

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en biotechnologie et microbiologie

**Étude de la régulation des jonctions intercellulaires
de type gap dans les cellules de
neuroblastome d'origine
humain IMR-32.**

**Par
Jaafar Belgoudi**

**Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur externe	Dr Léonard Kleine , Université d'Ottawa
Examineur externe	Dr Alain Moreau , Hôpital Sainte-Justine
Examineur interne	Dr Daniel Cyr , Centre de recherche en santé humaine
Directeur de recherche	Dr Maximilien Arella , Centre de microbiologie et de biotechnologie
Codirecteur de recherche	Dr Jenny Phipps , Conseil National de Recherche du Canada

RÉSUMÉ

Les jonctions intercellulaires de type gap (JICGs) sont des canaux membranaires qui font communiquer directement les cytoplasmes des cellules adjacentes. Les canaux sont formés par des protéines ubiquistes de la famille des connexines (Cx). Les JICGs permettent la diffusion de petites molécules, des messagers secondaires: cAMP, cGMP, IP₃, du Ca²⁺ et des autres ions. Ces messagers modulent l'activité des protéines kinases et donc de la signalisation cellulaire, elle-même impliquée dans le contrôle de la croissance, de la différenciation cellulaire et de la mort cellulaire programmée. Le but de ce travail est dans une première étape d'étudier l'expression et la fonction des JICGs dans les cellules de la lignée de neuroblastome IMR-32. Nous avons trouvé que les cellules IMR-32 originaires des neuroblastes expriment seulement la Cx43. L'évaluation de la fonction des JICGs a montré que les cellules IMR-32 ont des JICGs non fonctionnelles dû à une localisation anormale de la Cx43 dans le cytoplasme. Un modèle de différenciation cellulaire des IMR-32 a été établi afin de pouvoir étudier les JICGs. La progression de la différenciation des cellules IMR-32 a été optimisée. Ainsi, nous avons trouvé que le 8-Br-cAMP et l'acide tout *trans* rétinolique permet l'induction de la différenciation. Cette différenciation a été caractérisée sur le plan cellulaire et moléculaire. Nous avons démontré que les cellules IMR-32 en cours de la différenciation expriment davantage de marqueurs de différenciation tel que les neurofilaments, l'énolase spécifique des neurones, la tyrosine hydroxylase et l'acétylcholinestérase en comparaison avec les cellules mitotiques. De plus, nous avons observé que le niveau d'expression du TrkA et du H-ras les marqueurs de bon pronostic chez les neuroblastomes est plus élevé dans les cellules d'IMR-32 différenciées alors que l'expression de l'oncogène N-myc normalement amplifié dans cette tumeur et qui caractérise les tumeurs de neuroblastomes les plus agressives baisse. L'étude des JICGs dans ce modèle cellulaire de différenciation de neuroblastome a montré que l'induction de la différenciation est associée au rétablissement des communications intercellulaires et à une re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique accompagné d'une augmentation de son expression. Par la suite, nous avons tenté d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la régulation des JICGs par les protéines kinases incluant la PKA, la PKC et la MAP Kinase. En adoptant des inhibiteurs spécifiques pour chaque kinase et en mesurant la fonction des JICGs, nous avons trouvé que l'inhibition de la PKC par le Go6976 entraîne une augmentation de la perméabilité jonctionnelle sans affecter l'expression de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32. De même, pour l'inhibition spécifique de la p38 MAP Kinase par le SB202190 qui induit un effet semblable que l'inhibition de la PKC. Par contre, l'inhibition de ERK1/2 MAP Kinase par le PD98059 ne semble avoir aucun effet sur les JICGs. Nous avons aussi montré que dans ces cellules, l'activation de la PKA induit l'arrêt de la prolifération et la différenciation cellulaire et moléculaire alors que l'inhibition de la PKC induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose. L'inhibition de la p38 MAP Kinase induit aussi l'apoptose alors que celle de la ERK1/2 MAP Kinase permet l'arrêt de la prolifération seulement. D'un autre côté, nous avons étudié l'effet de la C2-céramide, une molécule naturelle impliquée *in vivo* dans la signalisation des cellules neuronales à faible concentration et dans l'apoptose sous l'effet de stress

cellulaire. Des expériences *in vitro* avec la C2-céramide ont permis d'observer l'arrêt de la prolifération des cellules IMR-32 à 25 μM et l'apoptose à 100 μM . Le mécanisme d'action de la C2-céramide dans la régulation de la croissance cellulaire passe par l'inhibition des isoformes classiques de la PKC et particulièrement la PKC Alpha tel que démontré par l'introduction d'anticorps spécifique aux isoformes de PKCs. Enfin, l'arrêt de la prolifération par la C2-céramide passe par un mécanisme indépendant des JICGs puisque la C2-céramide n'a d'effet ni sur le couplage cellulaire ni sur l'expression et la phosphorylation de la Cx43.

