Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction* 129, 129-135.

**Hsiao, A. Y., Torisawa, Y. S., Tung, Y. C., Sud, S., Taichman, R. S., Pienta, K. J., and Takayama, S.** (2009). Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 30, 3020-3027.

**Huang, C. F., Lira, C., Chu, K., Bilen, M. A., Lee, Y. C., Ye, X., Kim, S. M., Ortiz, A., Wu, F. L., Logothetis, C. J., et al.** (2010). Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70, 4580-4589.

**Huang, G. Y., Cooper, E. S., Waldo, K., Kirby, M. L., Gilula, N. B., and Lo, C. W.** (1998a). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol* 143, 1725-1734.

**Huang, R., Liu, Y. G., Lin, Y., Fan, Y., Boynton, A., Yang, D., and Huang, R. P.** (2001). Enhanced apoptosis under low serum conditions in human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). *Mol Carcinog* 32, 128-138.

**Huang, R. P., Fan, Y., Hossain, M. Z., Peng, A., Zeng, Z. L., and Boynton, A. L.** (1998b). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58, 5089-5096.

**Huang, W. C., Havel, J. J., Zhau, H. E., Qian, W. P., Lue, H. W., Chu, C. Y., Nomura, T., and Chung, L. W.** (2008). Beta2-microglobulin signaling blockade inhibited androgen receptor axis and caused apoptosis in human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 14, 5341-5347.

**Huang, W. C., Wu, D., Xie, Z., Zhau, H. E., Nomura, T., Zayzafoon, M., Pohl, J., Hsieh, C. L., Weitzmann, M. N., Farach-Carson, M. C., and Chung, L. W.** (2006). beta2-microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 66, 9108-9116.

**Huang, W. C., Xie, Z., Konaka, H., Sodek, J., Zhau, H. E., and Chung, L. W.** (2005). Human osteocalcin and bone sialoprotein mediating osteomimicry of prostate cancer cells: role of cAMP-dependent protein kinase A signaling pathway. *Cancer Res* 65, 2303-2313.

**Huggins, C., and Clark, P. J.** (1940). Quantitative Studies of Prostatic Secretion : li. the Effect of Castration and of Estrogen Injection on the Normal and on the Hyperplastic Prostate Glands of Dogs. *J Exp Med* 72, 747-762.

- Hunter, A. W., Barker, R. J., Zhu, C., and Gourdie, R. G.** (2005). Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* *16*, 5686-5698.
- Huynh, H. T., Alpert, L., Laird, D. W., Batist, G., Chalifour, L., and Alaoui-Jamali, M. A.** (2001). Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. *J Mol Endocrinol* *26*, 1-10.
- Ibrahim, T., Flamini, E., Mercatali, L., Sacanna, E., Serra, P., and Amadori, D.** (2010). Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer* *116*, 1406-1418.
- Ide, H., Yoshida, T., Matsumoto, N., Aoki, K., Osada, Y., Sugimura, T., and Terada, M.** (1997). Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res* *57*, 5022-5027.
- Ihara, H., Denhardt, D. T., Furuya, K., Yamashita, T., Muguruma, Y., Tsuji, K., Hruska, K. A., Higashio, K., Enomoto, S., Nifuji, A., et al.** (2001). Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem* *276*, 13065-13071.
- Ilina, O., and Friedl, P.** (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* *122*, 3203-3208.
- Ilvesaro, J., Tavi, P., and Tuukkanen, J.** (2001). Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord* *2*, 10.
- Ilvesaro, J., Vaananen, K., and Tuukkanen, J.** (2000). Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res* *15*, 919-926.
- Inoshita, A., Iizuka, T., Okamura, H. O., Minekawa, A., Kojima, K., Furukawa, M., Kusunoki, T., and Ikeda, K.** (2008). Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative Gjb2 transgenic mice. *Neuroscience* *156*, 1039-1047.
- Inoue, H., Nishimura, K., Oka, D., Nakai, Y., Shiba, M., Tokizane, T., Arai, Y., Nakayama, M., Shimizu, K., Takaha, N., et al.** (2005). Prostate cancer mediates osteoclastogenesis through two different pathways. *Cancer Lett* *223*, 121-128.
- Ishikawa, M., Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Fukumoto, S., and Yamada, Y.** (2011). Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol* *193*, 1257-1274.
- Ito, A., Katoh, F., Kataoka, T. R., Okada, M., Tsubota, N., Asada, H., Yoshikawa, K., Maeda, S., Kitamura, Y., Yamasaki, H., and Nojima, H.** (2000). A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J Clin Invest* *105*, 1189-1197.
- Ito, A., Koma, Y., Uchino, K., Okada, T., Ohbayashi, C., Tsubota, N., and Okada, M.** (2006). Increased expression of connexin 26 in the invasive component of lung squamous cell carcinoma: significant correlation with poor prognosis. *Cancer Lett* *234*, 239-248.

- Ito, A., Morita, N., Miura, D., Koma, Y., Kataoka, T. R., Yamasaki, H., Kitamura, Y., Kita, Y., and Nojima, H.** (2004). A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. *Carcinogenesis* 25, 2015-2022.
- Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Ishikawa, M., de Vega, S., Fukumoto, S., and Yamada, Y.** (2010). Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 285, 18948-18958.
- Iwasaki, R., Ninomiya, K., Miyamoto, K., Suzuki, T., Sato, Y., Kawana, H., Nakagawa, T., Suda, T., and Miyamoto, T.** (2008). Cell fusion in osteoclasts plays a critical role in controlling bone mass and osteoblastic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 899-904.
- Iyengar, P., Combs, T. P., Shah, S. J., Gouon-Evans, V., Pollard, J. W., Albanese, C., Flanagan, L., Tenniswood, M. P., Guha, C., Lisanti, M. P., et al.** (2003). Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22, 6408-6423.
- Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., and Kleinman, H. K.** (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 59, 4453-4457.
- Jacobs, S. C., Story, M. T., Sasse, J., and Lawson, R. K.** (1988). Characterization of growth factors derived from the rat ventral prostate. *J Urol* 139, 1106-1110.
- Jee, H., Nam, K. T., Kwon, H. J., Han, S. U., and Kim, D. Y.** (2011). Altered expression and localization of connexin32 in human and murine gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 56, 1323-1332.
- Johansen, D., Cruciani, V., Sundset, R., Ytrehus, K., and Mikalsen, S. O.** (2011). Ischemia Induces Closure of Gap Junctional Channels and Opening of Hemichannels in Heart-derived Cells and Tissue. *Cell Physiol Biochem* 28, 103-114.
- John, A. S., Rothman, V. L., and Tuszyński, G. P.** (2010). Thrombospondin-1 (TSP-1) Stimulates Expression of Integrin alpha6 in Human Breast Carcinoma Cells: A Downstream Modulator of TSP-1-Induced Cellular Adhesion. *J Oncol* 2010, 645376.
- John, S. A., and Revel, J. P.** (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 1312-1318.
- Johnson, M. L., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Bilski, J. J., and Grazul-Bilska, A. T.** (2002). Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 18, 261-270.
- Jongen, W. M., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M., and Yamasaki, H.** (1991). Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca<sup>2+</sup> in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 114, 545-555.

**Jordan, K., Chodock, R., Hand, A. R., and Laird, D. W.** (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci* *114*, 763-773.

**Jorgensen, N. R., Geist, S. T., Civitelli, R., and Steinberg, T. H.** (1997). ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol* *139*, 497-506.

**Jorgensen, N. R., Henriksen, Z., Brot, C., Eriksen, E. F., Sorensen, O. H., Civitelli, R., and Steinberg, T. H.** (2000). Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms. *J Bone Miner Res* *15*, 1024-1032.

**Jorgensen, N. R., Teilmann, S. C., Henriksen, Z., Civitelli, R., Sorensen, O. H., and Steinberg, T. H.** (2003). Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Biol Chem* *278*, 4082-4086.

**Josson, S., Nomura, T., Lin, J. T., Huang, W. C., Wu, D., Zhau, H. E., Zayzafoon, M., Weizmann, M. N., Gururajan, M., and Chung, L. W.** (2011). beta2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res* *71*, 2600-2610.

**Jung, K., Lein, M., Stephan, C., Von Hosslin, K., Semjonow, A., Sinha, P., Loening, S. A., and Schnorr, D.** (2004). Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int J Cancer* *111*, 783-791.

**Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., and Destaing, O.** (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* *85*, 195-202.

**Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., and Jones, L. W.** (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* *17*, 16-23.

**Kamei, J., Toyofuku, T., and 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*, 380-387.

**Kanady, J. D., Dellinger, M. T., Munger, S. J., Witte, M. H., and Simon, A. M.** (2011). Connexin37 and Connexin43 deficiencies in mice disrupt lymphatic valve development and result in lymphatic disorders including lymphedema and chylothorax. *Dev Biol* *354*, 253-266.

**Kanczuga-Koda, L., Sulkowski, S., Lenczewski, A., Koda, M., Wincewicz, A., Baltaziak, M., and Sulkowska, M.** (2006). Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol* *59*, 429-433.

**Kapoor, P., Saunders, M. M., Li, Z., Zhou, Z., Sheaffer, N., Kunze, E. L., Samant, R. S., Welch, D. R., and Donahue, H. J.** (2004). Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int J Cancer* *111*, 693-697.

**Karrison, T. G., Ferguson, D. J., and Meier, P.** (1999). Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* *91*, 80-85.

**Kausalya, P. J., Reichert, M., and Hunziker, W.** (2001). Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett* *505*, 92-96.

**Kawaguchi, J., Azuma, Y., Hoshi, K., Kii, I., Takeshita, S., Ohta, T., Ozawa, H., Takeichi, M., Chisaka, O., and Kudo, A.** (2001a). Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses. *J Bone Miner Res* *16*, 1265-1271.

**Kawaguchi, J., Kii, I., Sugiyama, Y., Takeshita, S., and Kudo, A.** (2001b). The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. *J Bone Miner Res* *16*, 260-269.

**Kawano, Y., and Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* *116*, 2627-2634.

**Kearns, A. E., Khosla, S., and Kostenuik, P. J.** (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* *29*, 155-192.

**Keller, E. T.** (2002). The role of osteoclastic activity in prostate cancer skeletal metastases. *Drugs Today (Barc)* *38*, 91-102.

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

**Kienitz, M. C., Bender, K., Dermietzel, R., Pott, L., and Zoidl, G.** (2011). Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *J Biol Chem* *286*, 290-298.

**Kikuchi, T., Adams, J. C., Miyabe, Y., So, E., and Kobayashi, T.** (2000). Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* *33*, 51-56.

**Killian, C. S., Corral, D. A., Kawinski, E., and Constantine, R. I.** (1993). Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Commun* *192*, 940-947.

**Kim, C. H., Takai, E., Zhou, H., von Stechow, D., Muller, R., Dempster, D. W., and Guo, X. E.** (2003). Trabecular bone response to mechanical and parathyroid hormone stimulation: the role of mechanical microenvironment. *J Bone Miner Res* *18*, 2116-2125.

**Kim, D. Y., Kam, Y., Koo, S. K., and Joe, C. O.** (1999). Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Biol Chem* *274*, 5581-5587.

**King, T. J., and Bertram, J. S.** (2005). Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* *1719*, 146-160.

**Koch, H., Jadowiec, J. A., and Campbell, P. G.** (2005). Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* *14*, 621-631.

- Koffler, L., Roshong, S., Kyu Park, I., Cesen-Cummings, K., Thompson, D. C., Dwyer-Nield, L. D., Rice, P., Mamay, C., Malkinson, A. M., and Ruch, R. J.** (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, 347-354.
- Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., and Takayanagi, H.** (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11, 880-885.
- Kojima, T., Kokai, Y., Chiba, H., Yamamoto, M., Mochizuki, Y., and Sawada, N.** (2001). Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 263, 193-201.
- Kondo, R. P., Wang, S. Y., John, S. A., Weiss, J. N., and Goldhaber, J. I.** (2000). Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32, 1859-1872.
- Kothmann, W. W., Li, X., Burr, G. S., and O'Brien, J.** (2007). Connexin 35/36 is phosphorylated at regulatory sites in the retina. *Vis Neurosci* 24, 363-375.
- Koval, M., Harley, J. E., Hick, E., and Steinberg, T. H.** (1997). Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol* 137, 847-857.
- Kruger, O., Plum, A., Kim, J. S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W. H., and Willecke, K.** (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127, 4179-4193.
- Krutovskikh, V., and Yamasaki, H.** (2000). Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res* 462, 197-207.
- Krutovskikh, V. A., Mesnil, M., Mazzoleni, G., and Yamasaki, H.** (1995). Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *Lab Invest* 72, 571-577.
- Krutovskikh, V. A., Troyanovsky, S. M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M., and Yamasaki, H.** (2000). Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19, 505-513.
- Kudo, T., Kure, S., Ikeda, K., Xia, A. P., Katori, Y., Suzuki, M., Kojima, K., Ichinohe, A., Suzuki, Y., Aoki, Y., et al.** (2003). Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 12, 995-1004.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y.** (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127, 3501-3512.
- Kumar, N. M., and Gilula, N. B.** (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol* 103, 767-776.

**Kumar, N. M., and Gilula, N. B.** (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

**Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y., and Roodman, G. D.** (1990). IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 144, 4226-4230.

**Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W. H., Kamada, N., and et al.** (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368, 703-710.

**Kusy, S., Nasarre, P., Chan, D., Potiron, V., Meyronet, D., Gemmill, R. M., Constantin, B., Drabkin, H. A., and Roche, J.** (2005). Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia* 7, 457-465.

**Kyprianou, N., English, H. F., and Isaacs, J. T.** (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 50, 3748-3753.

**Kyprianou, N., and Isaacs, J. T.** (1988). Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 123, 2124-2131.

**Lafleur, M. A., Hollenberg, M. D., Atkinson, S. J., Knauper, V., Murphy, G., and Edwards, D. R.** (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* 357, 107-115.

**LaGamba, D., Nawshad, A., and Hay, E. D.** (2005). Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn* 234, 132-142.

**Lai, C. P., Bechberger, J. F., Thompson, R. J., MacVicar, B. A., Bruzzone, R., and Naus, C. C.** (2007). Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res* 67, 1545-1554.

**Laing, J. G., and Beyer, E. C.** (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270, 26399-26403.

**Laird, D. W.** (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543.

**Laird, D. W., Puranam, K. L., and Revel, J. P.** (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273(Pt 1), 67-72.

**Lampe, P. D., and Lau, A. F.** (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215.

**Lampe, P. D., and Lau, A. F.** (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1171-1186.

**Landesman, Y., Postma, F. R., Goodenough, D. A., and Paul, D. L.** (2003). Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo. *J Cell Sci* *116*, 29-38.

**Lauf, U., Giepmans, B. N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., and Falk, M. M.** (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10446-10451.

**Le Gall, C., Bellahcene, A., Bonnelye, E., Gasser, J. A., Castronovo, V., Green, J., Zimmermann, J., and Clezardin, P.** (2007). A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res* *67*, 9894-9902.

**Lecanda, F., Towler, D. A., Ziambaras, K., Cheng, S. L., Koval, M., Steinberg, T. H., and Civitelli, R.** (1998). Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* *9*, 2249-2258.

**Lecanda, F., Warlow, P. M., Sheikh, S., Furlan, F., Steinberg, T. H., and Civitelli, R.** (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* *151*, 931-944.

**Lee, H. J., and Rhee, S. K.** (2011). Growth-suppressing activity of the transfected Cx26 on BICR-M1Rk breast cancer cell line. *J Microbiol Biotechnol* *21*, 477-482.

**Lee, Y., Schwarz, E., Davies, M., Jo, M., Gates, J., Wu, J., Zhang, X., and Lieberman, J. R.** (2003). Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *J Orthop Res* *21*, 62-72.

**Lee, Y. C., Cheng, C. J., Huang, M., Bilen, M. A., Ye, X., Navone, N. M., Chu, K., Kao, H. H., Yu-Lee, L. Y., Wang, Z., and Lin, S. H.** (2010). Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. *J Pathol* *221*, 68-76.

**Lehr, J. E., and Pienta, K. J.** (1998). Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst* *90*, 118-123.

**Lein, M., Nowak, L., Jung, K., Koenig, F., Schnorr, D., and Loening, S. A.** (1998). [Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma]. *Urologe A* *37*, 377-381.

**Leithe, E., and Rivedal, E.** (2004). Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem* *279*, 50089-50096.

**Leung, K. C., Johannsson, G., Leong, G. M., and Ho, K. K.** (2004). Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr Rev* *25*, 693-721.

**Levin, M.** (2005). Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech Dev* *122*, 3-25.

- Levin, V. A., Panchabhai, S. C., Shen, L., Kornblau, S. M., Qiu, Y., and Baggerly, K. A.** (2010). Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res* 9, 179-191.
- Li, H., Liu, T. F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D., and Johnson, R. G.** (1996). Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol* 134, 1019-1030.
- Li, Q., Omori, Y., Nishikawa, Y., Yoshioka, T., Yamamoto, Y., and Enomoto, K.** (2007). Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 121, 536-546.
- Li, S., Guan, J. L., and Chien, S.** (2005). Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng* 7, 105-150.
- Li, Y., Sikes, R. A., Malaeb, B. S., Yeung, F., Law, A., Graham, S. E., Pei, M., Kao, C., Nelson, J., Koeneman, K. S., and Chung, L. W.** (2010). Osteoblasts can stimulate prostate cancer growth and transcriptionally down-regulate PSA expression in cell line models. *Urol Oncol*.
- Li, Z., Zhou, Z., and Donahue, H. J.** (2008a). Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 25, 265-272.
- Li, Z., Zhou, Z., Welch, D. R., and Donahue, H. J.** (2008b). Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs. *Clin Exp Metastasis* 25, 893-901.
- Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Hassan, M. Q., Gaur, T., Lengner, C. J., and Young, D. W.** (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 1-16.
- Lim, P. K., Bliss, S. A., Patel, S. A., Taborga, M., Dave, M. A., Gregory, L. A., Greco, S. J., Bryan, M., Patel, P. S., and Rameshwar, P.** (2011). Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res* 71, 1550-1560.
- Lin, J. H., Takano, T., Cotrina, M. L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., et al.** (2002). Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 22, 4302-4311.
- Linkhart, T. A., and Mohan, S.** (1989). Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. *Endocrinology* 125, 1484-1491.
- Liu, C. L., Huang, Y. S., Hosokawa, M., Miyashita, K., and Hu, M. L.** (2009). Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chem Biol Interact* 182, 165-172.
- Liu, J., Ek Vitorin, J. F., Weintraub, S. T., Gu, S., Shi, Q., Burt, J. M., and Jiang, J. X.** (2011). Phosphorylation of connexin 50 by protein kinase A enhances gap junction and hemichannel function. *J Biol Chem* 286, 16914-16928.

**Liu, S., Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M. L., and Jalife, J.** (1993). A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys J* 64, 1422-1433.

**Lo, C. W., Cohen, M. F., Huang, G. Y., Lazatin, B. O., Patel, N., Sullivan, R., Pauken, C., and Park, S. M.** (1997). Cx43 gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev Genet* 20, 119-132.

**Lo, C. W., and Gilula, N. B.** (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18, 399-409.

**Loddenkemper, T., Grote, K., Evers, S., Oelerich, M., and Stogbauer, F.** (2002). Neurological manifestations of the oculodentodigital dysplasia syndrome. *J Neurol* 249, 584-595.

**Loewenstein, W. R.** (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 829-913.

**Loewenstein, W. R., and Kanno, Y.** (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209, 1248-1249.

**Loewenstein, W. R., Socolar, S. J., Higashino, S., Kanno, Y., and Davidson, N.** (1965). Intercellular Communication: Renal, Urinary Bladder, Sensory, and Salivary Gland Cells. *Science* 149, 295-298.

**Logothetis, C. J., and Lin, S. H.** (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5, 21-28.

**Loo, L. W., Berestecky, J. M., Kanemitsu, M. Y., and Lau, A. F.** (1995). pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J Biol Chem* 270, 12751-12761.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

**Mac Gabhann, F., and Popel, A. S.** (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 15, 715-738.

**Machwate, M., Jullienne, A., Moukhtar, M., and Marie, P. J.** (1995). Temporal variation of c-Fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing rat bone. *J Cell Biochem* 57, 62-70.

**Maestrini, E., Korge, B. P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P. M., Hovnanian, A., Monaco, A. P., and Munro, C. S.** (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 8, 1237-1243.

**Majeska, R. J., and Rodan, G. A.** (1982). The effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 257, 3362-3365.

**Mak, I. W., Seidlitz, E. P., Cowan, R. W., Turcotte, R. E., Popovic, S., Wu, W. C., Singh, G., and Ghert, M.** (2010). Evidence for the role of matrix metalloproteinase-13 in bone resorption by giant cell tumor of bone. *Hum Pathol* *41*, 1320-1329.

**Manolagas, S. C.** (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* *21*, 115-137.

**Marie, P.** (2001a). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *medecine/sciences* *17*, 1252-1259.

**Marie, P. J.** (2001b). The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. *Am J Pharmacogenomics* *1*, 175-187.

**Marquart, K. H.** (1977). So-called annular gap junctions in bone cells of normal mice. *Experientia* *33*, 270-272.

**Massas, R., and Benayahu, D.** (1998). Parathyroid hormone effect on cell-to-cell communication in stromal and osteoblastic cells. *J Cell Biochem* *69*, 81-86.

**Matsumura, K., Mayama, T., Lin, H., Sakamoto, Y., Ogawa, K., and Imanaga, I.** (2006). Effects of cyclic AMP on the function of the cardiac gap junction during hypoxia. *Exp Clin Cardiol* *11*, 286-293.

**Maurin, A. C., Chavassieux, P. M., Frappart, L., Delmas, P. D., Serre, C. M., and Meunier, P. J.** (2000). Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* *26*, 485-489.

**Maus, U., Andereya, S., Schmidt, H., Zombory, G., Gravius, S., Ohnsorge, J. A., and Niedhart, C.** (2008). [Therapy effects of testosterone on the recovery of bone defects]. *Z Orthop Unfall* *146*, 59-63.

**McCarthy, T. L., Centrella, M., and Canalis, E.** (1989). Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin-like growth factor I in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* *124*, 1247-1253.

**McLachlan, E., Shao, Q., and Laird, D. W.** (2007). Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol* *218*, 107-121.

**McLachlan, E., Shao, Q., Wang, H. L., Langlois, S., and Laird, D. W.** (2006). Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res* *66*, 9886-9894.

**Mege, R. M., Goudou, D., Giaume, C., Nicolet, M., and Rieger, F.** (1994). Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion? *Cell Adhes Commun* *2*, 329-343.

**Mehta, P. P., Perez-Stable, C., Nadji, M., Mian, M., Asotra, K., and Roos, B. A.** (1999). Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev Genet* *24*, 91-110.

- Mehta, P. P., Yamamoto, M., and Rose, B.** (1992). Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* 3, 839-850.
- Melnick, R. L., Huff, J., Barrett, J. C., Maronpot, R. R., Lucier, G., and Portier, C. J.** (1993). Cell proliferation and chemical carcinogenesis: a symposium overview. *Mol Carcinog* 7, 135-138.
- Mendes, O., Kim, H. T., Lungu, G., and Stoica, G.** (2007). MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clin Exp Metastasis* 24, 341-351.
- Mercer, R. R., Miyasaka, C., and Mastro, A. M.** (2004). Metastatic breast cancer cells suppress osteoblast adhesion and differentiation. *Clin Exp Metastasis* 21, 427-435.
- Mesnil, M., Piccoli, C., and Yamasaki, H.** (1993). An improved long-term culture of rat hepatocytes to detect liver tumour-promoting agents: results with phenobarbital. *Eur J Pharmacol* 248, 59-66.
- Meyer, R. A., Laird, D. W., Revel, J. P., and Johnson, R. G.** (1992). Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 119, 179-189.
- Milks, L. C., Kumar, N. M., Houghten, R., Unwin, N., and Gilula, N. B.** (1988). Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *Embo J* 7, 2967-2975.
- Mink, S. R., Hodge, A., Agus, D. B., Jain, A., and Gross, M. E.** (2010). Beta-2-microglobulin expression correlates with high-grade prostate cancer and specific defects in androgen signaling. *Prostate* 70, 1201-1210.
- Minkoff, R., Bales, E. S., Kerr, C. A., and Struss, W. E.** (1999). Antisense oligonucleotide blockade of connexin expression during embryonic bone formation: evidence of functional compensation within a multigene family. *Dev Genet* 24, 43-56.
- Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Agullo, E., Stahlhofen, S., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Jorge, I., Torre, I., Vazquez, J., Boengler, K., et al.** (2009). Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* 83, 747-756.
- Mitchell, J. A., and Lye, S. J.** (2001). Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun Adhes* 8, 299-302.
- Mizutani, K., Sud, S., and Pienta, K. J.** (2009). Prostate cancer promotes CD11b positive cells to differentiate into osteoclasts. *J Cell Biochem* 106, 563-569.
- Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., and French, F. S.** (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 440-448.
- Momiyama, M., Omori, Y., Ishizaki, Y., Nishikawa, Y., Tokairin, T., Ogawa, J., and Enomoto, K.** (2003). Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci* 94, 501-507.

**Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K.** (2000). Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 96, 917-924.

**Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J. D., and Hurley, M. M.** (2000). Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 105, 1085-1093.

**Montgomery, R. B., Mostaghel, E. A., Vessella, R., Hess, D. L., Kalthorn, T. F., Higano, C. S., True, L. D., and Nelson, P. S.** (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 68, 4447-4454.

**Montironi, R., Scattoni, V., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Bostwick, D. G., and Montorsi, F.** (2006). Atypical foci suspicious but not diagnostic of malignancy in prostate needle biopsies (also referred to as "atypical small acinar proliferation suspicious for but not diagnostic of malignancy"). *Eur Urol* 50, 666-674.

**Moorby, C., and Patel, M.** (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271, 238-248.

**Morgia, G., Falsaperla, M., Malaponte, G., Madonia, M., Indelicato, M., Travali, S., and Mazzarino, M. C.** (2005). Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 33, 44-50.