Étudiant

Directeurs de recherches

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude au Dr Jenny Phipps dont les remarquables qualités scientifiques et personnelles resteront pour moi un modèle d'excellence et une source d'émulation. Je la remercie pour sa patience, pour son grand sens critique et son ouverture d'esprit dont elle a fait preuve à mon égard durant ces années.

J'aimerais particulièrement remercier le Dr Maximilien Arella pour sa patience, son soutien, son grand sens critique et ses précieux conseils qui ont été très utiles durant mes années de recherche.

Je tiens également à adresser mes remerciements au Dr Loubaba Belbaraka pour son aide précieuse tant au niveau amical qu'au niveau scientifique.

J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité d'encadrement le Dr Abderrazzak Merzouki et le Dr Albert Descoteaux pour leurs nombreux conseils scientifiques. Leur expertise dans le domaine de la biologie moléculaire et de la virologie sont des plus enrichissantes.

De plus je tiens à remercier spécialement le Dr Hervé Jouishome pour son soutien au niveau de la cytométrie de flux. Je remercie également mes autres collègues de travail.

Finalement, je tiens à remercier chaleureusement ma mère qui malgré sa maladie n'a pas arrêté de m'encourager ainsi que les autres membres de la famille Anouar, Kamar, Zina, Aziza et Aïcha.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
 PROBLÉMATIQUE.....	 1
OBJECTIF DU PROJET.....	5
 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	 8
1.1 Le cancer	9
1.2 Les Neuroblastomes.....	9
1.2.1 Les caractéristiques génétiques et chromosomiques des neuroblastomes	10
1.2.1.1 Les anomalies chromosomiques	13
1.2.1.1.1 L'amplification du N-myc	14
1.2.1.1.2 L'altération de TrkA	14
1.2.2 Le traitement des neuroblastomes	15
1.2.2.1 La chirurgie	16
1.2.2.2 La radiothérapie	16
1.2.2.3 La chimiothérapie et la transplantation.....	16
1.2.2.4 La régression spontanée	17
1.2.3 Origine et caractéristiques des cellules IMR-32	18
1.3 L'implication possible des communications intercellulaires de type gap dans le neuroblastome.....	19
1.3.1 Les altérations des jonctions de type gap et les syndromes associés	19
1.3.2 Les jonctions de type gap et le cancer	20
1.3.3 Les gènes des connexines.....	23
1.3.4 Les connexines	24
1.3.4.1 La connexine 43	27
1.3.5 Les canaux jonctionnels	28
1.3.5.1 La perméabilité des canaux jonctionnels	28
1.3.5.2 La fonction des canaux jonctionnels.....	29
1.3.5.3 La régulation des canaux jonctionnels.....	30
1.3.5.3.1 La protéine kinase A.....	33