**Mori, H., Maki, M., Oishi, K., Jaye, M., Igarashi, K., Yoshida, O., and Hatanaka, M.** (1990). Increased expression of genes for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor type beta 2 in human benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 16, 71-80.

**Morley, G. E., Taffet, S. M., and Delmar, M.** (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys J* 70, 1294-1302.

**Morrissey, C., Lai, J. S., Brown, L. G., Wang, Y. C., Roudier, M. P., Coleman, I. M., Gulati, R., Vakar-Lopez, F., True, L. D., Corey, E., et al.** (2010). The expression of osteoclastogenesis-associated factors and osteoblast response to osteolytic prostate cancer cells. *Prostate* 70, 412-424.

**Mortensen, P., Gouw, J. W., Olsen, J. V., Ong, S. E., Rigbolt, K. T., Bunkenborg, J., Cox, J., Foster, L. J., Heck, A. J., Blagoev, B., et al.** (2010). MSQuant, an open source platform for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Proteome Res* 9, 393-403.

**Murray, S. A., Williams, S. Y., Dillard, C. Y., Narayanan, S. K., and McCauley, J.** (1997). Relationship of cytoskeletal filaments to annular gap junction expression in human adrenal cortical tumor cells in culture. *Exp Cell Res* 234, 398-404.

**Musil, L. S., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., and Goodenough, D. A.** (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 111, 2077-2088.

**Musil, L. S., and Goodenough, D. A.** (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74, 1065-1077.

- Nabha, S. M., dos Santos, E. B., Yamamoto, H. A., Belizi, A., Dong, Z., Meng, H., Saliganan, A., Sabbota, A., Bonfil, R. D., and Cher, M. L.** (2008). Bone marrow stromal cells enhance prostate cancer cell invasion through type I collagen in an MMP-12 dependent manner. *Int J Cancer* *122*, 2482-2490.
- Nagy, J. I., Li, W. E., Roy, C., Doble, B. W., Gilchrist, J. S., Kardami, E., and Hertzberg, E. L.** (1997). Selective monoclonal antibody recognition and cellular localization of an unphosphorylated form of connexin43. *Exp Cell Res* *236*, 127-136.
- Nakamura, H., Hiraga, T., Ninomiya, T., Hosoya, A., Fujisaki, N., Yoneda, T., and Ozawa, H.** (2008). Involvement of cell-cell and cell-matrix interactions in bone destruction induced by metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. *J Bone Miner Metab* *26*, 642-647.
- Nakao, Y., Koike, T., Ohta, Y., Manaka, T., Imai, Y., and Takaoka, K.** (2009). Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* *44*, 872-877.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B.** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17-29.
- Nambara, C., Kawasaki, Y., and Yamasaki, H.** (2007). Role of the cytoplasmic loop domain of Cx43 in its intracellular localization and function: possible interaction with cadherin. *J Membr Biol* *217*, 63-69.
- Naoi, Y., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Kim, S. J., Arai, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S.** (2007). Connexin26 expression is associated with lymphatic vessel invasion and poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *106*, 11-17.
- Nash, G. F., Turner, L. F., Scully, M. F., and Kakkar, A. K.** (2002). Platelets and cancer. *Lancet Oncol* *3*, 425-430.
- Nelles, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H. D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., et al.** (1996). Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9565-9570.
- Neve, A., Corrado, A., and Cantatore, F. P.** (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* *343*, 289-302.
- Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., and Revel, J. P.** (1987). Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* *329*, 732-734.
- Nielsen, P. A., Baruch, A., Shestopalov, V. I., Giepmans, B. N., Dunia, I., Benedetti, E. L., and Kumar, N. M.** (2003). Lens connexins alpha3Cx46 and alpha8Cx50 interact with zonula occludens protein-1 (ZO-1). *Mol Biol Cell* *14*, 2470-2481.
- Niger, C., Geneau, G., Fiorini, C., Defamie, N., Pointis, G., Mesnil, M., and Cronier, L.** (2008). Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation: influence of connexin-43 expression level. *J Cell Biochem* *103*, 110-122.

**Nordstrand, A., Nilsson, J., Tieva, A., Wikstrom, P., Lerner, U. H., and Widmark, A.** (2009). Establishment and validation of an in vitro co-culture model to study the interactions between bone and prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 26, 945-953.

**Olbina, G., and Eckhart, W.** (2003). Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol Cancer Res* 1, 690-700.

**Oliveira, R., Christov, C., Guillamo, J. S., de Bouard, S., Palfi, S., Venance, L., Tardy, M., and Peschanski, M.** (2005). Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* 6, 7.

**Oliver, M. H., Harrison, N. K., Bishop, J. E., Cole, P. J., and Laurent, G. J.** (1989). A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 92 ( Pt 3), 513-518.

**Omori, Y., Li, Q., Nishikawa, Y., Yoshioka, T., Yoshida, M., Nishimura, T., and Enomoto, K.** (2007). Pathological significance of intracytoplasmic connexin proteins: implication in tumor progression. *J Membr Biol* 218, 73-77.

**Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V., Naus, C. C., Giaume, C., and Saez, J. C.** (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem*.

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

**Pahujaa, M., Anikin, M., and Goldberg, G. S.** (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res* 313, 4083-4090.

**Palacios-Prado, N., Sonntag, S., Skeberdis, V. A., Willecke, K., and Bukauskas, F. F.** (2009). Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *J Physiol* 587, 3251-3269.

**Palacios, F., Tushir, J. S., Fujita, Y., and D'Souza-Schorey, C.** (2005). Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Mol Cell Biol* 25, 389-402.

**Palumbo, J. S., Talmage, K. E., Massari, J. V., La Jeunesse, C. M., Flick, M. J., Kombrinck, K. W., Jirouskova, M., and Degen, J. L.** (2005). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105, 178-185.

**Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., and Lukyanov, S.** (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10, R473-474.

**Parikka, V., Peng, Z., Hentunen, T., Risteli, J., Elo, T., Vaananen, H. K., and Harkonen, P.** (2005). Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor-alpha-deficient male and female mice. *Eur J Endocrinol* 152, 301-314.

- Paul, D. L.** (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol* 103, 123-134.
- Paznekas, W. A., Boyadjiev, S. A., Shapiro, R. E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C. E., Innis, J. W., Dinulos, M. B., Christian, C., Hannibal, M. C., and Jabs, E. W.** (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72, 408-418.
- Pedraza-Farina, L. G.** (2006). Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. *Yale J Biol Med* 79, 95-103.
- Penno, H., Nilsson, O., Brandstrom, H., Winqvist, O., and Ljunggren, O.** (2009). Expression of RANK-ligand in prostate cancer cell lines. *Scand J Clin Lab Invest* 69, 151-155.
- Penuela, S., Celetti, S. J., Bhalla, R., Shao, Q., and Laird, D. W.** (2008). Diverse subcellular distribution profiles of pannexin 1 and pannexin 3. *Cell Commun Adhes* 15, 133-142.
- Peracchia, C.** (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1662, 61-80.
- Peracchia, C., Wang, X., Li, L., and Peracchia, L. L.** (1996). Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 431, 379-387.
- Peracchia, C., Wang, X. G., and Peracchia, L. L.** (2000). Slow gating of gap junction channels and calmodulin. *J Membr Biol* 178, 55-70.
- Perez-Sayans, M., Somoza-Martin, J. M., Barros-Angueira, F., Rey, J. M., and Garcia-Garcia, A.** (2010). RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109, 679-686.
- Perkins, G. A., Goodenough, D. A., and Sosinsky, G. E.** (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277, 171-177.
- Petrocelli, T., and Lye, S. J.** (1993). Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133, 284-290.
- Pettaway, C. A., Pathak, S., Greene, G., Ramirez, E., Wilson, M. R., Killion, J. J., and Fidler, I. J.** (1996). Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2, 1627-1636.
- Phelan, P.** (2005). Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1711, 225-245.
- Phelan, P., Bacon, J. P., Davies, J. A., Stebbings, L. A., Todman, M. G., Avery, L., Baines, R. A., Barnes, T. M., Ford, C., Hekimi, S., et al.** (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14, 348-349.

- Phelan, P., and Starich, T. A.** (2001). Innexins get into the gap. *Bioessays* 23, 388-396.
- Pienta, K. J., and Bradley, D.** (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1665-1671.
- Pishvaian, M. J., Feltes, C. M., Thompson, P., Bussemakers, M. J., Schalken, J. A., and Byers, S. W.** (1999). Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res* 59, 947-952.
- Plante, I., Stewart, M. K., Barr, K., Allan, A. L., and Laird, D. W.** (2011). Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30, 1681-1692.
- Plotkin, L. I., Lezcano, V., Thostenson, J., Weinstein, R. S., Manolagas, S. C., and Bellido, T.** (2008). Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res* 23, 1712-1721.
- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., and Bellido, T.** (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 277, 8648-8657.
- Pollmann, M. A., Shao, Q., Laird, D. W., and Sandig, M.** (2005). Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res* 7, R522-534.
- Ponsoen, B., van Zeijl, L., Moolenaar, W. H., and Jalink, K.** (2007). Direct measurement of cyclic AMP diffusion and signaling through connexin43 gap junctional channels. *Exp Cell Res* 313, 415-423.
- Powell, G. J., Southby, J., Danks, J. A., Stillwell, R. G., Hayman, J. A., Henderson, M. A., Bennett, R. C., and Martin, T. J.** (1991). Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res* 51, 3059-3061.
- Prochazka, L., Turanek, J., Tesarik, R., Knotigova, P., Polaskova, P., Andrysik, Z., Kozubik, A., Zak, F., Sova, P., Neuzil, J., and Machala, M.** (2007). Apoptosis and inhibition of gap-junctional intercellular communication induced by LA-12, a novel hydrophobic platinum(IV) complex. *Arch Biochem Biophys* 462, 54-61.
- Proulx, A., Merrifield, P. A., and Naus, C. C.** (1997). Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression. *Dev Genet* 20, 133-144.
- Qin, H., Shao, Q., Curtis, H., Galipeau, J., Belliveau, D. J., Wang, T., Alaoui-Jamali, M. A., and Laird, D. W.** (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, 29132-29138.
- Qin, L., Li, X., Ko, J. K., and Partridge, N. C.** (2005). Parathyroid hormone uses multiple mechanisms to arrest the cell cycle progression of osteoblastic cells from G1 to S phase. *J Biol Chem* 280, 3104-3111.

- Rabbani, S. A., Desjardins, J., Bell, A. W., Banville, D., Mazar, A., Henkin, J., and Goltzman, D.** (1990). An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* *173*, 1058-1064.
- Rackauskas, M., Neverauskas, V., and Skeberdis, V. A.** (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)* *46*, 1-12.
- Radcliff, K., Tang, T. B., Lim, J., Zhang, Z., Abedin, M., Demer, L. L., and Tintut, Y.** (2005). Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ Res* *96*, 398-400.
- Rahman, S., Carlile, G., and Evans, W. H.** (1993). Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *J Biol Chem* *268*, 1260-1265.
- Ravenna, L., Sale, P., Di Vito, M., Russo, A., Salvatori, L., Tafani, M., Mari, E., Sentinelli, S., Petrangeli, E., Gallucci, M., et al.** (2009). Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. *Prostate* *69*, 1245-1255.
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M., and Rossant, J.** (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* *267*, 1831-1834.
- Retamal, M. A., Cortes, C. J., Reuss, L., Bennett, M. V., and Saez, J. C.** (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*, 4475-4480.
- Revel, J. P., and Karnovsky, M. J.** (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* *33*, C7-C12.
- Richard, G.** (2000). Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* *9*, 77-96.
- Richard, G.** (2005). Connexin disorders of the skin. *Clin Dermatol* *23*, 23-32.
- Ripps, H.** (2002). Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res* *74*, 327-336.
- Risek, B., and Gilula, N. B.** (1991). Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy. *Development* *113*, 165-181.
- Rizzo, S., Attard, G., and Hudson, D. L.** (2005). Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif* *38*, 363-374.
- Rochefort, G. Y., Pallu, S., and Benhamou, C. L.** (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* *21*, 1457-1469.

**Romanov, V. I., Whyard, T., Adler, H. L., Waltzer, W. C., and Zucker, S.** (2004). Prostate cancer cell adhesion to bone marrow endothelium: the role of prostate-specific antigen. *Cancer Res* *64*, 2083-2089.

**Rosen, C. J.** (2011). Diseases of bone mineral and metabolism (en ligne). *Chapter 11 : osteoporosis: epidemiology and pathogenesis*, Disponible sur: <http://www.endotext.org/parathyroid/index.htm>.

**Rosol, T. J.** (2000). Pathogenesis of bone metastases: role of tumor-related proteins. *J Bone Miner Res* *15*, 844-850.

**Saad, S., Gottlieb, D. J., Bradstock, K. F., Overall, C. M., and Bendall, L. J.** (2002). Cancer cell-associated fibronectin induces release of matrix metalloproteinase-2 from normal fibroblasts. *Cancer Res* *62*, 283-289.

**Saez, J. C., Martinez, A. D., Branes, M. C., and Gonzalez, H. E.** (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* *31*, 593-600.

**Saez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., and Bennett, M. V.** (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* *1711*, 215-224.

**Saez, J. C., Schalper, K. A., Retamal, M. A., Orellana, J. A., Shoji, K. F., and Bennett, M. V.** (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp Cell Res* *316*, 2377-2389.

**Saha, B., Arase, A., Imam, S. S., Tsao-Wei, D., Naritoku, W. Y., Groshen, S., Jones, L. W., and Imam, S. A.** (2008). Overexpression of E-cadherin and beta-catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *Prostate* *68*, 78-84.

**Saito-Katsuragi, M., Asada, H., Niizeki, H., Katoh, F., Masuzawa, M., Tsutsumi, M., Kuniyasu, H., Ito, A., Nojima, H., and Miyagawa, S.** (2007). Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* *110*, 1162-1172.

**Saladino, F., Carruba, G., Quader, S. T., Amoroso, M., Di Cristina, A., Webber, M. M., and Castagnetta, L. A.** (2002). Connexin expression in nonneoplastic human prostate epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* *963*, 213-217.

**Santini, D., Galluzzo, S., Zoccoli, A., Pantano, F., Fratto, M. E., Vincenzi, B., Lombardi, L., Gucciardino, C., Silvestris, N., Riva, E., et al.** (2010). New molecular targets in bone metastases. *Cancer Treat Rev* *36 Suppl 3*, S6-S10.

**Santos, M. I., Unger, R. E., Sousa, R. A., Reis, R. L., and Kirkpatrick, C. J.** (2009). Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* *30*, 4407-4415.

**Sasaki, T., and Garant, P. R.** (1986). Fate of annular gap junctions in the papillary cells of the enamel organ in the rat incisor. *Cell Tissue Res* *246*, 523-530.

- Saunders, M. M., You, J., Trosko, J. E., Yamasaki, H., Li, Z., Donahue, H. J., and Jacobs, C. R.** (2001). Gap junctions and fluid flow response in MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1917-1925.
- Saunders, M. M., You, J., Zhou, Z., Li, Z., Yellowley, C. E., Kunze, E. L., Jacobs, C. R., and Donahue, H. J.** (2003). Fluid flow-induced prostaglandin E2 response of osteoblastic ROS 17/2.8 cells is gap junction-mediated and independent of cytosolic calcium. *Bone* 32, 350-356.
- Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Retamal, M. A., Shoji, K. F., Martinez, A. D., and Saez, J. C.** (2008). Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses. *Mol Biol Cell* 19, 3501-3513.
- Schiller, P. C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A., and Howard, G. A.** (2001). Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone* 28, 38-44.
- Schiller, P. C., Mehta, P. P., Roos, B. A., and Howard, G. A.** (1992). Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 6, 1433-1440.
- Schoppmann, S. F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D.** (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161, 947-956.
- Schubert, A. L., Schubert, W., Spray, D. C., and Lisanti, M. P.** (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41, 5754-5764.
- Sequeira, L., Dubyk, C. W., Riesenberger, T. A., Cooper, C. R., and van Golen, K. L.** (2008). Rho GTPases in PC-3 prostate cancer cell morphology, invasion and tumor cell diapedesis. *Clin Exp Metastasis* 25, 569-579.
- Seul, K. H., Kang, K. Y., Lee, K. S., Kim, S. H., and Beyer, E. C.** (2004). Adenoviral delivery of human connexin37 induces endothelial cell death through apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 1144-1151.
- Sgambato, A., Camerini, A., Amoroso, D., Genovese, G., De Luca, F., Cecchi, M., Migaldi, M., Rettino, A., Valsuani, C., Tartarelli, G., et al.** (2007). Expression of dystroglycan correlates with tumor grade and predicts survival in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 6, 1840-1846.
- Shao, Q., Wang, H., McLachlan, E., Veitch, G. I., and Laird, D. W.** (2005). Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* 65, 2705-2711.
- Shariat, S. F., Shalev, M., Meneses-Diaz, A., Kim, I. Y., Kattan, M. W., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M.** (2001). Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 19, 2856-2864.
- Shay, J. W., and Wright, W. E.** (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 72-76.

**Sheridan, J. D.** (1966). Electrophysiological study of special connections between cells in the early chick embryo. *J Cell Biol* 31, C1-5.

**Shiirevnyamba, A., Takahashi, T., Shan, H., Ogawa, H., Yano, S., Kanayama, H., Izumi, K., and Uehara, H.** (2010). Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. *Br J Cancer* 104, 505-513.

**Siebers, M. C., ter Brugge, P. J., Walboomers, X. F., and Jansen, J. A.** (2005). Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 26, 137-146.

**Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G. E.** (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol* 67, 863-885.

**Simon, A. M., and Goodenough, D. A.** (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 8, 477-483.

**Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., et al.** (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.

**Sims, N. A., Jenkins, B. J., Nakamura, A., Quinn, J. M., Li, R., Gillespie, M. T., Ernst, M., Robb, L., and Martin, T. J.** (2005). Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 20, 1093-1102.

**Sin, W. C., Bechberger, J. F., Rushlow, W. J., and Naus, C. C.** (2008). Dose-dependent differential upregulation of CCN1/Cyr61 and CCN3/NOV by the gap junction protein Connexin43 in glioma cells. *J Cell Biochem* 103, 1772-1782.

**Sin, W. C., Tse, M., Planque, N., Perbal, B., Lampe, P. D., and Naus, C. C.** (2009). Matricellular protein CCN3 (NOV) regulates actin cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 284, 29935-29944.

**Singh, D., and Lampe, P. D.** (2003). Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun Adhes* 10, 215-220.

**Sohl, G., and Willecke, K.** (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10, 173-180.

**Sotkis, A., Wang, X. G., Yasumura, T., Peracchia, L. L., Persechini, A., Rash, J. E., and Peracchia, C.** (2001). Calmodulin colocalizes with connexins and plays a direct role in gap junction channel gating. *Cell Commun Adhes* 8, 277-281.

**Southby, J., Kissin, M. W., Danks, J. A., Hayman, J. A., Moseley, J. M., Henderson, M. A., Bennett, R. C., and Martin, T. J.** (1990). Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. *Cancer Res* 50, 7710-7716.

**Spencer, G. J., Utting, J. C., Etheridge, S. L., Arnett, T. R., and Genever, P. G.** (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* *119*, 1283-1296.

**Spray, D. C., Ye, Z. C., and Ransom, B. R.** (2006). Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* *54*, 758-773.

**St-Arnaud, R.** (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* *473*, 225-230.

**Stains, J. P., and Civitelli, R.** (2005). Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* *1719*, 69-81.

**Stanbrough, M., Buble, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G., and Balk, S. P.** (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* *66*, 2815-2825.

**Stanka, P.** (1975). Occurrence of cell junctions and microfilaments in osteoblasts. *Cell Tissue Res* *159*, 413-422.

**Stebbing, L. A., Todman, M. G., Phelan, P., Bacon, J. P., and Davies, J. A.** (2000). Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Mol Biol Cell* *11*, 2459-2470.

**Steinberg, T. H., Civitelli, R., Geist, S. T., Robertson, A. J., Hick, E., Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Warlow, P. M., Westphale, E. M., Laing, J. G., and et al.** (1994). Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *Embo J* *13*, 744-750.

**Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., and Charles, A. C.** (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* *277*, 10482-10488.

**Strale, P. O., Clarhaut, J., Lamiche, C., Cronier, L., Mesnil, M., and Defamie, N.** (2011). Down-regulation of connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion. *Mol Carcinog.*

**Sun, Y. X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N. I., Koh-Paige, A. J., Shim, H., et al.** (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res* *20*, 318-329.

**Suva, L. J., Washam, C., Nicholas, R. W., and Griffin, R. J.** (2011). Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol* *7*, 208-218.

**Swarthout, J. T., D'Alonzo, R. C., Selvamurugan, N., and Partridge, N. C.** (2002). Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* *282*, 1-17.

- Swayne, L. A., Sorbara, C. D., and Bennett, S. A.** (2010). Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. *J Biol Chem* 285, 24977-24986.
- Tamura, D., Hiraga, T., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Yoneda, T.** (2008). Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. *Int J Oncol* 33, 17-24.
- Tanaka, M., and Grossman, H. B.** (2004). Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 11, 537-541.
- Tang, B., Peng, Z. H., Yu, P. W., Yu, G., and Qian, F.** (2010). Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol* 28, 502-508.
- Tang, B., Peng, Z. H., Yu, P. W., Yu, G., and Qian, F.** (2011). Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol* 28, 502-508.
- Tate, A. W., Lung, T., Radhakrishnan, A., Lim, S. D., Lin, X., and Edlund, M.** (2006). Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *Prostate* 66, 19-31.
- Teitelbaum, S. L.** (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- Tekpli, X., Rivedal, E., Gorria, M., Landvik, N. E., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M. T., Baffet, G., Holme, J. A., and Lagadic-Gossmann, D.** (2010). The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 242, 231-240.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H. D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K.** (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol* 7, 713-716.
- TenBroek, E. M., Lampe, P. D., Solan, J. L., Reynhout, J. K., and Johnson, R. G.** (2001). Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J Cell Biol* 155, 1307-1318.
- Teunissen, B. E., Jansen, A. T., van Amersfoort, S. C., O'Brien, T. X., Jongasma, H. J., and Bierhuizen, M. F.** (2003). Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322, 123-136.
- Teunissen, B. E., van Amersfoort, S. C., Opthof, T., Jongasma, H. J., and Bierhuizen, M. F.** (2002). Sp1 and Sp3 activate the rat connexin40 proximal promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 71-78.
- Thomas, G. P., Baker, S. U., Eisman, J. A., and Gardiner, E. M.** (2001a). Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J Endocrinol* 170, 451-460.
- Thomas, T., Jordan, K., and Laird, D. W.** (2001b). Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions. *Cell Commun Adhes* 8, 231-236.

**Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J. D., Jr.** (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349, 2483-2494.

**Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., and van Dijk, J. M.** (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 515-547.

**Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G. J., Ruijter, E. T., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J., and Schalken, J. A.** (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60, 3650-3654.

**Torres, L. N., Matera, J. M., Vasconcellos, C. H., Avanzo, J. L., Hernandez-Blazquez, F. J., and Dagli, M. L.** (2005). Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. *Vet Pathol* 42, 633-641.

**Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., and Hori, M.** (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276, 1780-1788.

**Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Tada, M., and Hori, M.** (1999). Functional role of c-Src in gap junctions of the cardiomyopathic heart. *Circ Res* 85, 672-681.

**Tran, N. L., Nagle, R. B., Cress, A. E., and Heimark, R. L.** (1999). N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells. *Am J Pathol* 155, 787-798.

**Trexler, E. B., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V., Bargiello, T. A., and Verselis, V. K.** (1999). Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J Gen Physiol* 113, 721-742.

**Trudel, D., Fradet, Y., Meyer, F., Harel, F., and Tetu, B.** (2008). Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Hum Pathol* 39, 731-739.

**Tsai, H., Werber, J., Davia, M. O., Edelman, M., Tanaka, K. E., Melman, A., Christ, G. J., and Geliebter, J.** (1996). Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 64-69.

**Tsingotjidou, A. S., Ahluwalia, R., Zhang, X., Conrad, H., and Emmanouilides, C.** (2003). A metastatic human prostate cancer model using intraprostatic implantation of tumor produced by PC-3 neolacZ transfected cells. *Int J Oncol* 23, 1569-1574.

**Tsuji, K., Yamauchi, K., Yang, M., Jiang, P., Bouvet, M., Endo, H., Kanai, Y., Yamashita, K., Moossa, A. R., and Hoffman, R. M.** (2006). Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res* 66, 303-306.

- Tu, Z. J., Kollander, R., and Kiang, D. T.** (1998). Differential up-regulation of gap junction connexin 26 gene in mammary and uterine tissues: the role of Sp transcription factors. *Mol Endocrinol* *12*, 1931-1938.
- Tumminello, F. M., Badalamenti, G., Fulfaro, F., Incorvaia, L., Crescimanno, M., Flandina, C., Sepporta, M. V., and Leto, G.** Serum follistatin in patients with prostate cancer metastatic to the bone. *Clin Exp Metastasis* *27*, 549-555.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Debruyne, F. M., and Schalken, J. A.** (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* *54*, 3929-3933.
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., and Yeager, M.** (1997). Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution. *Nat Struct Biol* *4*, 39-43.
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., and Yeager, M.** (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* *283*, 1176-1180.
- Uyama, N., Shimahara, Y., Okuyama, H., Kawada, N., Kamo, S., Ikeda, K., and Yamaoka, Y.** (2003). Carbenoxolone inhibits DNA synthesis and collagen gene expression in rat hepatic stellate cells in culture. *J Hepatol* *39*, 749-755.
- Valeri, A., Drelon, E., Azzouzi, R., Delannoy, A., Teillac, P., Fournier, G., Mangin, P., Berthon, P., and Cussenot, O.** (1999). [Epidemiology of familial prostatic cancer: 4-year assessment of French studies]. *Prog Urol* *9*, 672-679.
- van den Beld, A. W., de Jong, F. H., Grobbee, D. E., Pols, H. A., and Lamberts, S. W.** (2000). Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* *85*, 3276-3282.
- Van Kempen, M. J., Vermeulen, J. L., Moorman, A. F., Gros, D., Paul, D. L., and Lamers, W. H.** (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc Res* *32*, 886-900.
- Vanhara, P., Lincova, E., Kozubik, A., Jurdic, P., Soucek, K., and Smarda, J.** (2009). Growth/differentiation factor-15 inhibits differentiation into osteoclasts--a novel factor involved in control of osteoclast differentiation. *Differentiation* *78*, 213-222.
- VanSlyke, J. K., Deschenes, S. M., and Musil, L. S.** (2000). Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol Biol Cell* *11*, 1933-1946.
- VanSlyke, J. K., and Musil, L. S.** (2005). Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol Biol Cell* *16*, 5247-5257.
- Veenstra, R. D.** (1996). Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* *28*, 327-337.