1.3.5.3.1.1 La protéine kinase A et la différenciation	34
1.3.5.3.1.2 La p53 et les neuroblastomes	35
1.3.5.3.1.3 La régulation des jonctions intercellulaires de type gap par la protéine kinase A.....	37
1.3.5.3.2 Les rétinoïdes.....	37
1.3.5.3.2.1 Les rétinoïdes et la différenciation	38
1.3.5.3.2.2 L'acide rétinoïque et les jonctions intercellulaires de type gap	39
1.3.5.3.3 La protéine kinases C	40
1.3.5.3.3.1 La protéine kinase C et l'apoptose	42
1.3.5.3.3.2 La protéine kinase C et les jonctions intercellulaires de type gap..	43
1.3.5.3.4 La famille des MAP kinases	44
1.3.5.3.4.1 La famille des MAP kinases et l'apoptose	46
1.3.5.3.4.2 La famille des MAP kinases et les jonctions intercellulaires de type gap	46
1.3.5.3.5 Les céramides	47
1.3.5.3.5.1 Les céramides et l'apoptose	50
1.3.5.3.5.2 Les céramides et la protéine kinase C	51
1.3.5.3.5.3 Les céramides et la famille des MAP kinases	51
1.3.5.3.5.4 Les céramides et les jonctions intercellulaires de type gap.....	52
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
2.1 Culture des cellules IMR-32	54
2.1.1 Conditions générales	54
2.1.2 Évaluation de la prolifération cellulaire.....	55
2.1.3 Différenciation cellulaire.....	55
2.1.4 Traitement cellulaire	56
2.2 Technique de cytométrie de flux	56
2.3 Immunofluorescence	57
2.4 Reconnaissance de l'apoptose par la méthode de Hoechst	57
2.5 Analyse des communications intercellulaires.....	59
2.6 Technique d'incorporation des anticorps	59
2.7 Extraction des protéines et immunobuvardage	60
2.7.1 Extractions des connexines	60
2.7.2 Extraction des protéines	61
2.7.3 Immunoprécipitation	61
2.7.4 Électrophorèse des protéines (SDS-PAGE)	62
2.7.5 Électrotransfert.....	62
2.7.6 Immunodétection.....	62
2.8 Extraction de l'ARN et analyses par RT-PCR	63
2.8.1 Extraction de l'ARN.....	63
2.8.2 Traitement de l'ARN total.....	64
2.8.3 Analyses par RT-PCR	64
2.8.3.1 Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)	64

2.8.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	65
2.9 Analyse statistique	65
3. RÉSULTATS.....	66
3.1 L'expression des connexines et la fonction des JICGs dans les cellules IMR-32	67
3.2 L'induction de la différenciation dans les cellules IMR-32	69
3.3 Caractérisation de la différenciation moléculaire dans les cellules d'IMR-32..	74
3.3.1 Expression des marqueurs neuronaux	74
3.3.2 Expression des marqueurs cliniques	75
3.3.3 Induction de la différenciation et expression de la p53 dans la lignée de neuroblastome IMR-32.....	82
3.4. Différenciation à court terme et jonctions communicantes de type gap dans la lignée de neuroblastome IMR-32	87
3.5. Différenciation prolongée et jonctions communicantes de type gap dans la lignée de neuroblastome IMR-32	92
3.6 Protéine kinase C et jonctions intercellulaires de type gap	101
3.7 La MAP kinase et la régulation des JICGs dans les cellules IMR-32.....	105
3.8 Les céramides et la régulation des JICGs dans les cellules IMR-32	112
3.8.1 Implication des céramides dans l'apoptose	119
3.8.2 Implication des céramides dans le ralentissement de l'activité mitotique	122
3.8.2.1 Implication de la PKC dans la régulation de la prolifération induite par la céramide.....	129
3.8.2.1.1 Implication de la PKC Alpha dans la régulation de la prolifération induite par la céramide	132
3.9 Les céramides et les jonctions intercellulaires de type gap.....	134
4. DISCUSSION.....	137
4.1 Les JICGs dans les neuroblastomes.....	138
4.2 Les jonctions intercellulaires de type gap et la différenciation cellulaire	140
4.2.1 Induction et caractérisation de la différenciation chez la lignée de neuroblastome IMR-32.....	140
4.2.1.1 Effet de la différenciation cellulaire sur la croissance cellulaire	141
4.2.1.2 Effet de la différenciation cellulaire sur la morphologie cellulaire et moléculaire	144

4.2.1.3 Effet de l'induction de la différenciation sur l'expression des marqueurs neuronaux	145
4.2.1.4 Effet de la différenciation sur les marqueurs tumoraux.....	148
4.2.1.5 p53 et différenciation cellulaire	150
4.3 Effet de la différenciation sur le couplage cellulaire dans la lignée de neuroblastome IMR-32	152
4.3.1 Expression de la Cx43 et fonction des JICGs	152
4.3.2 Effet de la combinaison du 8-Br-cAMP avec le tRA sur l'évolution des jonctions cellulaires de type gap	154
4.4 Régulation des JICGs dans la lignée de neuroblastome humain IMR-32.....	157
4.4.1 Effet de la PKC sur les JICGs	157
4.4.2 Effet de la MAPK sur les JICGs	160
4.5 Les céramides et le couplage cellulaire	162
5. CONCLUSION.....	167
6. LISTE DES RÉFÉRENCES.....	172

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Schéma de la structure du canal jonctionnel de type gap et de la connexine	25
Figure 1.2	Représentations schématiques de quelques voies de signalisation impliquées dans la régulation des jonctions intercellulaires de type gap..	32
Figure 1.3	Les voies de signalisation des céramides	49
Figure 2.1	Représentation de la technique de la lyse osmotique des vésicules pinocytiques	60
Figure 3.1	Profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	68
Figure 3.2	Évaluation des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastome IMR-32	70
Figure 3.3	Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	71
Figure 3.4	Effet des inducteurs de la différenciation sur la morphologie des cellules de neuroblastome IMR-32.....	72
Figure 3.5	Effet des inducteurs de la différenciation sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32	73
Figure 3.6	Effet des inducteurs de différenciation sur le profil d'expression des neurofilaments 200 et 68 dans les cellules de neuroblastome IMR-32....	76
Figure 3.7	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression des neurofilaments 200 et 68 en réponse aux inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32	77
Figure 3.8	Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de l'énolase spécifique des neurones dans les cellules de neuroblastome IMR-32	78
Figure 3.9	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'énolase spécifique des neurones et de la toxine tétanique en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32	79
Figure 3.10	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'acétylcholinestérase et de la tyrosine hydroxylase en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32	80
Figure 3.11	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de la PCNA et de N-myc en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32	81
Figure 3.12	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression du TrkA et du H-ras en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32	83
Figure 3.13	Mise en évidence par microscopie confocale de l'effet du 8-Br-cAMP sur la sous-localisation cellulaire de la protéine p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	85
Figure 3.14	Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation sur la sous-localisation cellulaire de la p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32.....	86

Figure 3.15	Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de la protéine p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32.....	88
Figure 3.16	Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation sur la sous-localisation cellulaire du Mdm2 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	89
Figure 3.17	Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	90
Figure 3.18	Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil de transcription de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	91
Figure 3.19	Effet des inducteurs de la différenciation sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32	93
Figure 3.20	Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	94
Figure 3.21	Évolution cinétique de la différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout <i>trans</i> rétinolique	96
Figure 3.22	Évolution cinétique du profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout <i>trans</i> rétinolique	97
Figure 3.23	Évolution cinétique du profil de transcription de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout <i>trans</i> rétinolique	98
Figure 3.24	Évolution cinétique des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison du 8-Br-cAMP et de l'acide tout <i>trans</i> rétinolique	99
Figure 3.25	Évolution cinétique de la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison du 8-Br-cAMP et de l'acide tout <i>trans</i> rétinolique	100
Figure 3.26	Effet d'une dose croissante de l'inhibiteur de PKCs Go6976 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32	102
Figure 3.27	Effet d'une dose de 140 nM de Go6976 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32	103
Figure 3.28	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur des cPKCs Go6976, par exposition au réactif de Hoechst.....	104
Figure 3.29	Effet des inhibiteurs de PKC, H7 et staurosporine sur la prolifération des cellules IMR-32.....	106
Figure 3.30	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec les inhibiteurs de PKC H7 et staurosporine, par exposition au réactif de Hoechst.....	107
Figure 3.31	Effet des inhibiteurs de PKC sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32.....	108
Figure 3.32	Effet des inhibiteurs de PKC sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32	109

Figure 3.33	Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet de l'inhibiteur des cPKCs Go6976 sur la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	110
Figure 3.34	Effet d'une dose croissante des inhibiteurs de la MAP kinase PD98059 et SB202190 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32 ..	111
Figure 3.35	Effet de 25 μ M PD98059 et de 25 μ M SB202190 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32	113
Figure 3.36	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur de MAP kinase PD98059, par exposition au réactif de Hoechst.....	114
Figure 3.37	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur de MAP kinase SB202190, par exposition au réactif de Hoechst.....	115
Figure 3.38	Effet de l'inhibition spécifique des MAPKs ERK1/2 et p38 sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	116
Figure 3.39	Effet de l'inhibition spécifique des MAPKs ERK1/2 et p38 sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32.....	117
Figure 3.40	Effet de l'inhibition de la p38 MAP kinase sur la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	118
Figure 3.41	Effet d'une dose croissante de C6-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32	120
Figure 3.42	Effet d'une dose croissante de C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32	121
Figure 3.43	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec des doses croissantes de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst.....	123
Figure 3.44	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec 25 μ M de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst	124
Figure 3.45	Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec 100 μ M de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst.....	125
Figure 3.46	Effet d'inhibiteurs des MAP kinases seuls ou en combinaison avec la C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32	127
Figure 3.47	Effet des inhibiteurs des PKCs seuls ou en combinaison avec la C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32.....	128
Figure 3.48	Mise en évidence par immunofluorescence de l'incorporation de l'anticorps anti-PKC Alpha dans les cellules de neuroblastome IMR-32 par la technique d'endocytose	130
Figure 3.49	Effet de l'inhibition spécifique des isoformes de PKCs sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32	131
Figure 3.50	Identification des isoformes de PKCs impliquées dans la modulation de croissance induite par l'exposition des cellules de neuroblastome IMR-32 à la C-2-céramide	133