**Veenstra, R. D.** (2001). Determining ionic permeabilities of gap junction channels. *Methods Mol Biol* 154, 293-311.

**Venken, K., Schuit, F., Van Lommel, L., Tsukamoto, K., Kopchick, J. J., Coschigano, K., Ohlsson, C., Moverare, S., Boonen, S., Bouillon, R., and Vanderschueren, D.** (2005). Growth without growth hormone receptor: estradiol is a major growth hormone-independent regulator of hepatic IGF-I synthesis. *J Bone Miner Res* 20, 2138-2149.

**Villares, G. J., Dobroff, A. S., Wang, H., Zigler, M., Melnikova, V. O., Huang, L., and Bar-Eli, M.** (2009). Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. *Cancer Res* 69, 6730-6737.

**Villars, F., Guillotin, B., Amedee, T., Dutoya, S., Bordenave, L., Bareille, R., and Amedee, J.** (2002). Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C775-785.

**Vogelstein, B., and Kinzler, K. W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.

**Wade, M. H., Trosko, J. E., and Schindler, M.** (1986). A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* 232, 525-528.

**Waltregny, D., Bellahcene, A., de Leval, X., Florkin, B., Weidle, U., and Castronovo, V.** (2000). Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers. *J Bone Miner Res* 15, 834-843.

**Wang, G., Haile, S., Comuzzi, B., Tien, A. H., Wang, J., Yong, T. M., Jelescu-Bodos, A. E., Blaszczyk, N., Vessella, R. L., Masri, B. A., and Sadar, M. D.** (2009). Osteoblast-derived factors induce an expression signature that identifies prostate cancer metastasis and hormonal progression. *Cancer Res* 69, 3433-3442.

**Wang, H., Fu, W., Im, J. H., Zhou, Z., Santoro, S. A., Iyer, V., DiPersio, C. M., Yu, Q. C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., and Muschel, R. J.** (2004). Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J Cell Biol* 164, 935-941.

**Wang, L., Li, H., Wang, J., Gao, W., Lin, Y., Jin, W., Chang, G., Wang, R., Li, Q., Ma, L., and Pang, T.** (2011). C/EBP zeta targets to neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a repressor for metastasis of MDA-MB-231 cells. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1803-1813.

**Wang, M., Berthoud, V. M., and Beyer, E. C.** (2007a). Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis. *J Cell Sci* 120, 320-329.

**Wang, X., An, Z., Geller, J., and Hoffman, R. M.** (1999). High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP. *Prostate* 39, 182-186.

**Wang, Y., Nishida, S., Boudignon, B. M., Burghardt, A., Elalieh, H. Z., Hamilton, M. M., Majumdar, S., Halloran, B. P., Clemens, T. L., and Bikle, D. D.** (2007b). IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 22, 1329-1337.

**Wei, C. J., Francis, R., Xu, X., and Lo, C. W.** (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 280, 19925-19936.

**Weidmann, S.** (1952). The electrical constant of purkinje fiber. *J Physiol*, 1041-1054.

**Westermark, P.** (1995). Diagnosing amyloidosis. *Scand J Rheumatol* 24, 327-329.

**White, T. W.** (2002). Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science* 295, 319-320.

**White, T. W., and Bruzzone, R.** (2000). Gap junctions: fates worse than death? *Curr Biol* 10, R685-688.

**White, T. W., Bruzzone, R., and Paul, D. L.** (1995). The connexin family of intercellular channel forming proteins. *Kidney Int* 48, 1148-1157.

**Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G.** (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383, 725-737.

**Wiren, K. M., Chapman Evans, A., and Zhang, X. W.** (2002). Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol* 175, 683-694.

**Wolvetang, E. J., Pera, M. F., and Zuckerman, K. S.** (2007). Gap junction mediated transport of shRNA between human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 610-615.

**Wu, T. T., Sikes, R. A., Cui, Q., Thalmann, G. N., Kao, C., Murphy, C. F., Yang, H., Zhau, H. E., Balian, G., and Chung, L. W.** (1998). Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int J Cancer* 77, 887-894.

**Xia, C. H., Cheng, C., Huang, Q., Cheung, D., Li, L., Dunia, I., Benedetti, L. E., Horwitz, J., and Gong, X.** (2006). Absence of alpha3 (Cx46) and alpha8 (Cx50) connexins leads to cataracts by affecting lens inner fiber cells. *Exp Eye Res* 83, 688-696.

**Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., and Moses, H. L.** (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6, 603-610.

**Xu, H. T., Li, Q. C., Zhang, Y. X., Zhao, Y., Liu, Y., Yang, Z. Q., and Wang, E. H.** (2008). Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 46, 315-321.

**Xu, X., Francis, R., Wei, C. J., Linask, K. L., and Lo, C. W.** (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-3639.

- Xu, X. F., Guo, C. Y., Liu, J., Yang, W. J., Xia, Y. J., Xu, L., Yu, Y. C., and Wang, X. P.** (2009). Gli1 maintains cell survival by up-regulating IGFBP6 and Bcl-2 through promoter regions in parallel manner in pancreatic cancer cells. *J Carcinog* 8, 13.
- Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T.** (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21, 393-411.
- Yamaoka, M., Hara, T., and Kusaka, M.** (2010). Overcoming persistent dependency on androgen signaling after progression to castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 16, 4319-4324.
- Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., and Krutovskikh, V.** (1995). Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res* 333, 181-188.
- Yan, G., Fukabori, Y., Nikolaropoulos, S., Wang, F., and McKeehan, W. L.** (1992). Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol* 6, 2123-2128.
- Yancey, S. B., Biswal, S., and Revel, J. P.** (1992). Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin43 during mouse gastrulation and organogenesis. *Development* 114, 203-212.
- Yang, J., Fizazi, K., Peleg, S., Sikes, C. R., Raymond, A. K., Jamal, N., Hu, M., Olive, M., Martinez, L. A., Wood, C. G., et al.** (2001). Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. *Cancer Res* 61, 5652-5659.
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., and Ransom, B. R.** (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23, 3588-3596.
- Yeager, M., and Harris, A. L.** (2007). Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol* 19, 521-528.
- Yeager, M., and Nicholson, B. J.** (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6, 183-192.
- Yin, J. J., Mohammad, K. S., Kakonen, S. M., Harris, S., Wu-Wong, J. R., Wessale, J. L., Padley, R. J., Garrett, I. R., Chirgwin, J. M., and Guise, T. A.** (2003). A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10954-10959.
- Yin, J. J., Pollock, C. B., and Kelly, K.** (2005). Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res* 15, 57-62.
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G. R., and Guise, T. A.** (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103, 197-206.

**Yoneda, M., Hirokawa, Y. S., Ohashi, A., Uchida, K., Kami, D., Watanabe, M., Yokoi, T., Shiraishi, T., and Wakusawa, S.** (2010). RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp Mol Pathol* 88, 90-95.

**Yonou, H., Kanomata, N., Goya, M., Kamijo, T., Yokose, T., Hasebe, T., Nagai, K., Hatano, T., Ogawa, Y., and Ochiai, A.** (2003). Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 63, 2096-2102.

**Yonou, H., Ochiai, A., Goya, M., Kanomata, N., Hokama, S., Morozumi, M., Sugaya, K., Hatano, T., and Ogawa, Y.** (2004). Intraosseous growth of human prostate cancer in implanted adult human bone: relationship of prostate cancer cells to osteoclasts in osteoblastic metastatic lesions. *Prostate* 58, 406-413.

**Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., et al.** (1997). Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16, 391-396.

**Yu, W., Dahl, G., and Werner, R.** (1994). The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc Biol Sci* 255, 125-132.

**Yuspa, S. H.** (1994). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 54, 1178-1189.

**Zander, L., and Bemark, M.** (2008). Identification of genes deregulated during serum-free medium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. *Cell Prolif* 41, 136-155.

**Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., et al.** (2007a). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-961.

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

**Zhang, D., Chen, C., Li, Y., Fu, X., Xie, Y., Li, Y., and Huang, Y.** (2011). Cx31.1 acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines through inhibition of cell proliferation and metastasis. *J Cell Mol Med*.

**Zhang, J. T., Chen, M., Foote, C. I., and Nicholson, B. J.** (1996a). Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. *Mol Biol Cell* 7, 471-482.

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

**Zhang, W., DeMattia, J. A., Song, H., and Couldwell, W. T.** (2003a). Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J Neurosurg* 98, 846-853.

**Zhang, W., Nwagwu, C., Le, D. M., Yong, V. W., Song, H., and Couldwell, W. T.** (2003b). Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. *J Neurosurg* 99, 1039-1046.

**Zhang, W., Yu, S., and Zheng, L.** (1996b). [Effects of interleukin-1 on the differentiation of osteoblasts]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 31, 288-291.

**Zhang, X., Zou, T., Liu, Y., and Qi, Y.** (2006). The gating effect of calmodulin and calcium on the connexin50 hemichannel. *Biol Chem* 387, 595-601.

**Zhang, Y. W., Kaneda, M., and Morita, I.** (2003c). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 278, 44852-44856.

**Zhang, Y. W., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K. W., and Murota, S.** (2001). Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20, 4138-4149.

**Zhang, Y. W., Nakayama, K., Nakayama, K., and Morita, I.** (2003d). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63, 1623-1630.

**Zhao, W., Han, H. B., and Zhang, Z. Q.** (2011). Suppression of lung cancer cell invasion and metastasis by connexin43 involves the secretion of follistatin-like 1 mediated via histone acetylation. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 1459-1468.

**Zheng, D. Q., Woodard, A. S., Fornaro, M., Tallini, G., and Languino, L. R.** (1999). Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res* 59, 1655-1664.

**Zheng, D. Q., Woodard, A. S., Tallini, G., and Languino, L. R.** (2000). Substrate specificity of alpha(v)beta(3) integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation. *J Biol Chem* 275, 24565-24574.

**Zhong, W. D., Han, Z. D., He, H. C., Bi, X. C., Dai, Q. S., Zhu, G., Ye, Y. K., Liang, Y. X., Qin, W. J., Zhang, Z., et al.** (2008). CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* 75, 230-236.

**Zhou, L., and Griffin, J. W.** (2003). Demyelinating neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16, 307-313.

**Zhou, S., Bueno, E. M., Kim, S. W., Amato, I., Shen, L., Hahne, J., Bleiberg, I., Morley, P., and Glowacki, J.** (2011). Effects of age on parathyroid hormone signaling in human marrow stromal cells. *Aging Cell* 10, 780-788.

**Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T. H., and Civitelli, R.** (1998). Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13, 218-228.

**Zimmer, D. B., Green, C. R., Evans, W. H., and Gilula, N. B.** (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J Biol Chem* 262, 7751-7763.

**Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

**Zou, W., and Teitelbaum, S. L.** (2010). Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 27-31.

*Annexes*

# Effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexin43: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43<sup>+/-</sup> and Cx43<sup>+/+</sup> mice

Graziello Geneau · Coralie Lamiche · Corinne Niger · Pierre-Olivier Strale · Jonathan Clarhaut · Norah Defamie · Françoise Debiais · Marc Mesnil · Laurent Cronier

Received: 31 March 2009 / Accepted: 18 December 2009 / Published online: 2 March 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Bone is a dynamic tissue that undergoes a precise remodeling process involving resorptive osteoclastic cells and bone-forming osteoblastic (OB) cells. The functional imbalance of either of these cell types can lead to severe skeletal diseases. The proliferation and differentiation of OB cells play a major role in bone development and turnover. These cellular processes are coordinated by connexin43 (Cx43)-based gap-junctional intercellular communication (GJIC) and by soluble factors such as endothelin-1 (ET-1). We have used the Cx43 heterozygous (Cx43<sup>+/-</sup>) murine model to study the possible cross-talk between Cx43 and ET-1 in cultured calvarial OB cells. On microcomputed tomographic analysis of 3-day-old pups, Cx43<sup>+/-</sup> mice showed hypomineralized calvaria in comparison with their Cx43<sup>+/+</sup> littermates. Characterization of cultured OB cells clearly demonstrated the effect of the partial deletion of the Cx43 gene on its expression, on GJIC, and subsequently on OB differentiation. In this

model, ET-1 (10<sup>-8</sup>M) lost its mitogenic action in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells compared with Cx43<sup>+/+</sup> cells. Moreover, a correlation between the inhibition of cell differentiation by ET-1 and the decreased amount and function of Cx43 was found in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells but not in their Cx43<sup>+/-</sup> counterparts. Thus, as Cx43 is linked to OB differentiation, our data indicate that this mitogenic ET-1 peptide has pronounced effects on fully differentiated OB cells. With respect to roles in mechanotransduction and OB differentiation, Cx43 might modulate osteoblastic sensitivity to soluble factors.

**Keywords** Connexin43 · Endothelin-1 · Osteoblast differentiation · Intercellular communication · FRAP · Mouse

## Introduction

Bone formation is a dynamic process arising from the commitment, proliferation, and differentiation of various specific cell lineages, but mainly through osteoclastic cells and bone-forming osteoblastic (OB) cells. In adults, the skeleton is constantly being remodeled with a delicate balance between mineralized matrix deposition, carried out by OB cells, and matrix resorption by osteoclastic cells. Any disturbances to these processes can result in unsteady bone mass and pathologies (Roodman and Windle 2005; Raisz 2005). The proliferation and differentiation of OB cells are regulated by a complex network of transcription factors, systemic hormones, local growth factors, and cytokines (Karsenty 2008; Malaval et al. 2005; Wang et al. 2007). In addition to these factors, an essential role of cell-cell interactions for the function and the differentiation of OB cells has clearly been demonstrated in vitro and in

This research was supported in part by grants from the “Ligue Nationale contre le Cancer”.

G. Geneau · C. Lamiche · P.-O. Strale · J. Clarhaut · N. Defamie · F. Debiais · M. Mesnil · L. Cronier (✉)  
Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,  
University of Poitiers,  
CNRS UMR 6187,  
86022 Poitiers Cedex, France  
e-mail: Laurent.Cronier@univ-poitiers.fr

C. Niger  
Department of Orthopedics, University of Maryland,  
School of Medicine,  
Baltimore, MD, USA

F. Debiais  
Department of Rheumatology, CHU La Milétrie,  
Poitiers, France

vivo (Marie 2002; Lecanda et al. 2000). Among the common adhesion/interacting molecules that are spatiotemporally expressed and synthesized in differentiating OB cells, the connexins (Cx) form intercellular channels called gap junctions, which permit the direct intercytoplasmic passage of small molecules and ions (<1000 Da; Kumar and Gilula 1996).

Connexins are transmembrane proteins encoded by a multigenic family of at least 21 members in mammals. Channels formed by distinct members of the Cx family exhibit functional and regulational differences despite a common structure (Willecke et al. 2002; Kumar and Gilula 1996). In OB cells, in vitro studies have demonstrated that Cx43 is the predominant gap junction protein, with a lower amount of Cx45 and Cx46 being restricted to the cytoplasm (Civitelli et al. 1993; Donahue et al. 1995; Koval et al. 1997). An accumulating body of evidence has shown a direct relationship between Cx43 synthesis, gap-junctional intercellular communication (GJIC), and the differentiation state of OB cells (Schiller et al. 2001; Upham et al. 2003) leading to Cx43/GJIC-based alteration of differentiation or mineralization processes.

Indeed, the inhibition of Cx43 gene expression by antisense (Li et al. 2006) or Cx45 (Lecanda et al. 1998) transfection induces the loss of coupling and downregulation of OB markers such as osteocalcin and bone sialoprotein. In contrast, an increase in the amount of Cx43 by mechanical or hormonal treatments results in the enhancement of GJIC and the expression of phenotypic OB markers (Schiller et al. 1992; Ziambaras et al. 1998). Gap-junction-sensitive effects are postulated to be linked to a transcriptional control of specific OB genes by the recruitment of Sp1/Sp3 transcription factors controlled by GJIC (Stains et al. 2003). The clearest demonstrations of an essential role of Cx43 in bone formation and turn-over have been given by the Civitelli's group revealing that Cx43 null mice exhibit profound mineralization defects in the shape and mineralization of skeletal elements derived from both intramembraneous and endochondral ossifications associated with a general OB dysfunction in vitro (Lecanda et al. 2000; Chung et al. 2006). At birth, however, many of the skeletal elements appear ossified, indicating a delay of approximately 2 days in skeletal ossification (Lecanda et al. 2000).

Recently, a conditional Cx43-ablated mouse model based on the Cre/loxP system has been described in which the perinatal lethality of Cx43<sup>-/-</sup> mice has been overcome (Chung et al. 2006); based on results from histomorphometric, histologic and in vitro techniques, Chung et al. (2006) conclude that Cx43 is involved in the acquisition of peak bone mass and in the modulation of bone anabolism by recombinant parathyroid hormone (PTH). Another murine model obtained by ENU-induced mutagenesis and characterized by developmental abnormalities of the limbs,

teeth, face, and eyes has also shown a direct link between the Cx43 gene (dominant negative mutation) and a decrease of the bone mass and mechanical strength (Flenniken et al. 2005). This dominant mouse mutation exhibits many clinical manifestations of patients with oculodentodigital dysplasia (ODDD; Laird 2008). Together, these data have confirmed that functional GJIC and Cx43 are imperative for bone development and maintenance of the structure and integrity of the skeletal system.

In addition to GJIC, soluble factors have been implicated in the control of the differentiation and function of OB cells in normal physiology and in pathological conditions. Among the paracrine/autocrine factors present in the OB environment, endothelin-1 (ET-1), a well-known 21-amino-acid peptide that displays a multitude of biological functions has been demonstrated to down-regulate the mineralization state of mouse pre-osteoblast MC3T3-E1 cells (Hiruma et al. 1998). Analyses of ET-1 knock-out mice have revealed an alteration of proliferation and migration properties of osteogenic cells (Kitano et al. 1998). ET-1 induces not only a mitogenic effect, but also an inhibition of OB differentiation (Takuwa et al. 1990; Hiruma et al. 1998; Kitten et al. 1997). Other lines of evidence indicate a physiopathological role of ET-1 in several diseases of human bones, such as Paget's disease (Tarquini et al. 1998; Pirzer et al. 2005) and prostate-cancer-induced OB metastases (Jimeno and Carducci 2004). Moreover, we have demonstrated, in a human cell line, that the Cx43 level alters the ET-1 effects on OB differentiation (Niger et al. 2008), as shown for other modulators such as PTH (Donahue et al. 1995; Chung et al. 2006).

However, given the absence of mitogenic effect in our previous cellular model (Niger et al. 2008), we have used primary culture of OB cells from the calvaria of Cx43<sup>+/-</sup> mice and from their littermates to study the influence of Cx43 on the inhibiting action of ET-1. In addition, no data are available from Cx43<sup>+/-</sup> mice regarding bone mineral density (BMD) to allow this mouse to be considered as a useful physiological model of intermediate phenotype. Indeed, whereas the complete deletion of the Cx43 gene in mice might be a fruitful model for studying the essential properties of this connexin, it does not provide a realistic model for the study of human diseases (Laird 2008). Since patients rarely suffer from total Cx gene ablation, the heterozygous murine model has been preferentially used. The microcomputed tomographic analysis of entire animals shows hypomineralized calvaria in heterozygous mice compared with wild-type littermates, whereas no significant differences have been recorded in ribs, teeth, or long bones. The characterization of cultured Cx43<sup>+/-</sup> OB cells has clearly demonstrated the incidence of the partial deletion in GJIC and subsequently in early and late differentiation criteria. Furthermore, ET-1 loses its mitogenic action in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells compared with Cx43<sup>+/+</sup> OB cells, and this

effect is associated with a minimized inhibitory effect of the peptide on the differentiation process. The inhibitory effect of ET-1 on differentiation and the decreased Cx43 amount and GJIC have been linked in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells but are dissociated in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, suggesting an alternative regulatory process.

## Materials and methods

### Animal model

Three-day-old genetically modified newborn mice (Gja1<sup>tm1Kdr</sup>; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me., USA) and their wild-type counterparts were used. The mutation is attributable to the insertion of a promoterless neomycin (Neo) gene into exon 2 of the Cx43 gene (Reaume et al. 1995). As initially described, mice homozygous for the Gja1<sup>tm1Kdr</sup> targeted mutation die at birth (Reaume et al. 1995). Consequently, the tails of killed heterozygous Cx43 mice (Cx43<sup>+/-</sup>) and wild-type mice (Cx43<sup>+/+</sup>) were used for genotyping, and their calvaria were kept in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM; InVitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 4°C during genotyping. Genomic DNA was extracted in TRIS-HCl buffer (50 mM, pH 8.0) containing 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.5% SDS, and 2 mg/ml proteinase K (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA) for 2 h at 65°C. DNA was precipitated with a mix containing ethanol 95% and 143 mM sodium acetate and rinsed in a 70% ethanol solution. The DNA was then resuspended in a TRIS-EDTA buffer for 45 min at 65°C and was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) analysis. Cx43 and Neo sequences were amplified with 50 mIU/µl *Taq* polymerase (BioTaq Bioline, AbCys, Paris, France) and four primers synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium): mCx43-forward, 5'-CCC-CAC-TCT-CAC-CTA-TGT-CTC-C-3'; mCx43-reverse, 5'-ACT-TTT-GCC-GCC-TAG-CTA-TCC-C-3'; mNeo-forward, 5'-GGC-CAC-AGT-CGA-TGA-ATC-CAG-3'; mNeo-reverse, 5'-TAT-CCA-TCA-TGG-CTG-ATG-CAA-3'. After a preheating step at 94°C for 2 min, 30 cycles were run, with denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 1 min. The Cx43-forward and Cx43-reverse primers yielded a product of 520 bp, and the Neo primers yielded a product of 294 bp. PCR products were then loaded onto a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide at 0.34 µM for electrophoresis. Wild-type newborn mice were identified by the presence of a single band at 520 bp, whereas heterozygous animals were characterized by two bands at 520 bp and 294 bp.

All experimental procedures received approval from the local Animal Care Committee and were conducted in

accordance with the guidelines of the European Union (CEE 86-609).

### Densitometry and microtomography analysis

For BMD analysis, 3-day-old mice of both genotypes were killed and fixed in absolute ethanol at 4°C. Microcomputed X-ray tomography was performed by using a micro-CT system (Viva-CT 40, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). Entire pups were scanned to visualize their skeleton structure, but mineral densities were only analyzed in calvaria, femurs, ribs, and teeth, which presented hypomineralization in Cx43 null mice (Lecanda et al. 2000). The acquisition parameters were 15 µm voxel resolution, with the X-ray source at 45 kV and a threshold of 190. Two-dimensional images were acquired in 45 min, and reconstructed three-dimensional images showed calcified bone as intense regions against a uniform dark background.

### Osteoblast isolation and culture

After genotyping, calvaria of each genotype were pooled and digested sequentially under gentle agitation at 37°C by using a three-step process (0.5% trypsin/1.5% EDTA solution for 5 min, 1 mg/ml collagenase II solution for 5 min, followed by three 1 mg/ml collagenase digestions for 15 min). Cells isolated by the last three digestions were combined as an osteoblast population after discarding bone debris by filtration (pore diameter: 37 µm). OB cells were then resuspended in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 580 mg/l glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin and cultured in 25-cm<sup>2</sup> flasks at 150×10<sup>3</sup> cells/ml at 37°C in a humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. After 6 days of primary culture to increase cell numbers, cells were trypsinized in a 0.1% trypsin/0.3% EDTA solution, and secondary cultures were initiated in order to perform specific analyses. Apart from exceptions mentioned below, cells were resuspended in a differentiating medium corresponding to DMEM supplemented with 10% FBS, 580 mg/l glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml ascorbic acid, and 10 mM sodium β-glycerophosphate and cultured at 25×10<sup>3</sup> cells/ml in 35-mm plastic dishes at 37°C in a humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. At 4 h after seeding, the cells were carefully washed in phosphate-buffered saline (PBS), and ET-1 (10<sup>-8</sup>M) was added to some cultures. Thereafter, the media were renewed daily. All reagents were from Sigma (St. Louis, Mo., USA).

### Recording of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients

To demonstrate the presence of functional ET-1 receptors on each cell genotype, variations in free intracellular

calcium concentrations ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were measured with a method involving the use of confocal microscopy (BioRad MRC 1024, Hemel Hempstead, UK) after a short ET-1 perfusion ( $10^{-7}M$ ). The  $Ca^{2+}$  indicator Fluo-4 (Interchim, Montluçon, France) was used, for which fluorescence emission at 516 nm after excitation at 488 nm depends on the intracellular  $Ca^{2+}$  level. Briefly, after 2 days at a density of  $50 \times 10^3/ml$ , cells cultured on 30-mm glass coverslips were loaded for 20 min in the dark in a Tyrode solution (144 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 0.3 mM  $NaH_2PO_4$ , 5 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.4) containing the lipophilic form of the dye, viz., Fluo-4/AM ester dissolved in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO), at a concentration of 2.7  $\mu M$ . After the unincorporated fluorogenic dye had been carefully washed off, variations in  $[Ca^{2+}]_i$  with time were measured in defined areas located approximately in the center of OB cells. By means of a home-made gravity-based micro-perfusion system, ET-1 and/or pharmacological agents were applied rapidly by using a streamline flow directed from the opening of a stainless steel capillary tube (internal diameter 50  $\mu m$ ) positioned in the bath onto the OB cells under investigation. All experiments were conducted at room temperature ( $20 \pm 1^\circ C$ ).

#### Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined colorimetrically by using p-nitrophenyl phosphate (pNPP; Biotron Diagnostic, Hemet, Calif., USA) as the enzyme substrate. After 2 days of culture, OB cells were scraped off in a lysis buffer containing 10 mM TRIS-HCl, 2 mM  $MgCl_2$ , and 0.05% Triton X-100. Cell lysates were sonicated and incubated in the presence of 16 mM pNPP at  $37^\circ C$  (pH 10.2), and the enzymatic activity was measured at 405 nm and normalized against total cellular protein content determined by DC Protein Assay (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

#### Mineralization assay

Von Kossa staining was used as a late criterion for OB differentiation. After 3 weeks of culture, cells were fixed in 4% neutral formalin solution for 10 min and rinsed with deionized water. Then, a 5% silver nitrate solution was added for 60 min in the dark. The extent of mineral deposits in the extracellular matrix was revealed with UV light for 1 h and quantified by using Visilog-6.3 software (Noesis, Les Ulis, France).

#### Real-time quantitative reverse transcription with PCR

Expression levels of Cx43 transcripts were assessed after 4 days of culture. Specific OB gene expression was

assessed after 2 days for ALP and after 2 to 10 days for osteocalcin. Total RNA was isolated by using the Qiagen RNeasy Plus MINI kit according to the instructions of the manufacturer (Quiagen, Hilden, Germany). Plastic dishes (35 mm) were harvested with 400  $\mu l$  lysis buffer, and cell lysis was performed by using a 2-s pulse with a probe sonicator. RNA (5  $\mu g$ ) was reverse-transcribed by using an Ambion RETROscript kit (Ambion, Huntingdon, UK). The reactions were setup in duplicates in 20  $\mu l$  total volume with 5 pmol each primer, 10  $\mu l$  2 $\times$  SYBRgreen Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), and 1  $\mu l$  template. The PCR was performed ( $95^\circ C$  for 10 min; 35 cycles of  $95^\circ C$  for 15 s;  $60^\circ C$  for 1 min), and a melt curve analysis was carried out at the end of each experiment in order to verify that a single product per primer pair was amplified. The amplification and analysis were performed on an ABI Prism 7900 Fast system (Applied Biosystems). Samples were compared by using the relative  $C_T$  method. We also determined that a no reverse-transcriptase control reaction yielded no amplification product. Specific primers for Cx43, osteocalcin (OCN), ALP, and housekeeping genes (ribosomal protein P0 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]) were synthesized by Eurogentec: mCx43-forward, 5'-GTG-CCG-GCT-TCA-CTT-TCA-TTA-AG-3'; mCx43-reverse, 5'-CCA-AGG-CGC-TC-C-AGT-CA-3'; mOCN-forward, 5'-CTG-GCT-GCG-CTC-TGT-CTC-T-3'; mOCN-reverse, 5'-CCT-GCT-TGG-AC-A-TGA-AGG-C-3'; mALP-forward 5'-GCC-CTC-CAG-ATC-CTG-ACC-AA-3'; mALP-reverse 5'-GCA-GA-G-CTT-GCT-TGG-CCT-TA-3'; P0-forward 5'-ATG-CCC-AGG-GAA-GAC-AGG-GC-3' and P0-reverse 5'-CC-A-TCA-GCA-CCA-CAG-CCT-TC-3'; GAPDH-forward, 5'-TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA-GC-3', GAPDH-reverse 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GAG-3'.

#### Proliferation assay

Determination of cell proliferation was performed following a procedure adapted from Oliver et al. (1989). After being washed in PBS, OB cells were fixed in 0.5% glutaraldehyde and stained with a 1% methylene blue solution in borate buffer (pH 8.5) for 1 h. Then, cells were rinsed in distilled water and dried at room temperature overnight. Fixed methylene blue was removed by exposure to 0.1 N HCl for 1 h, and the optical density (OD) of supernatants was determined at 620 nm. Comparison with cell number determined by counting gave a linear relationship, and one OD unit corresponded to 50,000 cells.

#### Immunocytochemistry

To detect Cx43, cultured cells were rinsed with PBS, fixed in 0.5% paraformaldehyde at room temperature for 30 min,

and then washed three times in PBS. After incubation in a blocking solution (1% bovine serum albumin and 1% Triton X-100 in PBS) for 45 min, cells were washed three times in PBS and monoclonal anti-Cx43 antibody (Transduction Laboratories, Lexington, Ky., USA) diluted 1:100 was applied for 1 h at room temperature. The second antibody (Chemicon International, Temecula, Calif., USA) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and nucleus counterstainer To-Pro-3 (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) were then applied at 1:100 and 1:1000, respectively, and the samples were examined on a BioRad MRC 1024 confocal microscope. All controls performed by omitting the primary antibody were negative.

#### Immunoblot analysis

OB cells were washed with ice-cold PBS, scraped off, and digested in PBS containing 0.5% sodium deoxycholate, 20% SDS, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail (Sigma) at 4°C. The lysates were boiled for 3 min. Samples were then aliquoted and stored at -20°C until use. Protein concentration was determined according to Bradford's method (BioRad) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. Proteins (50 µg) were subjected to electrophoretic separation on 10% polyacrylamide-SDS gel and transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, UK). Membranes were blocked by incubation in a saline solution (pH 8.0) containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Blots were then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies against mouse Cx43 diluted 1:1000 (Transduction Laboratories) or against mouse Cx45 diluted 1:250 (gift from Dr. E. Dupont, Imperial College, London, UK). The corresponding antigen was detected after incubation with an ALP-coupled secondary antibody diluted 1:10,000 (Promega, Madison, Wis., USA). Densitometric analyses were performed by using Visilog-6 software.

#### Gap-FRAP technique

The degree of GJIC between OB cells was measured by means of the gap-FRAP method (Wade et al. 1986) on a confocal microscope (FV 1000 Olympus IX-81, Tokyo, Japan). After being washed, cultured cells were loaded for 15 min at room temperature in Tyrode solution containing the membrane-permeant molecule 6-carboxyfluorescein diacetate (7 µg/ml in 0.25% DMSO; Sigma). The highly fluorescent and membrane impermeable 6-carboxyfluorescein moiety is released and accumulates within cells. After the excess extracellular fluorescent ester had been washed off to avoid further loading, the fluorescence of some selected cells adjacent to other cells was photobleached by applying strong

light pulses from an argon laser set at 405 nm. Digital images of the fluorescent emission excited at 488 nm by weak laser pulses were recorded at regular intervals for 9 min (each time period: 30 s) and stored for subsequent analysis. In each experiment, one labeled isolated cell was left unbleached as a reference for the loss of fluorescence attributable to repeated scanning and dye leakage. When the bleached cell was interconnected by open gap junction channels to unbleached contiguous cells, a fluorescence recovery following a slow exponential time course was measured (Cronier et al. 1994). An estimation of the relative permeability of the gap junctions was given by the diffusion rate constant  $k$  determined from recovery curves by using the following equation:  $(F_i - F_t)/(F_i - F_0) = e^{-kt}$  where  $F_i$ ,  $F_t$ , and  $F_0$  are fluorescence intensities before bleaching, at time  $t$ , and at  $t=0$ , respectively. The effects on GJIC were then assessed by the comparison of this diffusion rate constant  $k$  (expressed in  $\text{min}^{-1}$ ) under the various conditions.

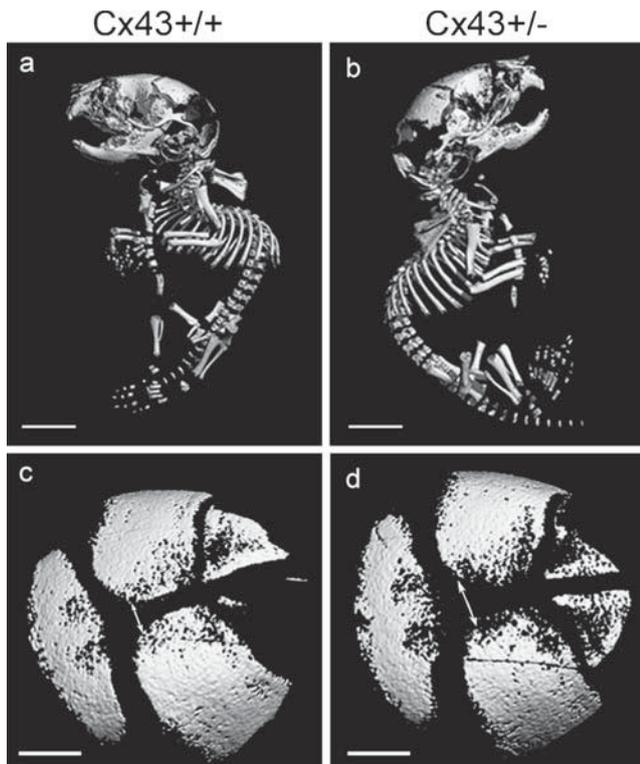
#### Statistical analyses

All reported data are expressed as mean ± SEM. One-way analysis of variance followed by a Mann-Whitney U-test was used to compare reverse transcription (RT)-quantitative PCR (qPCR) values, whereas unpaired Student's  $t$ -tests were used for statistical comparison in other cases ( $P < 0.05$  was considered significant).

## Results

#### Reduction of BMD in Cx43<sup>+/-</sup> mice

Three-day-old Cx43<sup>+/+</sup> ( $n=8$ ) and Cx43<sup>+/-</sup> ( $n=7$ ) pups were examined by microcomputed X-ray tomography, and three-dimensional images from entire pups and cranial vaults were generated. No obvious retarded ossification or stature reduction was noticed between both genotypes in entire animals (Fig. 1a, b). However, hypomineralized calvaria were observed in heterozygous animals (Fig. 1d) with larger sutures and less pronounced mineral areas in frontal bones compared with Cx43<sup>+/+</sup> littermates (Fig. 1c). Moreover, BMD measured in calvaria confirmed this significantly reduced mineralization in Cx43<sup>+/-</sup> mice (Table 1). As ODDD patients or Cx43 null mice present demineralisation in ribs, teeth, or long bones, BMD were also investigated in these bones in our murine model (Table 1). No significant matrix mineralization differences in these skeletal sites were measured between both genotypes. With this high resolution and quantitative method, a reduced ossification in Cx43<sup>+/-</sup> animals was demonstrated and led us to exploit this model further in order to study the involvement of Cx43 in the modulation of OB differentiation.



**Fig. 1** Microcomputed X-ray tomography of 3-day-old  $Cx43^{+/-}$  and  $Cx43^{+/+}$  mice (voxel size: 15  $\mu\text{m}$ ; threshold: 190). **a, b** Reconstructed three-dimensional images of entire pups of  $Cx43^{+/+}$  and  $Cx43^{+/-}$  mice, respectively. Calcified tissue is shown as intense regions against a uniform dark background. Bars 5 mm. **c, d** Images of calvaria representative of eight  $Cx43^{+/+}$  and seven  $Cx43^{+/-}$  mice, respectively (arrows larger sutures in  $Cx43^{+/-}$  mice than in  $Cx43^{+/+}$  mice. Bars 1 mm

#### Reduced differentiation and increased proliferation in $Cx43^{+/-}$ OB cells

OB cells were extracted from the calvaria of 3-day-old pups from both genotypes and cultured in the presence of 10% FBS, 10 mM 2-glycerophosphate, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid. After 3 days of culture, some large flattened OB cells were observed in  $Cx43^{+/+}$  cultures, whereas near confluent OB cells were obtained in  $Cx43^{+/-}$  culture (Fig. 2a, b). Moreover, after 4 days of culture, a characteristic punctate  $Cx43$  immunostaining was detected in  $Cx43^{+/+}$  OB membranes and inside the cells, whereas this was reduced in the

plasma membranes of  $Cx43^{+/-}$  OB cells (Fig. 2c, d). A significant decrease in  $Cx43$  gene expression was also revealed by RT-qPCR analyses (47% reduction, see below) and by Western blot analyses (20% reduction) in  $Cx43^{+/-}$  cells (Fig. 2e). In contrast, the  $Cx45$  levels were similar, whatever the genotype (data not shown). Next, gap junction functionality was measured by the gap-FRAP method (Fig. 2f–j). Coupled cells were characterized by an exponential time course of fluorescence recovery from neighboring cells into a photobleached tested cell (Fig. 2i). A significant 60.3% reduction of functional communication was measured in  $Cx43^{+/-}$  OB cells compared with  $Cx43^{+/+}$  OB cells, as shown by the mean values of the diffusion rate constant presented in Fig. 2j ( $0.141 \pm 0.017 \text{ min}^{-1}$  for  $Cx43^{+/+}$  OB cells versus  $0.056 \pm 0.014 \text{ min}^{-1}$  for  $Cx43^{+/-}$  OB cells). In order to characterize our cellular model fully, we then compared the ability of  $Cx43^{+/-}$  and  $Cx43^{+/+}$  cells to proliferate and differentiate in culture (Fig. 3). After 4 days of culture, an increased proliferation rate was measured in  $Cx43^{+/-}$  cultures by means of the methylene blue assay (+180% compared with  $Cx43^{+/+}$ ; Fig. 3a). Furthermore, after 2 days of culture, ALP activity representing an early criterion of OB differentiation was significantly reduced in  $Cx43^{+/-}$  cells compared with the wild-type ( $2.404 \pm 0.056 \text{ IU}/\mu\text{g}$  proteins in  $Cx43^{+/+}$  OB cells versus  $1.484 \pm 0.016 \text{ IU}/\mu\text{g}$  proteins in  $Cx43^{+/-}$  OB cells; Fig. 3b), whereas the transcript level was unaltered (Fig. 3c). Similarly, we found that the mineralization potential of  $Cx43^{+/-}$  OB cells was significantly reduced compared with  $Cx43^{+/+}$  OB cells as revealed by the OCN synthesis levels measured by RT-qPCR and by the percentage of mineralized area following Von Kossa staining (Fig. 3d, e).

Under our experimental conditions, OB cells isolated from  $Cx43^{+/-}$  mice exhibit an increased proliferation potential together with a reduced differentiation capacity compared with  $Cx43^{+/+}$  OB cells. Thus, the  $Cx43$  haploinsufficiency in murine OB cells induces a gene dosage effect that could be of interest in the modulating context.

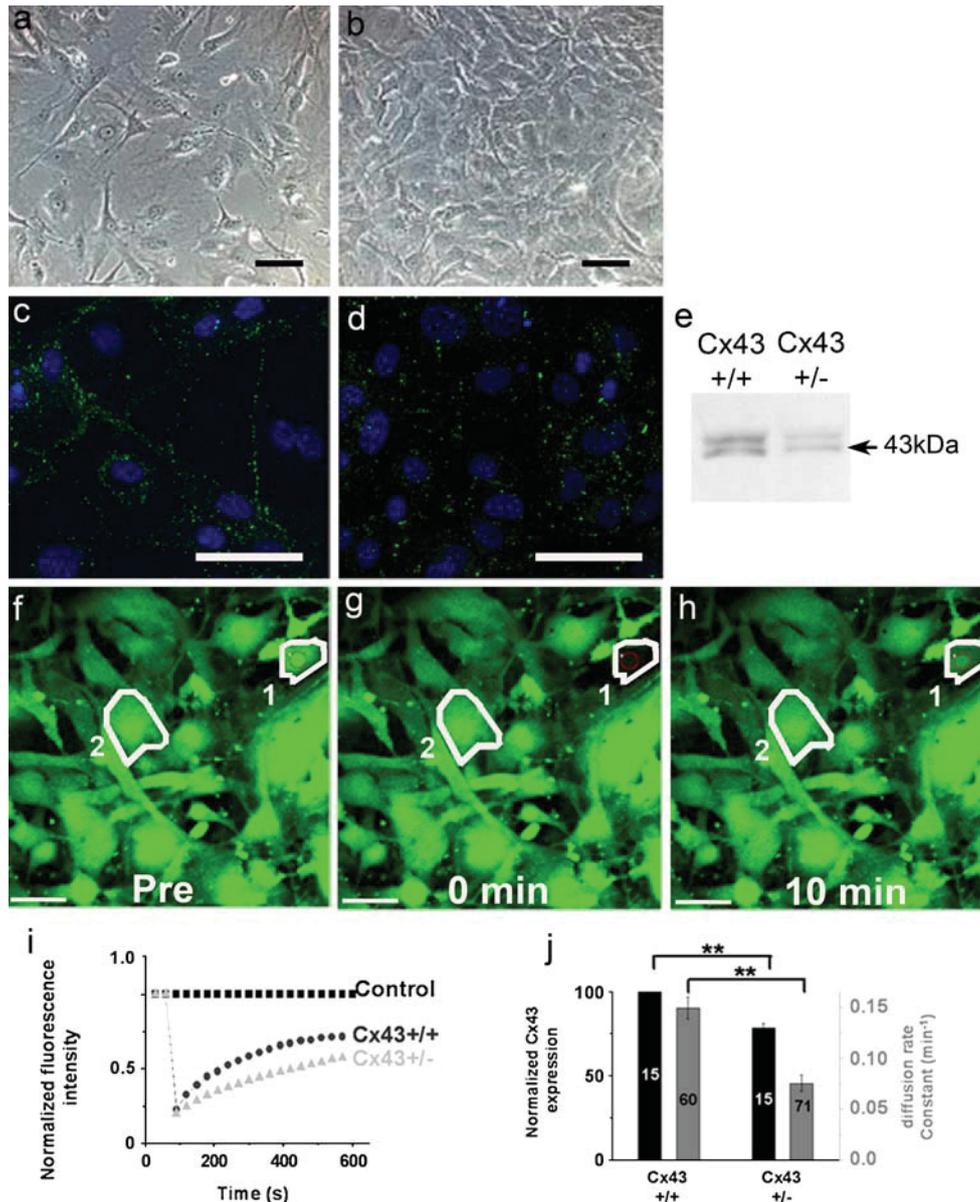
#### Alteration of ET-1 effects in $Cx43^{+/-}$ OB cells

The presence of ET-1 receptors was first physiologically demonstrated by the perfusion of ET-1 ( $10^{-7} \text{ M}$ ) in the vicinity

**Table 1** Bone mineral densities (BMD) measured at various bone sites in  $Cx43^{+/+}$  and  $Cx43^{+/-}$  newborn mice. BMD are expressed as milligrams of hydroxyapatite per cubic centimeter. Data are means  $\pm$  SEM; numbers of experiments are indicated in brackets

	Calvaria	Femurs	Lower incisors	Ribs
$Cx43^{+/+}$ mice	368.45 $\pm$ 3.22 (8)	308.91 $\pm$ 2.5 (6)	471.06 $\pm$ 15.51 (8)	348.47 $\pm$ 5 (6)
$Cx43^{+/-}$ mice	352.94 $\pm$ 5.56* (7)	309.08 $\pm$ 2.65 (8)	446.64 $\pm$ 11.99 (5)	355.41 $\pm$ 2.18 (5)

\* $P < 0.05$  vs.  $Cx43^{+/+}$  mice (Student's *t*-test for unpaired data)



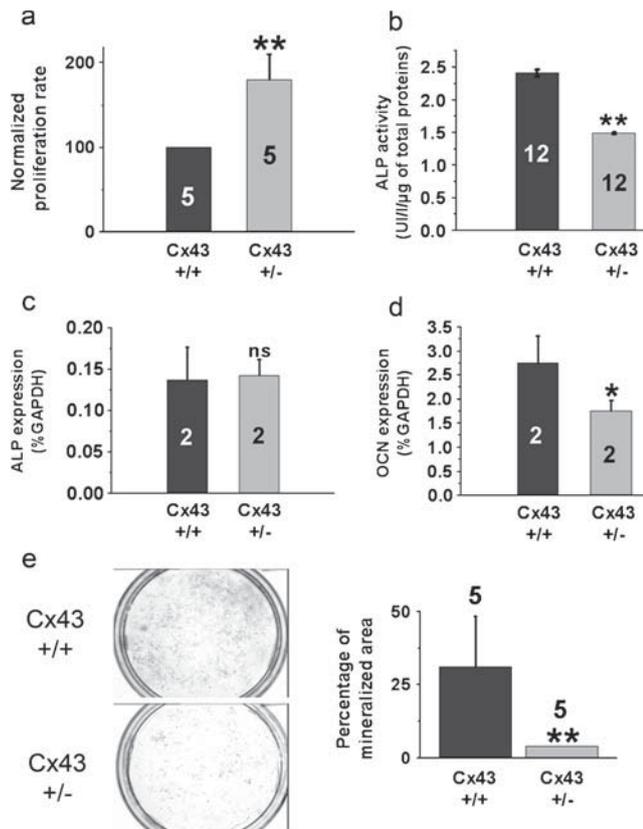
**Fig. 2** Gap-junctional properties of osteoblastic (OB) cells cultured in differentiating medium. **a, b** Phase-contrast micrographs of Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, respectively, after 4 days of culture. **c, d** Immunolocalization of Cx43 (green) and counterstaining of nuclei (blue) after 4 days of culture. Strong Cx43 punctate staining was observed in OB plasma membranes and in perinuclear regions in Cx43<sup>+/+</sup> cells (**c**). An reduction in membranous immunolocalization was seen in cultured Cx43<sup>+/-</sup> OB cells (**d**). Bars 50 μm. **e** Levels of Cx43 protein in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. Cx43 immunoblotting is significantly decreased in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **f–j** Functional coupling in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 4 days of culture as measured by means of the gap-FRAP method. **f–h** Digital images of

fluorescence distribution in OB cells during Prebleach (Pre), just after photobleach (0 min), and after fluorescence redistribution (10 min). Polygon 1 represents the photobleached tested cell; Polygon 2 is an unbleached control cell for correction of the loss of fluorescence caused by repeated scanning and dye leakage. **i** Examples of corrected recovery curves expressed as the percentage of prebleach value versus time in Cx43<sup>+/+</sup> (filled circles) and Cx43<sup>+/-</sup> (filled triangles) cells and control cells (filled squares). **j** Diffusion rate constants *k* (gray) and normalized Cx43 synthesis (black) for Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. Numbers of investigated cells are indicated inside the bars. \*\*P<0.01 (Student's *t*-test for unpaired data)

of OB cells. Under our experimental conditions, the peptide was effective in inducing a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in the investigated cells of both genotypes (Fig. 4a, b). Nevertheless, the ET-1-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase was significantly lower (28% reduction) in the Cx43<sup>+/-</sup> OB cells than in the Cx43<sup>+/+</sup> OB cells (Fig. 4c).

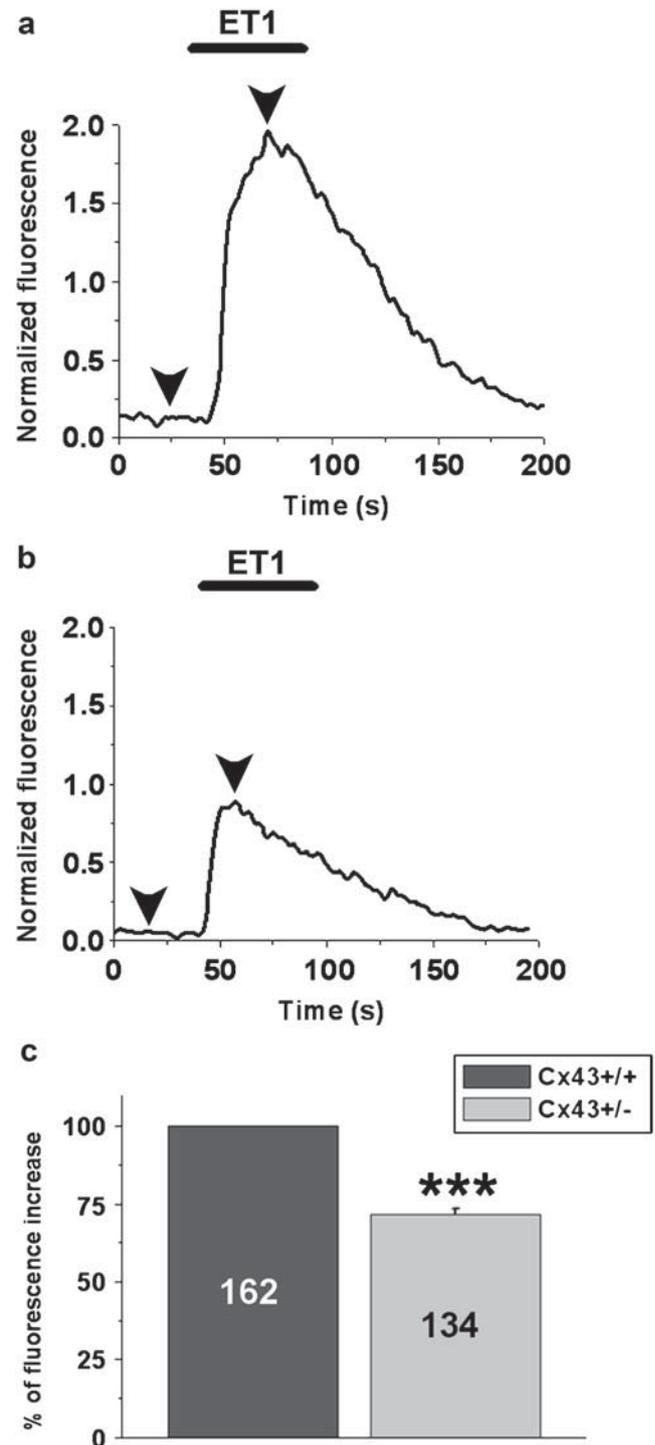
These data confirmed that the mechanisms implicated in the control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis were different between the two genotypes, as previously demonstrated (Geneau et al. 2007).

The presence of ET-1 (10<sup>-8</sup>M) in the culture medium for 4 days significantly increased the proliferation rate of

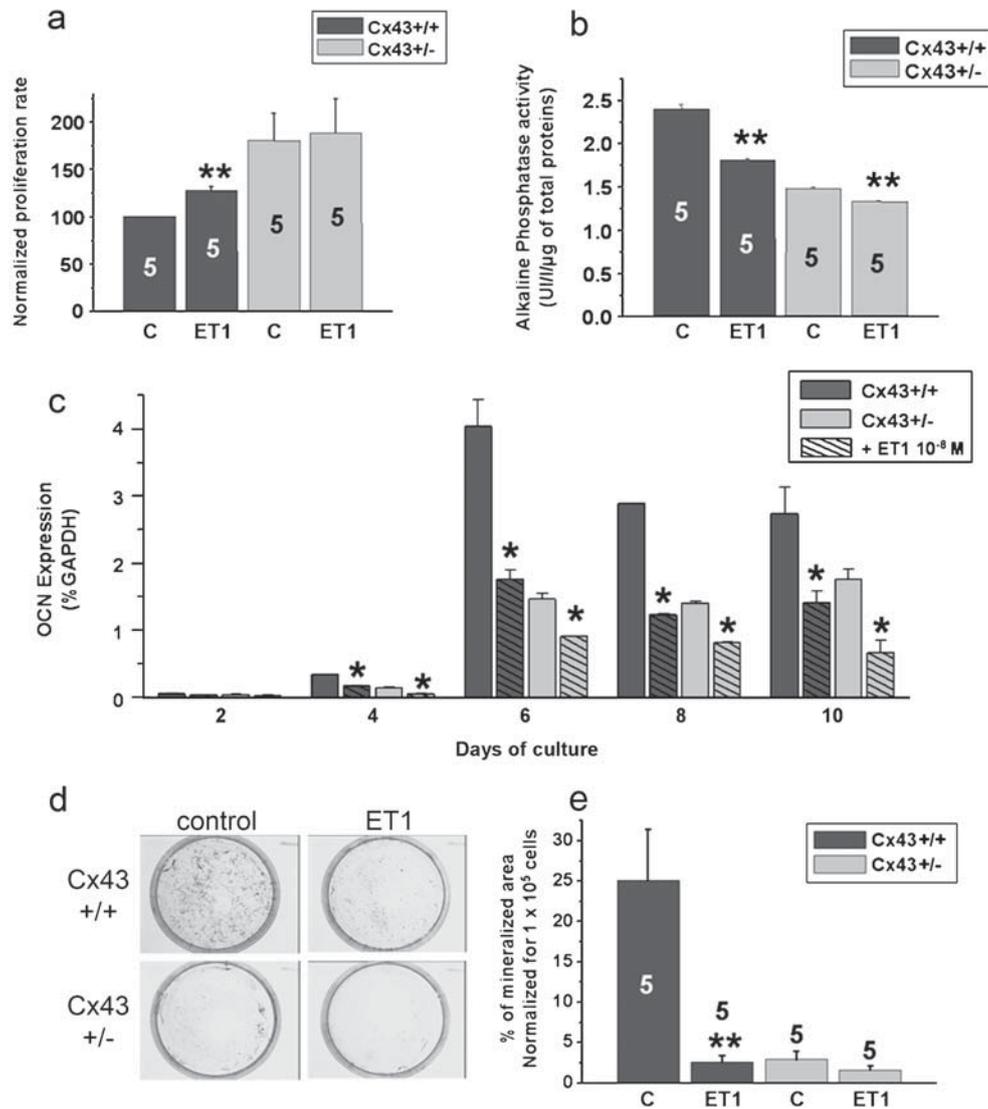


**Fig. 3** Proliferation and differentiation status of Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **a** Proliferation rate assessed by means of methylene blue staining in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 4 days of secondary culture in a 20% fetal bovine serum medium. Data represent means±SEM of five distinct experiments normalized versus the control condition (Cx43<sup>+/+</sup> OB cells). **b** Alkaline phosphatase (ALP) activity in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 2 days of culture in differentiating medium. **c** Real-time reverse transcription with quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) revealed no significant difference in ALP mRNA levels between Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 2 days of culture in differentiating medium. **d** Osteocalcin (OCN) mRNA level in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells was significantly reduced compared with Cx43<sup>+/+</sup> OB cells when cells were cultured for 10 days in differentiating medium. RT-qPCR data correspond to the means±SEM of two independent triplicate experiments. **e** Representative photomicrographs of Von Kossa staining illustrating the reduction of matrix mineralization in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells compared with control. The histogram corresponds to quantitative data from five independent preparations and shows delayed mineralization attributable to the partial deletion of Cx43 after 21 days of culture in differentiating medium. Numbers of investigated cells are indicated inside the bars in **a–d** and on top of the bars in **e**. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  with Student's *t*-test for unpaired data in **a, b, e**; Mann-Whitney U-test in **c, d** (ns not significant)

Cx43<sup>+/+</sup> OB cells (28% increase), whereas this mitogenic effect was not measured in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells (Fig. 5a). In contrast, ET-1 (10<sup>-8</sup>M) induced a significant reduction of ALP activity in both Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, even if the effect was more pronounced in Cx43<sup>+/+</sup> cells (25% vs. 11% reduction for Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, respectively; Fig. 5b). The inhibitory effect on OB differentiation



**Fig. 4** Presence of endothelin-1 (ET-1) receptors in cultured Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **a, b** Recordings of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> variations in response to a short ET-1 (ET1) perfusion (100 nM) in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, respectively, cultured for 2 days in differentiating medium (arrowheads time of measurements for peak amplitudes expressed in **c**). **c** Averaged data of the normalized fluorescence intensity in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells (means±SEM). Numbers of investigated cells are indicated inside the bars. \*\*\* $P < 0.001$  (Student's *t*-test for unpaired data)



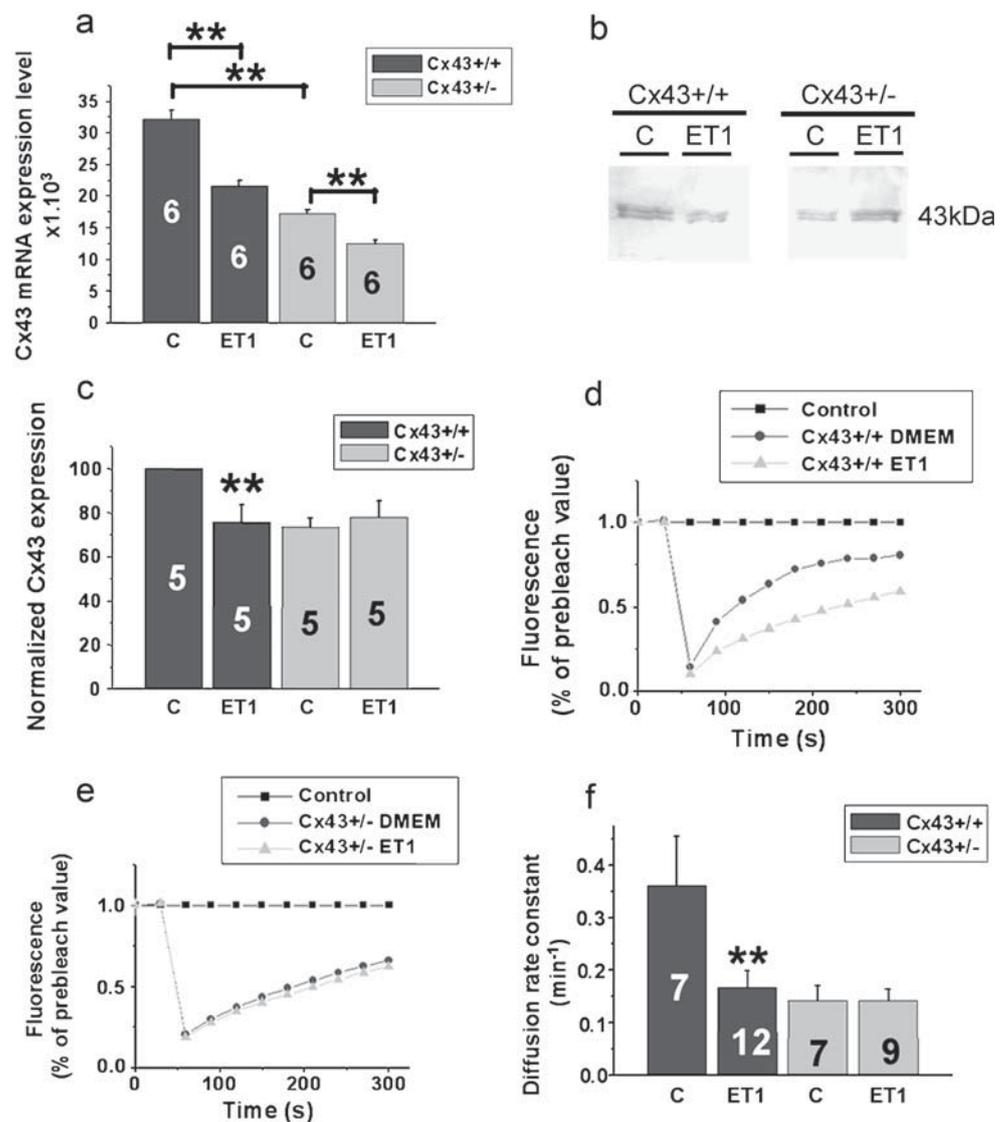
**Fig. 5** Effects of ET-1 (10<sup>-8</sup>M) on proliferation and differentiation of cultured Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **a** Proliferation rate determined by means of methylene blue assay in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 4 days of secondary culture with a 20% FBS medium in the presence (ET1) or absence (C) of 10 nM ET-1. Data represent the means±SEM of five distinct experiments normalized versus control condition (Cx43<sup>+/+</sup> OB cells in DMEM). **b–e** ET-1 effects on the level or activity of OB differentiation markers. **b** Presence of 10 nM ET-1 for 2 days in the differentiating medium induced a significant reduction of ALP activity in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **c** Real-time PCR revealed a significant reduction of OCN mRNA levels when

OB cells were cultured for 2–10 days in the presence of 10<sup>-8</sup>M ET-1 compared with control medium. This inhibitory effect was observed, whatever the genotype. Data correspond to the means±SEM of two independent triplicate experiments. **d** Representative Von Kossa staining in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells cultured in the presence (ET1) or absence (control) of 10 nM ET-1. **e** Histogram of normalized data measured after 21 days of culture in the presence of 10 nM ET-1 (ET1) or in control medium (C) for five independent Von Kossa experiments. Numbers of investigated cells are indicated inside the bars in **a**, **b** and on top of the bars in **e**. \*\*P<0.01 (Student’s *t*-test for unpaired data)

was also demonstrated by means of RT-qPCR analyses of OCN gene expression. This ET-1 effect was significant, whatever the duration of culture (day 2 to day 10), reflecting an inhibition rather than a time-lag in the differentiation process (Fig.5c). Finally, Von Kossa staining revealed a larger inhibitory effect of ET-1 (10<sup>-8</sup>M) on matrix mineralization process in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells than in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells (90% and 50% reduction, respectively; Fig. 5d, e).

Moreover, in parallel to the reduction of the biochemical differentiation markers, Cx43 transcripts levels were significantly reduced in the presence of ET-1 (10<sup>-8</sup>M) as revealed by quantitative RT-PCR (Fig. 6a). However, Western blot analyses revealed a differential inhibitory effect on the Cx43 protein amount. Indeed, ET-1 induced a 25% reduction of Cx43 synthesis in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells, whereas no effect was measured in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells

**Fig. 6** Cx43 synthesis and function in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells cultured in the absence (C) or the presence of 10<sup>-8</sup>M ET-1 (ET1) in the differentiating medium. **a** Real-time RT-PCR in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells after 4 days of culture revealed an inhibitory action of ET-1 (10 nM) on Cx43 mRNA expression. **b** Representative Cx43 immunoblot illustrating the differential inhibitory effect of ET-1 (10 nM) between cultured Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. **c** Normalized Cx43 mRNA amount confirmed a significant ET-1 effect only in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells. **d, e** Examples of corrected recovery curves obtained by means of gap-FRAP in Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells, respectively, illustrating the uncoupling action of 10 nM ET-1 after 4 days only in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells. **f** Effect of long-term ET-1 treatment on diffusion rate constants *k* for Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> OB cells (C differentiating medium, ET1 10 nM ET-1). Numbers of investigated cells are indicated inside the bars. \*\**P*<0.01 (Student's *t*-test for unpaired data)



(Fig. 6b, c). This inhibitory effect of ET-1 on Cx43 amount in Cx43<sup>+/+</sup> OB cells induced a 54% reduction in GJIC after a long-term ET-1 treatment (10<sup>-8</sup>M), whereas no decrease was measured in Cx43<sup>+/-</sup> cultures (Fig. 6d–f).

## Discussion

The present findings in a murine model indicate that the decreased level of Cx43 synthesis is linked to a reduced OB differentiation state and to an increased proliferation rate. In vitro analyses have shown that Cx43 haploinsufficiency in OB cells induces a more than two-fold decrease in GJIC leading to a significant reduction of both early and late OB differentiation markers associated with an increased proliferation rate. This link has been validated in vivo by using microcomputed X-ray tomography analysis of 3-day-old Cx43<sup>+/+</sup> and Cx43<sup>+/-</sup> pups. Tomographic analysis has

allowed us to reveal the absence of a general defect in the shape and mineralization of bones from both intramembraneous and endochondral ossification. However, contrary to histological approaches, this quantitative method has permitted the demonstration of a hypomineralization of Cx43<sup>+/-</sup> calvaria. As previously shown (Guldberg et al. 2004), microcomputed X-ray tomography analysis is particularly well suited to the efficient characterization of skeletal phenotypes in transgenic mice models. This reduction of mineralization might be attributable to an alteration of the migratory potential of neural crest cells from neural tubes to craniofacial ossification sites as previously observed for Cx43-null mice (Lecanda et al. 2000; Stains and Civitelli 2005). Indeed, several studies of transgenic Cx43 mice or neural tube explant cultures have demonstrated that the directional motility of neural crest cells is dependent on the precise level of Cx43 synthesis (Huang et al. 1998; Xu et al. 2006). Nonetheless, our data

based on phenotypic characterization have demonstrated that the OB potential of calvarial Cx43<sup>+/-</sup> cells was reduced, accordingly to previous studies performed on Cx43-null mice (Lecanda et al. 2000). However, in order to ascertain the Cx43 effect on both intramembraneous and endochondral ossifications, the characterization of OB cells isolated from long bones of Cx43<sup>+/-</sup> can be performed.

By displaying an intermediate phenotype, Cx43<sup>+/-</sup> OB cells are a useful model to study modulating effects of peptides implicated in human diseases. Indeed, such pathologies are rarely correlated to the total ablation of the connexin gene. Recently, findings of more than 20 distinct point mutations in the Cx43 gene have been related to the human disorder ODDD. These patients present phenotypic features including craniofacial malformations. Our data are also consistent with earlier studies of mouse genetic models (Lecanda et al. 2000; Chung et al. 2006) or cultured OB models with altered Cx43 gene expression (Upham et al. 2003; Li et al. 2006; Civitelli 2008).

Moreover, the present results demonstrate that Cx43 haploinsufficiency minimizes the bone response to ET-1. Contrary to Cx43<sup>+/+</sup> OB cells, ET-1 is ineffective to increase the proliferation rate of Cx43<sup>+/-</sup> cells. The peptide is also partially able to reduce the differentiation state in cultured Cx43<sup>+/-</sup> OB cells as confirmed by ALP activity and the synthesis level of OCN. These results validate and complete our previous study of the hFOB1.19 cell model (Niger et al. 2008) since the mitogenic effect of this peptide has been clearly shown on primary murine OB cells. Under the present experimental conditions, ET-1 treatment significantly decreases Cx43 transcript and protein levels together, leading to an uncoupling effect. Analogous chronic ET-1 effects on the amount of Cx43 have been described in other cellular models such as cortical astroglia cells (Rozyczka et al. 2005), ovarian carcinoma cells (Spinella et al. 2003), and human trophoblastic cells (Cronier et al. 1999). In the last-mentioned, this uncoupling effect is also linked to an impaired trophoblast differentiation process. We should point out that other soluble factors present in the bone microenvironment, such as PTH, have been described to modulate Cx43 amount and function in OB cells (Chung et al. 2006).

The first explanation for the impaired ET-1 effects in Cx43<sup>+/-</sup> OB cells is an alteration in the synthesis profile of the ET receptor subtypes. However, as we have previously demonstrated in the same cellular model (Geneau et al. 2007), no significant differences have been measured by means of RT-qPCR analysis between both genotypes. Interestingly, the ETA receptor subtype was always present at a higher level, whatever the genotype. Second, ET receptors might be coupled to multiple transduction pathways, even if, in OB cells, previous work has clearly shown that ET-1 mainly involves a protein kinase C (PKC)

transduction pathway (Matsuno et al. 1998; Tokuda et al. 2007; Geneau et al. 2007). Thus, an alteration in these transduction pathways can also be postulated. As previously demonstrated, the activation of PKC $\gamma$  stimulates its interaction with Cx43 in lipid rafts resulting in a decreased GJIC in bovine epithelial cells (Lin et al. 2003). Hence, Cx43 haploinsufficiency might alter the putative interactions of this gap-junctional protein with several isoforms of PKC implicated in ET-1 transduction pathways and, thereafter, cause the reduced impact of this peptide on Cx43<sup>+/-</sup> OB cells. An alteration of GJIC attributable to a reduced Cx43 level might also induce a displacement of the different sets of transcription factors activated through the ET-1 transduction pathway, such as the Sp1/Sp3 couple. Indeed, a modulation of Sp1/Sp3 complex recruitment on the OCN and collagen I  $\alpha$ 1 promoters has been described when GJIC is perturbed (Stains et al. 2003). The disturbed ET-1 effects might also be attributable to a functional alteration of cellular mechanisms involved in calcium homeostasis. In most cell types, the activation of a calcium influx through plasma membrane channels has been reported after ET-1 interaction with its specific receptors. In OB cells, we have previously shown that nifedipine, a specific L-type voltage-sensitive calcium channel blocker, is unable to decrease the ET-1-induced calcium rise in Cx43<sup>+/-</sup> cells, contrary to their wild-type littermates (Geneau et al. 2007). Apart from ET-1, a similar modulation of the OB differentiation process, following the level of Cx43 expression, synthesis, and function, has been described with another osteogenic modulator; thus, the anabolic effect of PTH treatment has been shown to be reduced in conditionally OB-deleted Col/Cre Cx43 mice (Chung et al. 2006).

In conclusion, the present study supports the view that ET-1 has pronounced effects on fully differentiated OB cells. The impact on bone mineralization attributable to physiopathological soluble factors might then vary with the OB phenotypic heterogeneity linked to the location in the skeleton. Moreover, in addition to its roles in mechano-transduction (Saunders et al. 2003) or in OB differentiation control (Civitelli 2008), Cx43 can modulate OB sensitivity to soluble factors. Further studies are needed to confirm the hypothesis that fully differentiated OB cells are preferential targets for soluble factors. The Cx-linked effects of ET-1 should be investigated during the terminal differentiation of OB cells, especially in osteocyte cell lines such as MLOY4, and the action of another soluble factor such as PTHrP could also be considered.

**Acknowledgements** The authors thank Dr. Luc Malaval (INSERM U890, Université Jean-Monnet, Saint-Etienne, France) for his expert assistance during the microcomputed X-ray tomography experiments and Dr. Vincent Chen (University of British Columbia, Vancouver, Canada) for expert editing of the manuscript.

## References

- Chung DJ, Castro CH, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szejnfeld VL, Willecke K, Theis M, Civitelli R (2006) Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci* 119:4187–4198
- Civitelli R (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473:188–192
- Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH (1993) Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest* 91:1888–1896
- Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J, Malassine A (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135:402–408
- Cronier L, Dubut A, Guibourdenche J, Malassiné A (1999) Effects of endothelin on villous trophoblast differentiation and free intracellular calcium. *Placenta* 20:69–86
- Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT, Andersen J, Grine EA, Hertzberg EL, Brink PR (1995) Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *J Bone Miner Res* 10:881–889
- Flenniken AM, Osborne LR, Anderson N, Ciliberti N, Fleming C, Gittens JE, Gong XQ, Kelsey LB, Lounsbury C, Moreno L, Nieman BJ, Peterson K, Qu D, Roscoe W, Shao Q, Tong D, Veitch GI, Voronina I, Vukobradovic I, Wood GA, Zhu Y, Zimigib RA, Aubin JE, Bai D, Bruneau BG, Grynepas M, Henderson JE, Henkelman RM, McKerlie C, Sled JG, Stanford WL, Laird DW, Kidder GM, Adamson SL, Rossant J (2005) A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development* 132:4375–4386
- Geneau G, Defamie N, Mesnil M, Cronier L (2007) Endothelin-1-induced Ca(2+) mobilization is altered in calvarial osteoblastic cells of Cx43(+/-) mice. *J Membr Biol* 217:71–81
- Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C (2004) Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72:250–259
- Hiruma Y, Inoue A, Shiohama A, Otsuka E, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H (1998) Endothelins inhibit the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through the A-type endothelin receptor. *Am J Physiol* 275:R1099–R1105
- Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW (1998) Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol* 143:1725–1734
- Jimeno A, Carducci M (2004) Atrasentan: targeting the endothelin axis in prostate cancer. *Expert Opin Invest Drugs* 13:1631–1640
- Karsenty G (2008) Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:183–196
- Kitano Y, Kurihara H, Kurihara Y, Maemura K, Ryo Y, Yazaki Y, Harii K (1998) Gene expression of bone matrix proteins and endothelin receptors in endothelin-1-deficient mice revealed by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 13:237–244
- Kitten AM, Harvey SA, Criscimagna N, Asher M, Lee JC, Olson MS (1997) Osteogenic protein-1 downregulates endothelin A receptors in primary rat osteoblasts. *Am J Physiol* 272:E967–E975
- Koval M, Harley JE, Hick E, Steinberg TH (1997) Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol* 137:847–857
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381–388
- Laird DW (2008) Closing the gap on autosomal dominant connexin-26 and connexin-43 mutants linked to human disease. *J Biol Chem* 283:2997–3001
- Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R (1998) Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9:2249–2258
- Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R (2000) Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 151:931–944
- Li Z, Zhou Z, Saunders MM, Donahue HJ (2006) Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol* 290:C1248–C1255
- Lin D, Zhou J, Zelenka PS, Takemoto DJ (2003) Protein kinase Cgamma regulation of gap junction activity through caveolin-1-containing lipid rafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5259–5268
- Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE (2005) GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 204:585–593
- Marie PJ (2002) Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 190:297–305
- Matsuno M, Kozawa O, Suzuki A, Tokuda H, Kaida T, Matsuno H, Niwa M, Uematsu T (1998) Involvement of protein kinase C activation in endothelin-1-induced secretion of interleukin-6 in osteoblast-like cells. *Cell Signal* 10:107–111
- Niger C, Geneau G, Fiorini C, Defamie N, Pointis G, Mesnil M, Cronier L (2008) Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation: influence of connexin-43 expression level. *J Cell Biochem* 103:110–122
- Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ (1989) A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 92:513–518
- Pirzer R, Tilly N, Sommer U, Liegibel U, Grafe I, Nawroth P, Kasperk C (2005) Endothelin-1 levels in patients with Paget's disease of bone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:598–601
- Raisz LG (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115:3318–3325
- Reaume AG, Sousa PA de, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831–1834
- Roodman GD, Windle JJ (2005) Paget disease of bone. *J Clin Invest* 115:200–208
- Rozyczka J, Figiel M, Engele J (2005) Chronic endothelin exposure inhibits connexin43 expression in cultured cortical astroglia. *J Neurosci Res* 79:303–309
- Saunders MM, You J, Zhou Z, Li Z, Yellowley CE, Kunze EL, Jacobs CR, Donahue HJ (2003) Fluid flow-induced prostaglandin E2 response of osteoblastic ROS 17/2.8 cells is gap junction-mediated and independent of cytosolic calcium. *Bone* 32:350–356
- Schiller PC, Mehta PP, Roos BA, Howard GA (1992) Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 6:1433–1440
- Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA (2001) Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28:362–369
- Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A (2003) Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278:41294–41301
- Stains JP, Civitelli R (2005) Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 1719:69–81
- 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* 278:24377–24387

- Takuwa Y, Masaki T, Yamashita K (1990) The effects of the endothelin family peptides on cultured osteoblastic cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun* 170:998–1005
- Tarquini R, Perfetto F, Tarquini B (1998) Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? *Calcif Tissue Int* 63:118–120
- Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O (2007) (-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation. *FEBS Lett* 581:1311–1316
- Upham BL, Suzuki J, Chen G, Wang Y, McCabe LR, Chang CC, Krutovskikh VA, Yamasaki H, Trosko JE (2003) Reduced gap junctional intercellular communication and altered biological effects in mouse osteoblast and rat liver oval cell lines transfected with dominant-negative connexin 43. *Mol Carcinog* 37:192–201
- Wade MH, Trosko JE, Schindler M (1986) A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* 232:525–528
- Wang YH, Liu Y, Rowe DW (2007) Effects of transient PTH on early proliferation, apoptosis, and subsequent differentiation of osteoblast in primary osteoblast cultures. *Am J Physiol* 292:E594–E603
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725–737
- 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* 133:3629–3369
- Ziambaras K, Lecanda F, Steinberg TH, Civitelli R (1998) Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13:218–228

# The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells

Coralie Lamiche · Jonathan Clarhaut · Pierre-Olivier Strale · Sophie Crespin · Nathalie Pedretti · François-Xavier Bernard · Christian C. Naus · Vincent C. Chen · Leonard J. Foster · Norah Defamie · Marc Mesnil · Françoise Debiais · Laurent Cronier

Received: 6 July 2011 / Accepted: 1 November 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** For decades, cancer was associated with gap-junction defects. However, more recently it appeared that the gap junction proteins (connexins) could be re-expressed and participate to cancer cell dissemination during the late stages of tumor progression. Since primary tumors of prostate cancer (PCa) are known to be connexin deficient, it was interesting to verify whether their bone-targeted metastatic behaviour could be influenced by the re-expression

of the connexin type (connexin43) which is originally present in prostate tissue and highly expressed in bone where it participates to the differentiation of osteoblastic cells. Thus, we investigated the effect of the increased Cx43 expression, by retroviral infection, on the metastatic behaviour of two well-characterized cell lines (PC-3 and LNCaP) representing different stages of PCa progression. It appeared that Cx43 differently behaved in those cell lines and induced different phenotypes. In LNCaP, Cx43 was functional, localized at the plasma membrane and its high expression was correlated with a more aggressive phenotype both in vitro and in vivo. In particular, those Cx43-expressing LNCaP cells exhibited a high incidence of osteolytic metastases generated by bone xenografts in mice. Interestingly, LNCaP cells were also able to decrease the proliferation of cocultured osteoblastic cells. In contrast, the increased expression of Cx43 in PC-3 cells led to an unfunctional, cytoplasmic localization of the protein and was correlated with a reduction of proliferation, adhesion and invasion of the cells. In conclusion, the localization and the functionality of Cx43 may govern the ability of PCa cells to metastasize in bones.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10585-011-9434-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Lamiche · J. Clarhaut · P.-O. Strale · S. Crespin · N. Defamie · M. Mesnil · F. Debiais · L. Cronier (✉)  
CNRS, UMR6187, Institute of Cellular Physiology and Biology,  
University of Poitiers, Bat. B36, 1, rue G. Bonnet, BP 633,  
86022 Poitiers Cedex, France  
e-mail: Laurent.Cronier@univ-poitiers.fr

J. Clarhaut  
INSERM CIC 0802, C.H.U. la Milétrie, Poitiers, France

N. Pedretti · F.-X. Bernard  
BIOAlternatives, Gençay, France

C. C. Naus · V. C. Chen  
Department of Cellular and Physiological Sciences, Life  
Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver,  
BC, Canada

V. C. Chen · L. J. Foster  
Centre for High-Throughput Biology, University of British  
Columbia, Vancouver, BC, Canada

F. Debiais  
Department of Rheumatology, C.H.U. la Milétrie, Poitiers,  
France

**Keywords** Connexin43 · Prostate cancer · Bone metastasis · Heterocellular communication

## Abbreviations

$\mu$ CT	Micro-Computed Tomography
ALP	Alkaline phosphatase
BMP3	Bone morphogenic protein-3
Cx43	Connexin43
DAG1	Dystroglycan-1
Gap-FRAP	Gap-fluorescence recovery after photobleaching
GJIC	Gap junctional intercellular communication

LGALS1	Galectin-1
MDP	Methylene diphosphonate
MMP13	Matrix metalloproteinase-13
NOV/CCN3	Nephroblastoma overexpressed gene/ connective tissue growth factor3
OB	Osteoblastic
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PCa	Prostate cancer
PLAT	Plasminogen activator tissue-type
PTX-3	Pentraxin-related protein-3
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand
TIMP2	MetalloProteinase inhibitor-2

## Introduction

Metastasis remains the main cause of morbidity and death (90%) from solid tumors. It is thus important to elucidate the molecular mechanisms which are responsible for tumor cell mobility, homing and colonization of specific organ sites [1]. However, despite the fact that cell interactions are involved in those processes, only a few studies have examined what could be the role of proteins implicated in direct cellular interactions [2, 3]. Among possible candidates, gap junction proteins, named connexins (Cx), are thought to enable cancer cells to adapt to different extracellular environments [4, 5]. Members of a multigene family, Cxs are involved in gap junctional intercellular communication (GJIC) and coordinate cell activities during development and differentiation [6]. Moreover, recent data demonstrated alternative functions for Cxs as hemichannels [7] or inducer of protein interactions [8]. Since loss of tissue homeostasis frequently accompanies tumor growth, gap junctions were suggested to be involved in carcinogenesis [9]. Such an assumption has been then confirmed by numerous data showing that cancer phenotype is indeed associated with a decreased capacity of GJIC in cancer cells both *in vitro* and *in vivo* [10–12]. In the context of primary solid tumor, Cxs (particularly Cx43) presented anti-proliferative effects in a wide range of cancer cell types and were frequently classified as tumor suppressor genes [13–15]. However, recent evidences suggest that the role of Cxs is more complex in cancer since they could be involved differently at different stages of tumor progression. For instance, Cx43 would play an active role in migration of cancer cells [16] by increasing their adhesion to the stroma. Moreover, they could also participate in breast cancer cell spreading by establishing heterocellular

communication with vascular endothelial cells. This would increase the diaporesis needed for cancer cells to metastasize [17, 18]. Finally, as demonstrated for a human breast carcinoma cell line metastasizing to bones, it appears that heterocellular GJIC can occur with human osteoblastic (OB) cells [19]. Interestingly, transcriptome analyses of osteotropic breast cancer cells have revealed that Cx43 was up-regulated in metastatic cells that are believed to acquire bone cell-like properties (osteomimicry). This increased Cx43 expression was confirmed by immunohistochemistry in bone metastatic lesions from patients [20]. Then, Cxs could play multiple roles depending on the stage of carcinogenesis [4, 5]. However, contrary to their involvement in cell growth control, only few studies investigated so far the function of Cxs during the last steps of tumor progression.

Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed cancer in males and 80% of patients with advanced disease have bone metastasis mainly characterized by osteoblastic lesions [21, 22]. As seen in the majority of cancers, alterations in cellular interactions were demonstrated in PCa cells [2, 3]. In normal differentiated epithelial prostatic cells, Cx32 and Cx43 are the main Cxs expressed [23]. These Cxs were also localized at cell–cell contacts in epithelial cells of well differentiated prostate tumors, but presented either an alteration of expression or an impaired trafficking as the tumors progressed to more invasive and undifferentiated stages [23, 24]. In PCa cells, Cx43 was also involved in sensitivity to pro-apoptotic agents [25] and heterocellular coupling with fibroblasts controlling migration ability during invasion [26]. In bones, an essential role was also attributed to Cx43, while its expression was directly related to the differentiation state of osteogenic cells [27] and to the mineralization process [28]. Altogether, these data suggest that Cx43 may have a role in heterotypic interactions between PCa and OB cells during bone metastasis formation and/or progression.

In this study, after retroviral infection, we characterized Cx43-induced phenotypic changes in two PCa cell lines with different invasive characteristics (LNCaP and PC-3) and compared their bone impact *in vivo* after intratibial injection in Nude mice and *in vitro* after cocultures with OB cells. We found that Cx43 localization and function differ in those cell lines since GJIC is reestablished only in Cx43-expressing LNCaP cells. Interestingly, these communicating LNCaP cells exhibit increased aggressive characteristics whereas the more aggressive cells, PC-3, present a reduction of their tumor phenotype after Cx43 overexpression (proliferation, adhesion and invasion). In the bone xenograft model, Cx43 overexpression in LNCaP cells also induces a significant rise in the incidence of osteolytic metastasis that is associated with a PCa-induced reduction of OB cells number in coculture.

## Materials and methods

### Cell lines and stable transfection

LNCaP and PC-3 cell lines were purchased from ATCC (CRL-1435 and CRL-1740, Manassas, VA) and were grown in DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with high glucose 4.5 g/l supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, Levallois-Perret, France), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Lonza). PCa cells overexpressing Cx43 (PC-3 Cx43 or LNCaP Cx43) were prepared as previously described [29] by means of retroviral particles containing human Cx43. Control cells were obtained using an empty pMSCV-puro vector (PC-3 mock or LNCaP mock). The stable Cx43 overexpression in the total cell population was checked over 10 passages at RNA and protein levels.

### Coculture with osteoblastic (OB) cells

OB cells were isolated from calvaria of 3–5 days-old mice after sequential digestions as previously described [30]. After 6 days of primary culture in DMEM with 20% FBS, OB cells were trypsinized in a 0.05% trypsin/0.15% EDTA solution, seeded at  $25 \times 10^3$  cells/ml in a differentiating medium (DMEM supplemented with 10% FBS and 10 mM sodium β-glycerophosphate) and cultured at 37°C. All reagents were from Sigma (St. Louis, MO).

To study the impact of PCa cells (mock and Cx43) on OB cells proliferation and differentiation, cocultures with or without contact were carried out and compared to OB cells cultured alone. The initial ratio was 1:10 in favor of OB cells in both coculture conditions, but in the bilayer configuration (no contact), OB cells were separated from PCa cells with a cell culture insert (PET, 0.4 µm pore size, BD Biosciences, Pont-de-Claix, France), as illustrated in Fig. 4b.

### Real-time quantitative RT-PCR

RNA extraction, reverse transcription and RT-qPCR were performed as previously detailed [31]. The primers are described in supplemental Data, Table 1. Results are displayed in the relative expression (percentage) compared to GAPDH expression and normalized relative to control cells. Primer validation and species specificity were checked using cDNA from human or mouse OB primary culture (data not shown).

### Immunoblotting

As previously described [30], 50 µg of proteins were separated on 12% polyacrylamide-SDS gel and electroblotted on nitrocellulose membrane. Blots were probed overnight at 4°C with monoclonal antibody against Cx43 (1/1,000;

Transduction Laboratories, Lexington, KY). Then, membranes were incubated with goat anti-mouse HRP-conjugated antibody (1/5,000) for 1 h at room temperature (Dako, Glostrup, Denmark). Bound antibodies were detected using an enhanced-ECL kit as specified by the manufacturer (ThermoScientific, Rockford, IL).

### Immunocytochemistry

To detect Cx43, procedure was modified from Geneau et al. [30] using cold acetone fixation (10 min) and propidium iodide for nuclear counterstaining. Samples were observed on a confocal microscope (FV1000 Olympus IX-81, Tokyo, Japan). All controls performed by omitting the primary antibody were negative.

### Proliferation and apoptotic assays

Proliferation assay was performed according to Geneau et al. [30]. One OD unit corresponds to  $5 \times 10^4$ ,  $3.3 \times 10^4$  and  $2.8 \times 10^4$  cells for OB, PC-3 and LNCaP respectively. Results on PCa cells were also confirmed by XTT proliferation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Assessment of Cx43 impact on apoptosis was performed by means of the FITC-annexinV apoptosis detection kit according to recommendations of the manufacturer (BD Biosciences). After incubation with propidium iodide and FITC-conjugated annexinV, samples were analyzed on a FACSCanto-II flow cytometer using the FACSDiva-II software (BD Biosciences).

### Adhesion and invasion assay

For adhesion assay,  $3 \times 10^3$  PCa cells were seeded on vitronectin or fibronectin-coated (0.5 µg/ml) wells in 16-wells Lab-tek® chamber slide system (Nunc, Rochester, NY). Cells were allowed to attach for 2 h in DMEM with 10% FBS and processed as reported in [32]. Cell invasion through 25 µg Matrigel® (BD Biosciences) was assessed using Boyden chambers with 8 µm pores (PET, BD Biosciences). After 24 h incubation, cells on the upper surface were removed and cells attached to the lower surface were fixed, stained with eosin/haematoxylin. To ascertain the implication of Cx43 in invasive properties, control experiments were performed in the presence of 10 µM GM6001 (functional inhibitor of MMP1, 2, 3, 8 and 9; EMD chemicals, Giggstown, NJ). For both techniques, cell number was measured by means of ImageJ software.

### Gap junction functionality

For qualitative GJIC evaluation, donor cells were labeled with a diffusible fluorescent dye (5 µM calcein/AM,

Sigma) together with a non-diffusible membrane marker (10  $\mu$ M DiI-C18(3), Invitrogen) as previously detailed [33]. After washing, cells were trypsinized, resuspended in culture medium and  $10^3$  fluorescent cells were laid on recipient cells. The transfer of dye was visualized after 4 h at 37°C on the Olympus confocal system.

The degree of homocellular GJIC between PCa cells was also measured by means of the gap-FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) method [34]. Briefly, cultured PCa cells were loaded with a diffusible fluorescent tracer (7  $\mu$ g/ml 6-carboxyfluorescein, Sigma) and the fluorescence of investigated cells was dramatically decreased by a laser beam (photobleaching at 405 nm) in order to study the recovery by diffusion from adjacent cells and to measure the diffusion rate constant *k*.

### Secretome analysis

Proteins (1 mg) from the serum-free medium of PCa cells were digested overnight with trypsin (1  $\mu$ g/50  $\mu$ g protein; Promega, Madison, WI). After purification through C18 columns, resulting peptides were isotopically labeled by peptide-level dimethylation induced by formaldehyde treatment [35]. In order to compare quantitatively the peptides according to their cell origin (mock and Cx43), two isotopologs of formaldehyde (200 mM) were used (15  $\mu$ l/sample); a light one (CH<sub>2</sub>O) to label the peptides from Cx43-PCa cells and a heavy deuterated one (CD<sub>2</sub>O) to label the peptides from mock cells [35]. Labeled peptides were analyzed as described [35] on a linear trapping quadrupole-Orbitrap mass spectrometer with Xcalibur software (ThermoFisher). Fragments spectra were identified using Mascot (v.2.2, Matrix Science) and quantitative ratios were extracted using MSQuant (<http://msquant.sourceforge.net/>). For each type of secreted protein, results are presented as ratios of Cx43-transfected versus mock cells.

### ALP activity

Intracellular alkaline phosphatase activity was measured by colorimetry as described [36] and normalized against total cellular protein content determined by DC Protein Assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

### Xenograft model and bone impact analyses

All these procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Union (CEE 86-609) and verified by the local Animal Care Committee. PCa cells ( $6 \times 10^5$  in 5  $\mu$ l PBS) were injected into the right tibia of male Balb/c Nude mice (7 weeks old; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) under anesthesia (100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine, Sigma). The left tibia

received a control injection with PBS. After 20–40 days, anesthetized mice were imaged by means of micro X-ray computed tomography ( $\mu$ CT) with a CT 120 (GE Healthcare, France). 360 X-ray projections were collected in 1° increments (80 kVp; 450  $\mu$ A; 120 ms exposure time for 26 min total scan time). Projection images were reconstructed into 3D volumes (10,243 voxels, 93  $\mu$ m resolution) on a 4PCreconstruction cluster using a modified tent-FDK conebeamalgorithm (GE Healthcare reconstruction software). Three-dimensional data were processed and rendered (isosurface/maximum intensity projections) using MicroView (GE Healthcare). The procedure for bone volume measurement after tibia injection is detailed in supplemental Data, Fig. 2.

Osteogenic sites were analyzed by Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). [<sup>99m</sup>Tc]-MDP (Methylene Di Phosphonate) is a conventional bone scintigraphic agent that selectively concentrates in bone thanks to its chemical adsorption onto, and into, the crystalline structure of hydroxyapatite. After 3–6 weeks, mice were injected in the tail vein with [<sup>99m</sup>Tc]-MDP with 18 MBq. Images were recorded 60 min after injection of [<sup>99m</sup>Tc]-MDP. Mice were anesthetized with 1.5–2% isoflurane in air and transferred to a Nano SPECT/CT (Bioscan, Washington, DC). Image acquisition parameters were 24 projections and 30–60 s/image depending upon activity injected in the animals. Dedicated software (InVivoScope) was used to reconstruct 3D images and to quantify radioactivity. Image analysis was qualitative (comparison with  $\mu$ CT), and quantitative by drawing volumes of interest around tumors in both legs, with results expressed as percentage of injected doses.

### Statistical analysis

All reported data are expressed as mean  $\pm$  SEM. One-way analysis of variance followed by Tukey's test was performed for RT-qPCR, whereas Student's *t*-test for unpaired data was used in other cases. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

## Results

### Cx43 leads to functional communication only in LNCaP cells

Cx43 overexpression in PC-3 (PC-3 Cx43) and LNCaP (LNCaP Cx43) cells was confirmed by RT-qPCR and western blotting (Fig. 1a, b). Native and mock PC-3 and LNCaP cells presented low level of Cx43 expression (mRNA and protein level; Fig. 1a, b; not shown for native cells) and no functional GJIC (Fig. 1d). Western blot

analyses revealed that retroviral infection induced a stable physiological increase of Cx43 by  $3.09 \pm 0.34$  and  $3.35 \pm 0.57$  fold over the endogenous expression in the total population of PC-3 and LNCaP cells, respectively (Fig. 1b). No compensation or alteration of expression was demonstrated for other Cxs previously described in PCa cells including Cx26, Cx32, Cx45 (Supplemental Data, Fig. 1a). In terms of localization, LNCaP Cx43 cells exhibited a characteristic punctuate immunostaining at appositional membranes and inside cells whereas Cx43 immunofluorescence was restricted to the cytoplasmic compartment in PC-3 Cx43 cells (Fig. 1c). This differential localization of Cx43 leads to functional divergences as confirmed by preloading and gap-FRAP experiments showing GJIC only between LNCaP Cx43 cells (Fig. 1d and supplemental Data, Fig. 1b). All data obtained for LNCaP Cx43 correspond to a functional GJIC quantitatively similar to intercellular coupling of other epithelial or normal cells in terms of permeability (diffusion rate constant  $k = 0.225 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ ) and of percentage of coupled cells [30, 34].

#### Cx43 induces contrasting phenotypic changes in LNCaP and PC-3 cells

The contribution of Cx43 expression level on tumoral characteristics of PCa cells was analyzed in vitro after overexpression in both cell lines. Cx43 decreases the proliferation rate of PC-3 cells by half after 4 days of culture. In contrast, no significant effects could be demonstrated during a 1–6 days period for LNCaP cells (Fig. 2a). This effect on cell number was not associated with increased apoptosis since the viability of PCa cells was not affected by retroviral infection in Cx43 and mock cells (Fig. 2b and supplemental Data, Fig. 1c). The aggressive phenotype of PCa cells was evaluated by means of adhesion to different matrix components and by invasion ability in Boyden chambers (Fig. 2c, d). As expected, PC-3 presented a more pronounced adhesive and invasive properties than LNCaP cells in our conditions. Interestingly, PC-3 Cx43 cells presented a significant reduction of adhesion on vitronectin (–35%) and fibronectin (–31%) as well as of the invasion ability (–44%). On the contrary, the aggressiveness of LNCaP cells was clearly increased after Cx43 overexpression. Indeed, LNCaP Cx43 displayed an increased adhesion on vitronectin and fibronectin compared to mock cells and were more invasive through Matrigel® (+70% compared to mock cells). In our experimental conditions, the significant effects on invasive ability were not linked to migration properties because of their abolition in the presence of GM6001, a functional blocker of MMPs (supplemental Data, Fig. 1d). To complete the characterization of PCa Cx43 cells, comparative proteomic approach was made for identifying

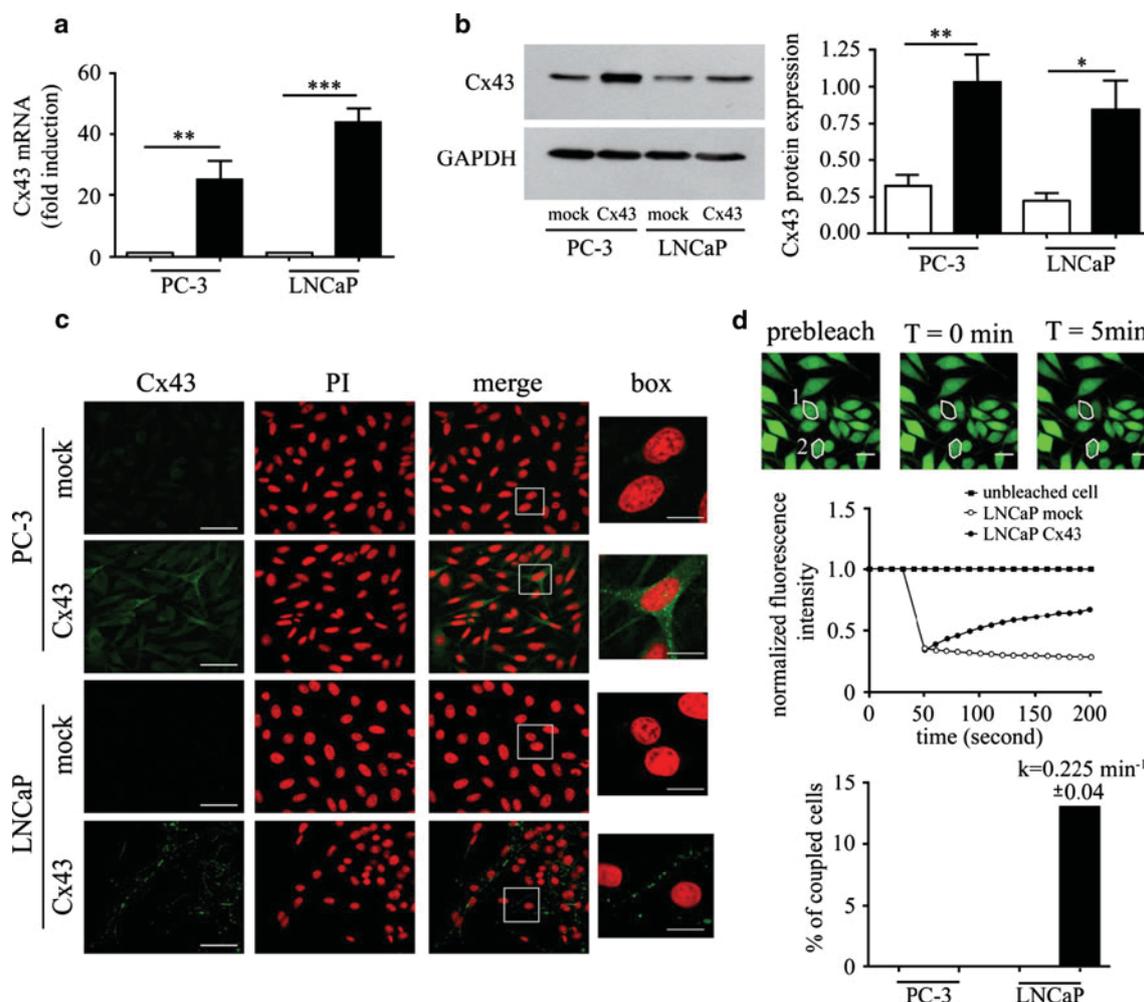
secreted molecules implicated in invasion or metastatic processes (Fig. 2e, f). The layout of secreted molecules by functional groups (Supplemental Data, Table 2) showed that molecules implicated in collagen degradation (MMP13, PLAT and TIMP2) exhibited variations in LNCaP Cx43 cells towards an invasive phenotype. Furthermore, in LNCaP Cx43 cells (Fig. 2f), a high proportion of factors that were already described in prostate cancer progression or bone metastasis (PTX3, DAG-1, BMP3 and LGALS1) presented the same hostile profile. Finally, consistently with cell viability assays, PC-3 Cx43 cells presented an increased expression of antimitotic factors like NOV (Fig. 2e). Altogether, in vitro data indicate that aggressive properties of PC-3 cells are reduced by Cx43 overexpression whereas they are augmented in LNCaP cells.

#### Cx43 increases the aggressiveness of LNCaP in the bone context

To evaluate the influence of Cx43 on the bone lesions due to PCa cells, we generated intra-osseous xenografts of PCa cells and followed in parallel the bone integrity and remodeling by micro computed tomography ( $\mu$ CT) and scintigraphy (SPECT-CT), respectively. After intratibial injection of  $6 \times 10^5$  cells, tumor incidence for LNCaP Cx43 cells was greatly increased compared to mock cells (85 vs 22%) while PC-3 cells induced tumor growth in bone context whatever the genotype (Fig. 3a). However, no difference in tumor size was measured between the PCa cell types (1 cm diameter before euthanasia). When a tumor developed, tomographic analysis demonstrated osteolysis in all cases after 20 days (arrow heads in Fig. 3b) requiring euthanasia as early as day 31 and day 40 for PC-3 and LNCaP cells respectively. Quantitative  $\mu$ CT analysis allowed measuring the tibia bone volume (Supplemental Data, Fig. 2b). No significant difference was measured between PC-3 Cx43 and mock cells, but enhanced osteolysis was demonstrated for LNCaP Cx43 compared to mock cells (Fig. 3c). For the osteogenic aspect, no Cx43 effects on the number of mineralization sites were revealed by means of SPECT-CT analyses (Fig. 3b, d). Thus, in vivo data confirm that enhanced Cx43 expression and function in LNCaP cells induced an increased metastatic ability leading to osteolytic lesions.

#### Cx43 could modify the PCa cell impact on OB proliferation in vitro

Osteoblasts, the key cells of bone remodeling, also present functional GJIC due to Cx43 expression [30]. Therefore, the specific OB/PCa cell interaction was investigated in vitro both in direct contact and in bilayer configuration. Preloading assay demonstrated functional GJIC only

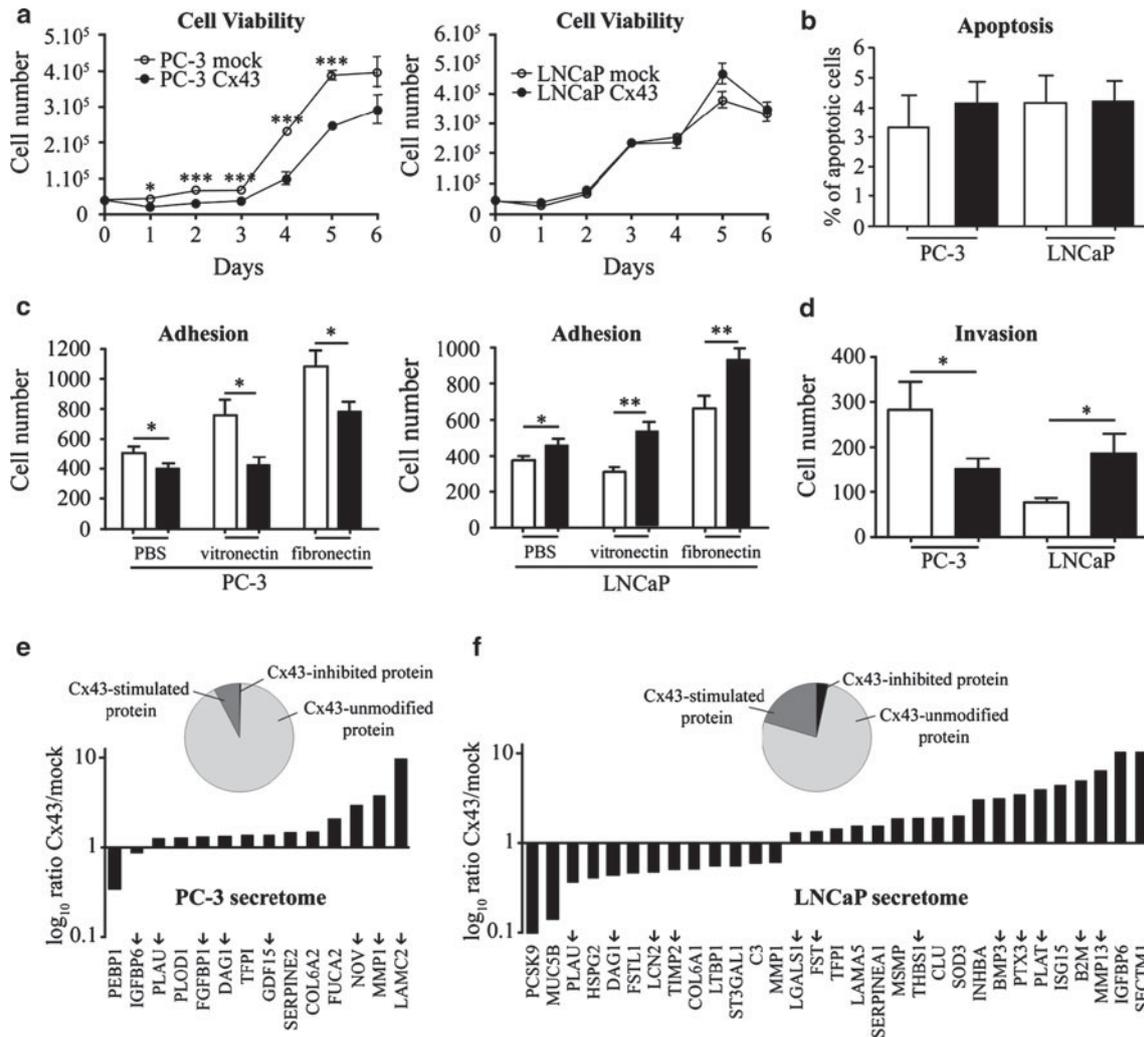


**Fig. 1** Cx43 presents different patterns of localization and function in PCa cells. Stable retroviral Cx43 expression in PC-3 and LNCaP cells was confirmed by RT-qPCR (a) and immunoblotting normalized to GAPDH (b). c Cx43 immunolocalization (green) and counterstaining of nuclei by Propidium Iodide (PI, red) demonstrated a cytoplasmic localization for PC-3 Cx43 cells and a characteristic punctuate immunostaining at cell–cell boundaries for LNCaP Cx43 cells. Enlarged images marked by the white boxes (Box) are shown on the right. d Functional homocellular coupling between PCA cells evaluated by gap-FRAP method. Top: Digital images of fluorescence distribution in LNCaP Cx43 cells at different times: Prebleach, just after photobleach ( $T = 0$  min), and after fluorescence redistribution

( $T = 5$  min). Polygon1 represents the photobleached tested cell; Polygon2 is an unbleached control cell for fluorescence recovery correction. Representative example of fluorescence recovery curves were expressed as the percentage of prebleach value vs. time in LNCaP mock (white circles), LNCaP Cx43 (black circles) and control unbleached cell (black squares). Bottom: Percentage of coupled cells with corresponding diffusion rate constants  $k$  determined from recovery curves for LNCaP Cx43 ( $n > 20$ ). White and black bars correspond to mock and Cx43-transfected cells respectively. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (c–d Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ ; for Box, scale bars = 20  $\mu\text{m}$ )

between LNCaP Cx43 and OB cells (Fig. 4a). Cocultures with two different configurations (Fig. 4b) were employed at a ratio of 1:10 for PCa and OB cells, respectively. In the contact configuration, PCa cells presented a clonal expansion (Fig. 4b) leading to restricted areas of heterocellular contact with OB cells. In these conditions, an evolution of the PCa:OB cell ratio was determined only for PC-3 mock cells (twofold increase) leading to appropriate correction during proliferation assays. In the bilayer configuration, only communication by soluble factors can occur.

In the contact configuration, Cx43 in PC-3 cells produced a slight increase of the OB cell number, whereas in the bilayer configuration it was ineffective (Fig. 4c, top). On the contrary, LNCaP Cx43 exhibited a positive effect on OB cell number compared to mock cells in the bilayer configuration (Fig. 4c, bottom). Importantly, these effects were reversed in the contact configuration and especially, a significant decrease of the proliferation rate was demonstrated when OB cells could interact with communicating LNCaP Cx43 (Fig. 4c, bottom). These data were consistent



**Fig. 2** Cx43 leads to different and opposite phenotypic changes in PC-3 and LNCaP cells. **a** Proliferation rate was assessed by means of methylene blue staining in PC-3 and LNCaP cells. Data represent means ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. Proliferation status of mock (white circles) and Cx43-transfected (black circles) were compared until 6 days. **b** Mean values of apoptotic cells for each cell type after 4 days of culture. Bars represent percentages of annexinV-positive cells from three independent experiments. **c** Adhesion assay on fibronectin and vitronectin for PC-3 (left) and LNCaP (right) transfected or not with Cx43. Controls were performed with PBS. **d** Invasion assay on Matrigel®. For adhesion and invasion assays data are presented as mean ± SEM of 4

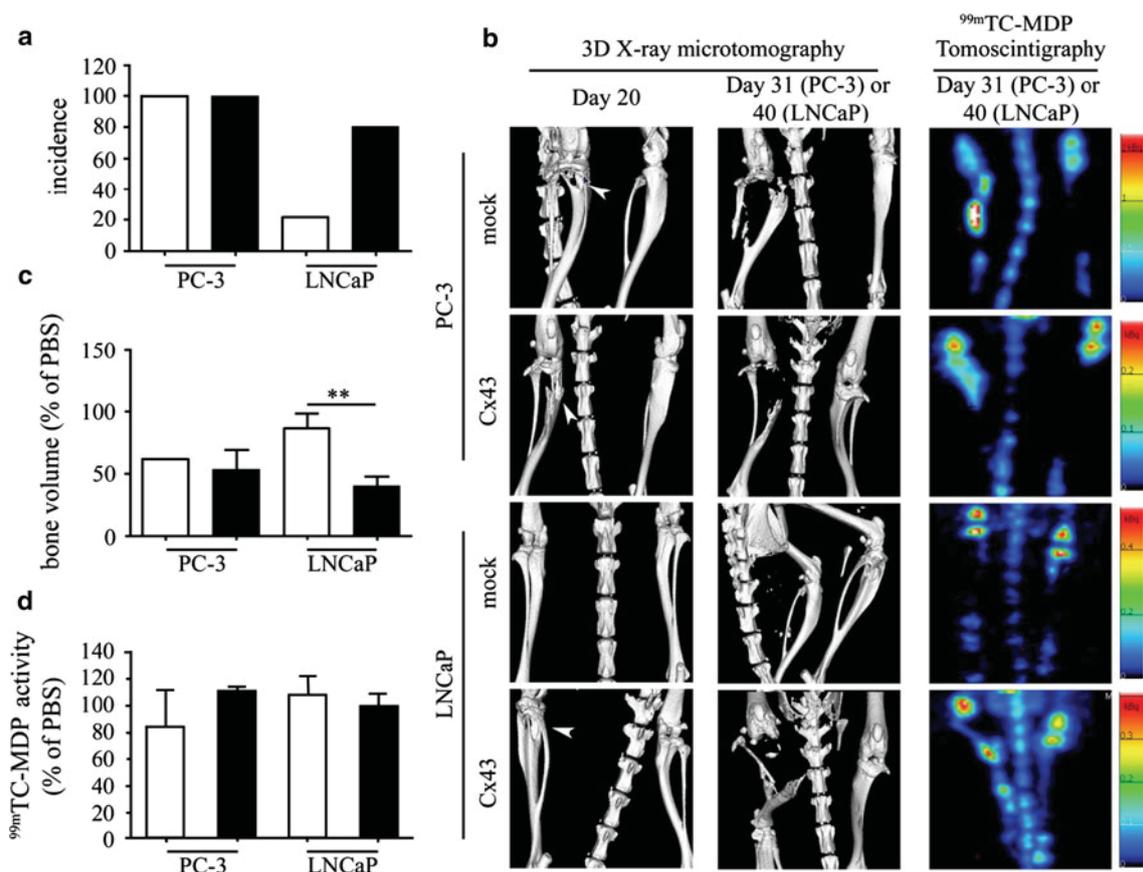
different experiments performed in triplicate. **e-f** Secretome analysis for PC-3 and LNCaP cells respectively. *Top*: Identified proteins were gathered into 3 categories (stimulated, inhibited or unmodified by Cx43 expression). *Bottom*: Comparative abundance of secreted proteins detected in culture media of PC-3 (e) and LNCaP (f) cells and presented according to the value of their ratio of Cx43:Mock for secreted proteins present in 3 independent experiments. Arrows underline the main secreted factors already implicated in prostate cancer progression and bone metastasis. White and black bars correspond to mock and Cx43-transfected cells respectively. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

with a reduction of the bone-forming cell number when Cx43 was overexpressed in LNCaP cells.

PCa cells in direct contact with OB cells increase their osteoclastic potential

To examine the effect of the prostatic Cx43 level on the OB differentiation potential, we analyzed the osteogenic capacity of individual OB cells cocultured with PCa cells. Commonly used differentiation markers like Cbfa-1,

osteocalcin (OCN), Cx43 and osteopontin (OPN) were drastically decreased whatever the configuration and the level of Cx43 expression in prostatic cells, as demonstrated by RT-qPCR (Fig. 5 and supplemental Data, Fig. 3). Only ALP expression and activity presented an increased profile in the contact configuration. As bone resorption and osteoclastic differentiation are tightly orchestrated via the RANK/receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) system, we investigated these osteoblastic criteria in presence of PCa cells. Significant



**Fig. 3** Effects of Cx43 expression on bone impact in vivo. **a** Tumor incidence of PCa Cx43 cells compared to PCa mock cells after intratibial injection in Nude mice. **b** Representative experiments of  $\mu$ CT and SPECT-CT at days 20 and 31 for PC-3 cells and days 20 and 40 for LNCaP cells. Note the absence of tibia osteolysis with LNCaP mock cells compared to large bone destruction with LNCaP Cx43 cells. Arrow heads represent osteolytic lesions in right tibiae. **c** Bone volume of tibia injected with PCa cells compared to control with PBS

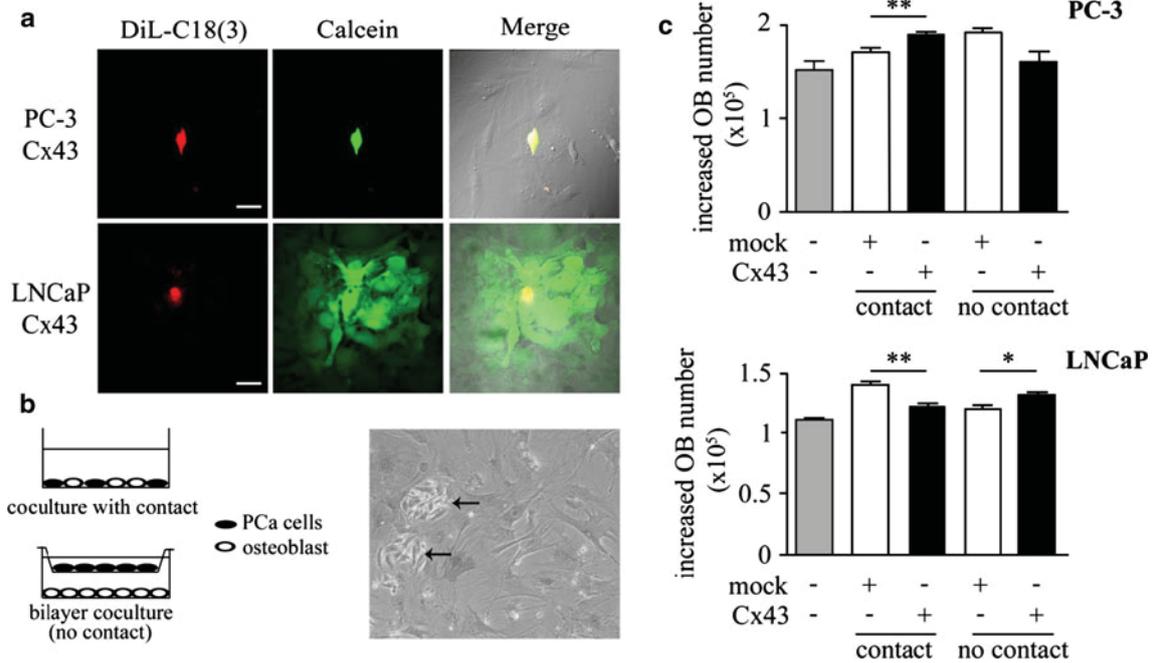
following the procedure detailed in supporting information Fig. 2. Cx43 overexpression in LNCaP increased the development of osteolytic tumor. **d** Analysis of osteogenic sites corresponding to percentage of [<sup>99m</sup>Tc]-MDP activity in tibia injected with PCa cells compared to control. 3 mice were examined for PC-3 cells, 9 for LNCaP mock and 13 for LNCaP Cx43. White and black bars correspond to mock and Cx43-transfected cells respectively. \*\* $P < 0.01$

variations were demonstrated only in contact configuration with increased RANKL (Fig. 5). We also demonstrated decreased OPG expression in presence of PCa cells whatever the configuration and the cell line (Supplemental Data, Fig. 3). The absence of significant differences between mock and transfected cells suggest a contact effect implicating adhesion molecules without a direct involvement of Cx43.

In summary, cocultures demonstrated that the presence of PCa cells induce a drastic inhibition of the osteogenic status of OB cells together with an increase of their osteolytic ability due to soluble factors and/or physical contact. In this heterocellular context, Cx43 overexpression only generates an alteration of the proliferation rate of OB cells. However, contrary to the in vivo situation with bone marrow, the in vitro approach focuses on the unique dialogue between mesenchymal and prostatic cells.

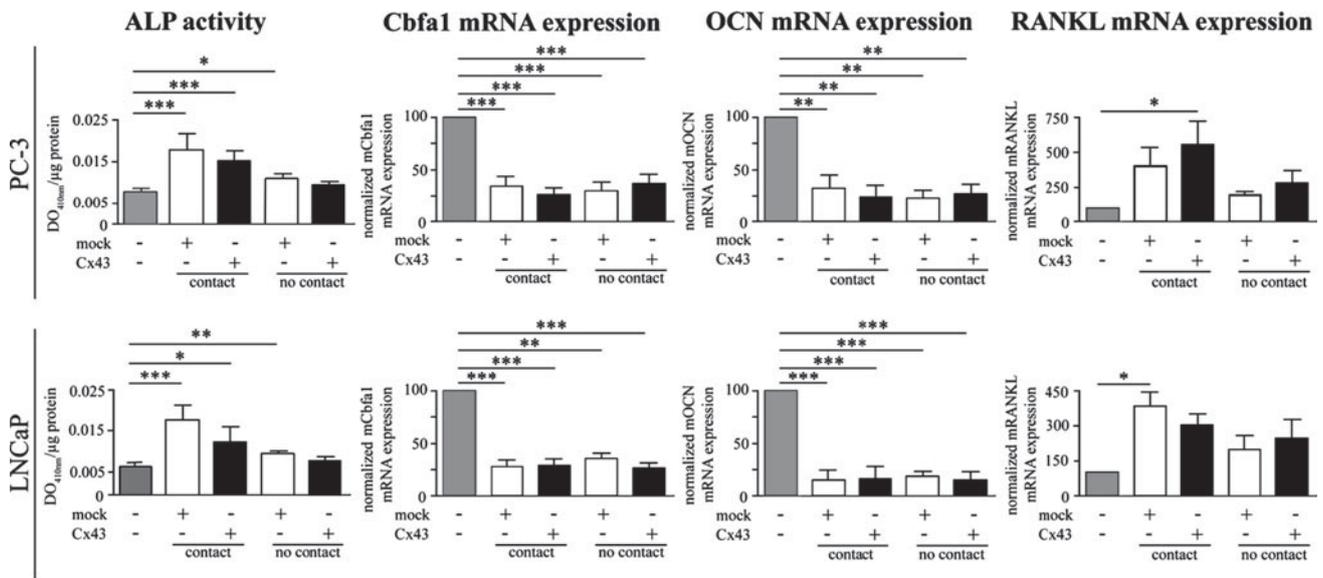
## Discussion

Given the central role of Cx43 in bone physiology and its altered expression in PCa primary tumors, we investigated the role of this Cx in bone-targeted metastasis of PCa cells. To do so, Cx43 expression was increased in two PCa cell lines representing different stages of cancer progression (PC-3 and LNCaP cells). Firstly, cellular characterization revealed a differential distribution and functionality of Cx43 in the two cell lines despite a similar increased level of expression. Consistently with previous studies [24, 25], Cx43 expression was restricted to cytoplasmic compartments in PC-3 Cx43 cells whereas it was localized at the plasma membrane in LNCaP Cx43 cells leading to the restoration of GJIC. In vitro analyses demonstrated significant differences between the cell lines in term of adhesion, invasion, proliferation and secretome profile. As



**Fig. 4** Cx43 expression affects osteoblastic proliferation in coculture conditions. **a** Demonstration of heterocellular coupling between OB cells and PCa-Cx43 cells by preloading assay. Only LNCaP Cx43 established GJIC with OB cells as shown by calcein diffusion (green) from donor cells tagged by DiL-C18(3) (red). **b** Left: Configuration of cocultures in contact and in a bilayer condition (no contact). Right: Phase-contrast photomicrograph of LNCaP Cx43 cells in contact with

OB cells after 4 days of coculture. Arrows point the islets of LNCaP Cx43 cells. **c** OB cell number after 4 days of coculture with PC-3 (top) or LNCaP (bottom). Gray bars represent OB cells cultured alone while white and black bars correspond to OB cells cocultured with mock and Cx43-transfected PCa cells respectively. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . (a–b, Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 5** Effects of PCa cells on OB cell differentiation in vitro in the contact and bilayer configurations. Impact of PCa cells on OB cell differentiation status was evaluated by ALP activity after 2 days and by RT-qPCR on Cbfa1, OCN and RANKL after 4 days of coculture. Each bar represents mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments performed in triplicate. Gray bars represent OB cells cultured alone

while white and black bars correspond to cocultures with mock and Cx43-transfected PCa cells respectively. For RT-qPCR, data correspond to the relative expression compared to GAPDH before normalization with OB cells alone. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

described in other cellular models, data on PC-3 cells illustrate the suppressive role of Cx43 on cell growth and invasion [37–40] whereas no modification of the proliferation rate was measured in LNCaP cells. Controversially, previous studies using retroviral infection with rat Cx43 cDNA [13, 24] have shown an inhibition of growth and colonies formation with LNCaP cells. However, it should be noted that some experimental conditions differ from the present study especially the use of individual selected clones instead of total population of transfected cells. If this latter aspect fit better to the heterogeneous situation of the tumor, it could minimize the measured modification of cellular proliferation. Interestingly, for LNCaP cells, our data further demonstrated that Cx43 enhances cell aggressiveness as invasion and adhesion. These unexpected observations were supported by secretome analyses that suggest increased capabilities for collagen degradation and cell invasion (MMP13 and reduced TIMP-2) and for bone metastasis ( $\beta$ 2-microglobulin, BMP3 and galectin-1). Moreover, contrary to the PC-3 situation, no significant Cx43 effects on LNCaP growth were demonstrated after 6 days of culture. These later results were in accordance with previous data obtained in similar conditions [25]. In normal and tumor cells a link between Cx43 expression and apoptotic status was demonstrated [41, 42]. However, in both PCa cell types tested, spontaneous apoptosis evaluated by annexinV/IP labeling was not affected by Cx43 as previously described [25]. Thus, in our cell models like in other cancer types, aberrant localizations of Cxs in addition to reduced expression in PCa cells could be responsible for their aggressive characteristics as previously demonstrated for androgen-independence [24].

Bone is the predominant site of distant metastasis for prostate tumor. Consequently the *in vivo* effects of Cx43 overexpression were evaluated on PCa cell-induced bone metastasis after intratibial injection. For the first time, the present data reveal an increased incidence of tumors for LNCaP Cx43 compared to mock cells, whereas no significant impact due to Cx was demonstrated in PC-3 cells. This *in vivo* assay confirmed the enhanced aggressiveness exhibited *in vitro* for LNCaP cells. Once PCa cells have metastasized to bone marrow, tumor cells are suspected to interact with OB cells, osteoclastic cells and stromal cells through both soluble factors and direct physical contact [43]. To further investigate the influence of Cx43 in this heterocellular interaction, we cocultured PCa cells with the key cells of bone remodeling (OB cells) in contact and bilayer configuration. Our data demonstrated an exclusive action of Cx43 on osteoblastic proliferation. However, in the present study, the presence of PCa cells in the microenvironment of OB cells always induced a drastic decrease of the differentiation ability as demonstrated for conventional OB markers. The fact that this inhibitory effect was observed either in

contact or in bilayer configuration for both cell lines argues for an action of soluble factors independently from GJIC. Indeed, PCa cells can alter bone homeostasis by secreting factors that directly affect osteoblast functions like BMP3 and Galectin-1 [21, 44]. Interestingly, galectin-1, increased in secretome of LNCaP Cx43 cells, was previously implicated in the differentiation of human stromal cells [45] with effects similar to our *in vitro* data (stimulated ALP activity and inhibited OCN production).

Although PCa cells mainly induce osteoblastic lesions, bone resorption is known to be a key step for bone metastasis [46] and long term inhibition of osteolytic lesions may prevent skeletal complications in patients with metastatic PCa [47]. Therefore, we analyzed the expression level of OB cytokines implicated in the regulation of osteoclastic activity. Our *in vitro* results established that the presence of PCa cells induced a significant increase of the RANKL/OPG balance only in coculture with contact configuration of OB cells. These results suggest that Cx43 could be an important partner of the interacting complex between arrested cancer cells and cells of the microenvironment in which adhesion probably occurs before the establishment of functional gap junction channels. Moreover, robust links between cadherins and Cx expression were demonstrated during cancer progression [48, 49]. Among the cadherin family, cadherin-11 was recently implicated in the osteolytic potential of PCa cells [2]. The enhancement of osteoclastic activity by physical contact of PCa with OB cells was also described in a coculture model and was blocked by N-cadherin and cadherin-11 neutralization [43].

The link between connexin expression level and metastatic behaviour was suggested by *in vitro* studies in which Cx43 level and heterocellular GJIC between tumor cells and environmental cells may control tumor cell motility, homing and diapedesis. Indeed, in the rat Dunning model, migration capacities of a highly metastatic cell line (MAT-LyLu) was greater than those of cells with low metastatic potential (AT-2) and correlated with high Cx43 expression. Interestingly, this motility was increased when PCa cells were cocultured on a fibroblast-coated surface but independently from GJIC [26]. Moreover, the induction of Cx43 in a GJIC-deficient mammary tumor cell line was able to double the diapedesis efficiency [18]. In the breast cancer context, Cx43 was also demonstrated to facilitate the tumor cell attachment to lung endothelial cells and to take part in the metastatic homing [50]. The metastatic potential of breast cancer cells was also correlated to increased heterocellular GJIC between cancer and OB cells [19]. However, it should be mentioned that during breast cancer progression to the lung, a protective effect of Cx43 was demonstrated [51, 52]. These data and the present study suggest that during the multistage scheme of metastasis, Cx43 could be implicated at different points

including crosstalk initiated at secondary sites in the bone. Finally, other connexins like Cx26 have been also associated with the progression of prostate cancer [53]. The increased Cx26 expression measured during the PCa progression was related to a role in adhesion regulation through its interaction with focal adhesion kinase. As shown in the present study for Cx43, Tate et al. also demonstrated that Cx26 and GJIC could have a role on PCa cell invasive behavior.

## Conclusion

The effects of Cx43 on PCa cell characteristics depend on its localization and function. In LNCaP cells, these modifications lead to an increased incidence of bone metastasis in vivo and a decreased proliferation of bone-forming cells in vitro. To our knowledge, the present study is the first demonstration of the increased metastatic potential of PCa cells due to Cx43. From these results, it would be interesting to check whether the metastatic cells generally communicate with cells of their target organs and if these direct interactions do play a role in the dormancy of metastasis. In other words, it would be interesting to understand if the level of heterotypic GJIC with normal host cells would play a role in the growth control of metastasized cells. Moreover, additional investigations on heterocellular interactions between osteoclastic and PCa cells are required to further identify the role of Cx43 in the severity of osteolytic bone metastasis.

**Acknowledgments** This work was supported by the French Society of Rheumatology (SFR); the “Ligue Nationale contre le Cancer” and The Canadian Institutes of Health Research (CCN, LJF). C. Lamiche is supported by grants from the region “Poitou-Charentes”. We are most grateful to Drs A. Le Pape and S. Lerondel (CIPA, CNRS, TAAM UPS 44, Orléans, France) for their expert assistance during in vivo experiments. The authors would like to thank Dr A.C. Balandre, N. Stoynov and L. Le Scouarnec for their technical support.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Gupta GP, Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679–695
- Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu FL, Logothetis CJ, Yu-Lee LY, Lin SH (2010) Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70(11):4580–4589
- Ito A, Koma Y, Uchino K, Okada T, Ohbayashi C, Tsubota N, Okada M (2006) Increased expression of connexin 26 in the invasive component of lung squamous cell carcinoma: significant correlation with poor prognosis. *Cancer Lett* 234(2):239–248
- Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M (2009) Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11(2):323–338
- Naus CC, Laird DW (2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(6):435–441
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381–388
- 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
- Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D (2004) Diversity in protein–protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta* 1662(1–2):22–41
- Loewenstein WR (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560(1):1–65
- 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):125–145
- Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak II, Mori CM, da Silva TC, Oloris SC, Garate AP, Massironi SM, Yamasaki H, Dagli ML (2004) Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25(10):1973–1982
- Pointis G, Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Segretain D (2007) Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem* 14(21):2288–2303
- 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
- Fukushima M, Hattori Y, Yoshizawa T, Maitani Y (2007) Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *Int J Oncol* 30(1):225–231
- Xu HT, Li QC, Zhang YX, Zhao Y, Liu Y, Yang ZQ, Wang EH (2008) Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 46(3):315–321
- Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, de Bouard 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
- Zhang W, DeMattia JA, Song H, Couldwell WT (2003) Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J Neurosurg* 98(4):846–853
- Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sandig M (2005) Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res* 7(4):R522–R534
- Kapoor P, Saunders MM, Li Z, Zhou Z, Sheaffer N, Kunze EL, Samant RS, Welch DR, Donahue HJ (2004) Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int J Cancer* 111(5):693–697
- Bellahcene A, Bachelier R, Detry C, Lidereau R, Clezardin P, Castronovo V (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101(2):135–148
- Logothetis CJ, Lin SH (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5(1):21–28
- Jin JK, Dayyani F, Gallick GE (2011) Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer* 128(11):2545–2561

23. Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA, Roos BA (1996) Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. *Mol Carcinog* 15(1):18–32
24. Govindarajan R, Zhao S, Song XH, Guo RJ, Wheelock M, Johnson KR, Mehta PP (2002) Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha-catenin. *J Biol Chem* 277(51):50087–50097
25. Wang M, Berthoud VM, Beyer EC (2007) Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis. *J Cell Sci* 120(Pt 2):320–329
26. Miekus K, Czernik M, Sroka J, Czyz J, Madeja Z (2005) Contact stimulation of prostate cancer cell migration: the role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts in determination of the metastatic phenotype of Dunning rat prostate cancer cells. *Biol Cell* 97(12):893–903
27. Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA (2001) Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone* 28(1):38–44
28. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R (2000) Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 151(4):931–944
29. Crespin S, Bechberger J, Mesnil M, Naus CC, Sin WC (2010) The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J Cell Biochem* 110(3):589–597
30. Geneau G, Lamiche C, Niger C, Strale PO, Clarhaut J, Defamie N, Debais F, Mesnil M, Cronier L (2010) Effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexin43: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43+/- and Cx43+/+ mice. *Cell Tissue Res* 340(1):103–115
31. Clarhaut J, Gemmill RM, Potiron VA, Ait-Si-Ali S, Imbert J, Drabkin HA, Roche J (2009) ZEB-1, a repressor of the semaphorin 3F tumor suppressor gene in lung cancer cells. *Neoplasia* 11(2):157–166
32. Potiron VA, Sharma G, Nasarre P, Clarhaut JA, Augustin HG, Gemmill RM, Roche J, Drabkin HA (2007) Semaphorin SEMA3F affects multiple signaling pathways in lung cancer cells. *Cancer Res* 67(18):8708–8715
33. Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC (1995) A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. *Biotechniques* 18(3):490–497
34. Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J, Malassine A (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135(1):402–408
35. Boersema PJ, Aye TT, van Veen TA, Heck AJ, Mohammed S (2008) Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* 8(22):4624–4632
36. Majeska RJ, Rodan GA (1982) The effect of 1, 25(OH)2D3 on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 257(7):3362–3365
37. Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H (2000) Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19(4):505–513
38. Olbina G, Eckhart W (2003) Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol Cancer Res* 1(9):690–700
39. Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC (2007) Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia* 55(15):1554–1564
40. 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):4302–4311
41. Kandouz M, Batist G (2010) Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 14(7):681–692
42. Tang M, Asamoto M, Ogawa K, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, Shirai T (2009) Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor. *Pathol Int* 59(11):790–796
43. Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K, Uehara H (2011) Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. *Br J Cancer* 104(3):505–513
44. Guise T (2010) Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment. *Semin Oncol* 37(Suppl 2):S2–S14
45. Andersen H, Jensen ON, Moiseeva EP, Eriksen EF (2003) A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18(2):195–203
46. Dougall WC, Chaisson M (2006) The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Rev* 25(4):541–549
47. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M (2004) Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96(11):879–882
48. Li Z, Zhou Z, Donahue HJ (2008) Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 25(3):265–272
49. Haass NK, Smalley KS, Herlyn M (2004) The role of altered cell–cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol* 35(3):309–318
50. Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB (2008) Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med* 6:20
51. Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, Welch DR, Donahue HJ (2001) Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospesific and heterospesific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 61(5):1765–1767
52. Plante I, Stewart MK, Barr K, Allan AL, Laird DW (2011) Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30(14):1681–1692
53. Tate AW, Lung T, Radhakrishnan A, Lim SD, Lin X, Edlund M (2006) Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *Prostate* 66(1):19–31

## Coralie Lamiche

### **Informations professionnelles :**

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC)  
UMR - CNRS 6187  
PBS, Facultés des Sciences de Poitiers  
Bâtiment B36  
1, rue Georges Bonnet  
86022 Poitiers, France  
Téléphone : 05 49 36 62 15  
Fax : 05 49 45 40 14

---

### **Situation actuelle**

**2010-2011 :** 3<sup>ème</sup> année de doctorat, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC) UMR-CNRS 6187, Université de Poitiers, Faculté des Sciences, France. Thème de recherche : Influence de la connexine 43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur le développement de métastases osseuses. Directeur de thèse : Dr Laurent Cronier, [laurent.cronier@univ-poitiers.fr](mailto:laurent.cronier@univ-poitiers.fr), 05 49 45 37 52

### **Formation universitaire et expériences associées**

**Octobre-novembre 2010 :** stage à la Faculté de Médecine Vétérinaire et Zootechnique au Laboratoire de l'Oncologie Expérimentale de Sao Paulo, Brésil. Expérimentation *in vivo*, injection intratibiale chez la souris Nude de cellules cancéreuses prostatiques surexprimant ou non Cx43 afin d'en évaluer l'impact osseux.

**2008-2011 :** préparation d'un doctorat, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC) UMR-CNRS 6187, Université de Poitiers, Faculté des Sciences, France. Thème de recherche : Influence de la connexine 43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur le développement de métastases osseuses. Directeur de thèse : Dr Laurent Cronier, [laurent.cronier@univ-poitiers.fr](mailto:laurent.cronier@univ-poitiers.fr), 05 49 45 37 52

**2007-2008 :** Master 2 en Physiologie Biologie Cellulaire et Moléculaire (mention Bien 2<sup>e</sup>/27), Université de Poitiers, France. 6 mois de pratique expérimentale dans l'équipe du docteur Bruno Constantin (Chargé de recherche au CNRS), IPBC, UMR-CNRS 6187, Poitiers France, [bruno.constantin@univ-poitiers.fr](mailto:bruno.constantin@univ-poitiers.fr): Activation des Entrées Capacitatives de Calcium dépendantes de TRPC1 par la protéine endoplasmique STIM1

**2006-2007 :** Master 1 en Physiologie Biologie Cellulaire et Moléculaire (mention Bien 1<sup>er</sup>/20), Université de Poitiers, France. 9 semaines de pratique expérimentale dans l'équipe du docteur Bruno Constantin (Chargé de recherche au CNRS), IPBC, UMR-CNRS 6187, Poitiers France, [bruno.constantin@univ-poitiers.fr](mailto:bruno.constantin@univ-poitiers.fr): Activation des Entrées Capacitatives de Calcium dépendantes de TRPC1 par la protéine endoplasmique STIM1

**2005-2006 :** Licence 3 de Biologie Générale de la Santé de la Terre et de l'Univers (mention Assez Bien), Université de Limoges, France.

**2003-2005:** Licence 1 et Licence 2 en Biologie (Sciences de la Vie, Université de Limoges, France).

## Techniques maîtrisées

### **Biochimie et Biologie Moléculaire:**

Extraction et purification d'ARN /ADN, Transcription Inverse et PCR quantitative en temps réel, PCR, Western-Blotting, Génotypage, Zymographie.

### **Biologie Cellulaire et Physiologie:**

Culture et Co-culture de cellules Eucaryotes, Culture primaire d'ostéoblaste (murin et humains), Tests de prolifération, Test d'apoptose, Test de différenciation ostéoblastique (activité PAL), Immunofluorescence, Test d'adhérence cellulaire, Microscopie confocale, Test d'invasion, Gap-frap, Test de précharge.

### **Modele In Vivo:**

Test d'angiogenèse sur la membrane chorioallantoïque de poulet (CAM), injection intratibiale chez la souris.

## Publications

- **Lamiche C**, Clarhaut J, Strale PO, Crespin S, Pedretti N, Bernard FX, Defamie N, Naus CC, Mesnil M, Debais F and Cronier L. Connexin43 modifies the metastatic potential and the bone impact of prostate cancer cells. *Clinical and experimental metastasis (impact factor 2010: 4.113)*, Nov 2011, doi :10.1007/s10585-011-9434-4.
- Strale PO, Clarhaut J, **Lamiche C**, Cronier L, Mesnil M and Defamie N. The involvement of connexin43 in human U251 glioblastoma cell invasion and migration is mediated by lipid raft containing caveolin-1. *Molecular carcinogenesis (impact factor 2010: 3.265)*, 2011, doi: 10.1002/mc.20853 (sous presse).
- Geneau G, **Lamiche C**, Niger C, Strale PO, Clarhaut J, Defamie N, Debais F, Mesnil M and Cronier L. The effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexion 43 expression: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43+/+ and Cx43+/- mice. *Cell Tissue Research (impact factor 2010: 2.804)*, 2010, 340(1):103-15.
- Sabourin J, **Lamiche C**, Vandebrouck A, Magaud C, Rivet J, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an alpha-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *The Journal of Biological Chemistry (impact factor 2010: 5.328)*. 2009, 284(52) : 36248-61.

## Communications Scientifiques par Posters

- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespin, N. Defamie, M. Mesnil, L. Cronier, F. Debais Influence of connexine43 expression on the metastatic phenotype and the bone impact of prostate cancer cells, Meeting of American Society of Bone and Mineral Research, Toronto, octobre 2010.
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespin, N. Defamie, F. Debais, M. Mesnil, L. Cronier, Influence de la Connexine43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur leur impact au niveau ostéoblastique, Journée du groupe poitevine de la recherche contre le cancer, Poitiers, juillet 2010. Prix poster.
- Strale PO, Clarhaut J, **Lamiche C**, Hervouet E, Cronier L Mesnil M and Defamie N. Glioma cells/astrocyte interaction through gap junctional intercellular communication in Caveolin-1

containing lipid rafts promotes tumor invasiveness. International symposium: cell-microenvironment interactions, Reims, France, juin 2010.

- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, L. Cronier, F. Debiais Influence de la communication jonctionnelle sur la progression des métastases osseuses du cancer de la prostate. Journée recherche Tours-Poitiers, Poitiers, France, décembre 2009.
- Strale PO, Clarhaut J, **Lamiche C**, Hervouet E, Cronier L Mesnil M and Defamie N. Effects of Cx43-targeted interference in a human glioblastoma cell line. International Gap Junction Meeting, Sedona, Arizona, USA ,juillet 2009.
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, L. Cronier, F. Debiais Influence de la communication jonctionnelle sur la progression des métastases osseuses du cancer de la prostate. Journée des doctorants, Poitiers, France, juin 2009.

## Communications Orales à congrès

- **C.Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, C. Naus, M. Mesnil, F. Debiais, L. Cronier, Connexin43 expression influences the metastatic potential and the bone impact in vivo of prostate cancer cells. International Gap Junction Conference 2011, **Ghent**, Belgique (Août 2011).
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, F. Debiais, L. Cronier, Le niveau d'expression de la Connexine43 modifie l'impact osseux des cellules cancéreuses prostatiques *in vivo*. Journée Française de Biologie des Tissus Minéralisés, **Paris**, France (Mai 2011).
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, F. Debiais, L. Cronier, Répercussions osseuses induites par la surexpression de la Connexine43 dans les cellules cancéreuses prostatiques. 23<sup>ème</sup> Congrès Français de Rhumatologie, **Paris**, France (Décembre 2010).
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, F. Debiais, L. Cronier, Influence de la Connexine43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur leur impact au niveau ostéoblastique. Journée Française de Biologie des Tissus Minéralisés, **St-Etienne**, France, (juin 2010).
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, F. Debiais, L. Cronier, Influence of Connexin43 expression on the Metastatic Phenotype and the Bone Impact of Prostate Cancer Cells. International symposium: cell-microenvironment interactions, **Reims**, France, juin 2010.
- **C. Lamiche**, J. Clarhaut, P. Strale, S. Crespín, N. Defamie, M. Mesnil, L. Cronier, F. Debiais Influence de la communication jonctionnelle sur la progression des métastases osseuses du cancer de la prostate. 22e Congrès Français de Rhumatologie, **Paris**, France (décembre 2009).

## Expérience d'enseignement

**2010-2011** : Moniteur dans le département de Physiologie de l'Université de Poitiers, France.  
Charge d'enseignement : 18h de Travaux Dirigée et 16h de Travaux Pratiques.

Travaux Dirigés:

-Electrophysiologie. 18h (Niveau L1)

Travaux Pratiques:

-Etude de l'activité électrique du nerf (nerf-muscle) 16h (niveau L2).

**2009-2010**: Moniteur dans le département de Physiologie de l'Université de Poitiers, France.  
Charge d'enseignement : 34h de Travaux Dirigée et 114h de Travaux Pratiques.

Travaux Dirigées:

- Physiologie de l'appareil urinaire. 12h (Niveau L3)
- Electrophysiologie. 18h (Niveau L1)
- Historique de la recherche sur le cancer 4h (niveau L1-L2).

Travaux Pratiques:

- Etude de l'activité électrique du nerf (nerf-muscle) 20h (niveau L2).
- Etude de l'activité électrique du nerf (nerf) 20h (niveau L1).
- Spirometrie 74h (niveau L2)

**2008-2009** : Moniteur dans le département de Physiologie de l'Université de Poitiers, France.  
Charge d'enseignement : 28h de Travaux Dirigée et 60h de Travaux Pratiques.

Travaux Dirigées:

- Connaissance du Médicaments. 8h (Niveau L3 professionnel)
- Electrophysiologie. 18h (Niveau L1)
- Historique de la recherche sur le cancer 4h (niveau L1-L2).

Travaux Pratiques:

- Etude de l'activité électrique du nerf (nerf-muscle) 40h (niveau L2).
- Etude de l'activité électrique du nerf (nerf) 20h (niveau L1).

## Participation à l'encadrement de stagiaires dans le laboratoire

- 1étudiant de niveau Master 1<sup>ère</sup> année (Poitiers), encadrement à 50% d'un stage de 6 semaines, avril-mai 2011.
- 1étudiant de niveau Licence 3<sup>ème</sup> année (Poitiers), encadrement à 100% d'un stage de 4 semaines, mai 2011
- 1étudiant de niveau Licence 3<sup>ème</sup> année (Poitiers), encadrement à 100% d'un stage de 4 semaines, mai 2010.
- 1étudiant de niveau Master 1<sup>ère</sup> année (Poitiers), encadrement à 50% d'un stage de 6 semaines, avril-mai 2010.
- 1 étudiant de niveau Licence 3 (Poitiers), encadrement à 50% d'un stage de 4 semaines, mai 2009.

## Responsabilités

- Représentante des doctorants et post-doctorants au conseil du laboratoire de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire UMR CNRS 6187 2009-2011.

## Autres

- Logiciel informatique : Word, Excel, PowerPoint Graphpad, ABI Prism, FluoView, Image J, Origin 4.0.

## **Influence de la connexine 43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur le développement de métastases osseuses.**

La communication intercellulaire directe par jonction gap (CIJG) est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et la coordination des activités cellulaires. Tout dysfonctionnement de la communication intercellulaire dû à une perte d'expression ou à une délocalisation cytoplasmique des protéines constitutives : les connexines (Cx) est associé à des pathologies humaines. Ainsi, lors du processus de cancérogenèse, un défaut de synthèse ou d'adressage membranaire des connexines peut engendrer un phénotype tumoral caractérisé notamment par une prolifération cellulaire accrue. Néanmoins, le rôle des connexines lors des processus plus tardifs conduisant aux métastases n'a pu être clairement défini avec des résultats controversés. Le cancer de la prostate qui évolue majoritairement (80% des cas) vers des métastases osseuses, est associé à une diminution d'expression de connexines dont la Cx43. De plus, cette Cx43 est très impliquée dans l'ostéogenèse et dans la différenciation des cellules ostéofonmatrices (ostéoblastes).

Afin d'évaluer l'impact de la Cx43 sur le potentiel métastatique et sur l'impact osseux des cellules cancéreuses prostatiques, une surexpression de la Cx43 par infection rétrovirale a été effectuée dans des lignées cancéreuses prostatiques ayant des caractéristiques métastatiques différentes : les cellules PC-3 (très invasives) et les cellules LNCaP (moins agressives). Nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de la Cx43 entraîne un effet différent sur les deux lignées. En effet, la Cx43 est restreinte dans le cytoplasme pour les cellules PC-3 alors qu'elle est localisée à la membrane plasmique et établit une communication intercellulaire pour les cellules LNCaP. De plus, une diminution de la prolifération ainsi que des capacités d'adhérence et d'invasion des cellules PC-3 a été observée suite à la transfection. A l'inverse, pour les cellules LNCaP, aucun impact sur la prolifération n'a été observé mais leur capacité d'invasion et d'adhérence a été significativement augmentée par la surexpression de la Cx43. *In vivo*, l'impact osseux étudié après injections intra-tibiales a montré une augmentation de l'incidence tumorale et de la perte osseuse suite au développement de tumeurs ostéolytiques uniquement pour les cellules LNCaP Cx43. Pour les cellules PC-3, aucune différence n'a été observée après la surexpression de la Cx43 alors qu'une étude préliminaire de la dissémination après injection intracardiaque a permis de montrer un ralentissement du développement des métastases osseuses. Enfin, des co-cultures avec des ostéoblastes murins ont permis de mettre en évidence que les cellules cancéreuses favorisent l'expression par les ostéoblastes de RANKL, un activateur des ostéoclastes, associé à un ralentissement de la différenciation des ostéoblastes. Ces effets observés sont indépendants du niveau d'expression de la Cx43. Seule la prolifération des ostéoblastes est significativement modifiée par la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques.

En conclusion, les résultats *in vitro* suggèrent l'implication de la Cx43 dans le processus métastatique des cellules cancéreuses prostatiques avec une augmentation de l'agressivité pour les cellules LNCaP. De plus, la Cx43 semble pouvoir modifier l'impact osseux *in vivo* en fonction du niveau d'agressivité initial des cellules cancéreuses prostatiques.

**Mots clefs** : Connexine 43, cancer de la prostate, communication intercellulaire, phénotype métastatique, métastases osseuses, ostéoblastes

## **Influence of connexin 43 on prostatic cancer cells phenotype and on bone metastases development**

Prostate cancer (PCa) has the highest incidence in men with bone metastasis occurring in 80% of cases and mainly characterized by osteoblastic lesions. The mechanisms by which prostate cancer cells are induced to metastasize to bone are variable and complex, implicating oncogenes, pro-angiogenic factors and adhesion molecules. Among the different interacting molecules, Connexins (Cxs) could participate in this process. Connexins are transmembrane protein involved in Direct Gap Junction Intercellular Communication (GJIC) in order to maintain tissue homeostasis and the coordination of cellular activities. Studies have shown that PCa cells are deficient in some Cx isoforms (Cx32, Cx43) in primary tumors. However, recent studies suggest that Cx43 could be implicated in the last stages of the tumorigenic process as a promoter of cancer cell dissemination with a putative role of heterocellular coupling with environmental cells in the migration, diapedesis and metastatic processes. Furthermore, cumulated data support the involvement of Cx43 and GJIC in the differentiation process of bone-forming osteoblastic cells and bone turnover. Indeed, *in vivo*, Cx43-null mice presented mineralization defects in craniofacial bones and ribs and *in vitro* a decreased differentiation potential of OB cells was clearly demonstrated. Therefore, we have investigated the role of Cx43 on the metastatic potential of PCa cells and on their bone impact *in vivo*.

To examine the effects of increased expression of Cx43 gene in PCa cells, we have performed retroviral infection in two well characterized cell lines representing different stages of cancer progression: PC3 (aggressive) and LNCaP (less metastatic). After overexpression, in PC3 cells, Cx43 was restricted to the cytoplasmic part and no cell-to-cell communication was measured. Conversely, in LNCaP cells, Cx43 was mainly observed in appositional membranes and a functional GJIC was demonstrated by gap-FRAP and preloading assays. Moreover after overexpression, phenotypic characterization of both cell types demonstrated significant differences in adhesion, invasion, proliferation and secretome profile. Cx43 appears to alter the behavior of LNCaP making them more aggressive. To study the impact of prostate cancer cells overexpressing Cx43 on bone, intratibial injections in nude mice were performed. Mice were imaged by means of tomographic and scintigraphic analyses vs. time. Both cell types developed osteolytic tumors. Cx43 overexpression in LNCaP cells induced a 4 fold increase of tumour incidence compared to mock cells. After Cx43 overexpression, tibial bone volume was clearly decreased compared to control confirming the higher osteolytic ability of LNCaP. For PC-3 cells, no difference was observed after Cx43 overexpression but a preliminary study of the spread after intracardiac injection has shown a slowdown in the development of bone metastases. Finally, co-cultures with murine osteoblasts have shown that cancer cells promote the expression of RANKL by osteoblasts, an activator of osteoclasts, with a decrease of the osteoblastic differentiation. These effects are independent of the level of Cx43 expression. Only the proliferation of osteoblasts was significantly modified by Cx43 overexpression in prostatic cancer cells.

Our *in vitro* study demonstrates that Cx43 could influence the metastatic status of PCa cells with increased aggressiveness of LNCaP. *In vivo*, our data validate the potential implication of this connexin in the bone impact during metastasis.

**Key word:** Connexin 43, prostate cancer, intercellular communication, metastatic phenotype, bone metastasis, osteoblasts.

## **Influence de la connexine 43 sur le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques et sur le développement de métastases osseuses.**

La communication intercellulaire directe par jonction gap (CIJG) est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et la coordination des activités cellulaires. Tout dysfonctionnement de la communication intercellulaire dû à une perte d'expression ou à une délocalisation cytoplasmique des protéines constitutives : les connexines (Cx) est associé à des pathologies humaines. Ainsi, lors du processus de cancérogenèse, un défaut de synthèse ou d'adressage membranaire des connexines peut engendrer un phénotype tumoral caractérisé notamment par une prolifération cellulaire accrue. Néanmoins, le rôle des connexines lors des processus plus tardifs conduisant aux métastases n'a pu être clairement défini avec des résultats controversés. Le cancer de la prostate qui évolue majoritairement (80% des cas) vers des métastases osseuses, est associé à une diminution d'expression de connexines dont la Cx43. De plus, cette Cx43 est très impliquée dans l'ostéogenèse et dans la différenciation des cellules ostéoformatrices (ostéoblastes).

Afin d'évaluer l'impact de la Cx43 sur le potentiel métastatique et sur l'impact osseux des cellules cancéreuses prostatiques, une surexpression de la Cx43 par infection rétrovirale a été effectuée dans des lignées cancéreuses prostatiques ayant des caractéristiques métastatiques différentes : les cellules PC-3 (très invasives) et les cellules LNCaP (moins agressives). Nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de la Cx43 entraîne un effet différent sur les deux lignées. En effet, la Cx43 est restreinte dans le cytoplasme pour les cellules PC-3 alors qu'elle est localisée à la membrane plasmique et établit une communication intercellulaire pour les cellules LNCaP. De plus, une diminution de la prolifération ainsi que des capacités d'adhérence et d'invasion des cellules PC-3 a été observée suite à la transfection. A l'inverse, pour les cellules LNCaP, aucun impact sur la prolifération n'a été observé mais leur capacité d'invasion et d'adhérence a été significativement augmentée par la surexpression de la Cx43. *In vivo*, l'impact osseux étudié après injections intra-tibiales a montré une augmentation de l'incidence tumorale et de la perte osseuse suite au développement de tumeurs ostéolytiques uniquement pour les cellules LNCaP Cx43. Pour les cellules PC-3, aucune différence n'a été observée après la surexpression de la Cx43 alors qu'une étude préliminaire de la dissémination après injection intracardiaque a permis de montrer un ralentissement du développement des métastases osseuses. Enfin, des co-cultures avec des ostéoblastes murins ont permis de mettre en évidence que les cellules cancéreuses favorisent l'expression par les ostéoblastes de RANKL, un activateur des ostéoclastes, associé à un ralentissement de la différenciation des ostéoblastes. Ces effets observés sont indépendants du niveau d'expression de la Cx43. Seule la prolifération des ostéoblastes est significativement modifiée par la surexpression de la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques.

En conclusion, les résultats *in vitro* suggèrent l'implication de la Cx43 dans le processus métastatique des cellules cancéreuses prostatiques avec une augmentation de l'agressivité pour les cellules LNCaP. De plus, la Cx43 semble pouvoir modifier l'impact osseux *in vivo* en fonction du niveau d'agressivité initial des cellules cancéreuses prostatiques.

**Mots clefs** : Connexine 43, cancer de la prostate, communication intercellulaire, phénotype métastatique, métastases osseuses, ostéoblastes