Figure 3.51	Effet de doses croissantes de C2-céramide sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32	135
Figure 3.52	Effet de doses croissantes de C2-céramide sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastomes IMR-32	136

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.1	Définition des différents stades de neuroblastome.....	11
Table 1.2	Classification des neuroblastomes selon leurs caractéristiques génétiques et cliniques.....	12
Table 1.3	Effet suppresseur de tumeur induit par l'expression de gènes de connexines	21
Table 1.4	Exemples de mécanismes impliqués dans la modulation des jonctions intercellulaires de type gap observées dans des tumeurs ou induits par des agents promoteurs de tumeurs.....	22
Table 1.5	La famille des connexines.....	26
Table 2.1	Les différents types d'anticorps utilisés, leurs provenances et leurs dilutions pour la cytométrie de flux, l'immunofluorescence et l'immunobuvardage	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-Br-cAMP	8-Bromo-adénosine monophosphate cyclique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance
aPKC	Les protéines kinases C atypiques
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BDNF	“Brain derived neutrophic factor”
Bis	Bisindolylmaleimide GF 109203X
BSA	Albumine sérique bovine
C2-cér	C2-céramide
Ca²⁺	Calcium
CaCl₂	Chlorure de calcium
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CDK	“Cycline dependent kinase”
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CHAT	Acétylcholinestérase
CHP-126	Cellules de neuroblastome humain
CHP-134	Cellules de neuroblastome humain
CNPase	2', 3'-cyclique nucléotide 3'-phosphodiésterase
cPKC	Les protéines kinases C classiques
CRABPII	“Cellular retinoic acid-binding protein type II”
CREB	“cAMP-regulated enhancer binding protein”
Cx	Connexine
DAG	Diacylglycérol
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique

EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK	“Extracellular response kinase”
FBS	Sérum de veau fœtal
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FITC	Isothiocyanate de fluoresceine
GTP	Guanine tri-phosphate
H₂O₂	Le peroxyde d'hydrogène
H33258	Fluorochrome de Hoescht 33258
H-7	1,5-isoquinolinylsulfonyl-2-methylpiperzine
HIV	Virus d'immunodéficience humaine
H-ras	“Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog”
HVA	Acide homovanilique
IMR-32	Cellules de neuroblastome humain
IP3	Inositol 1, 4, 5 trisphosphate
JICG	Jonction intercellulaire de type gap
JNK	c-Jun terminal kinase
kDa	Kilodalton
LAN-2	Cellules de neuroblastome humain
LAN-5	Cellules de neuroblastome humain
LNCaP	Cellules de cancer de la prostate humaine
MAPK	“Mitogen-activated protein kinase”
MAPKK	“Mitogen-activated protein kinase kinase”
Mdm2	«Murine double minute 2»
MEKK	MAP kinase kinases
MEM	Milieu essentiel minimal
Molt-4	Cellules leucémiques humain
NB	Neuroblastome
NB-2	Cellules de neuroblastome de souris
NB-69	Cellules de neuroblastome humain
NBT	Nitrobleu tetrazolium

N-CAM	“Neural cell adhesion molecule”
Neuro-2a	Cellules de neuroblastome murin
NF 200	Neurofilament de 200 kDa
NF 68	Neurofilament de 68 kDa
NF-κB	“Nuclear Factor for the κ chain of B cells”
NGF	Facteur de croissance neuronale
nPKC	Protéine kinase C nouvelle
NSE	Enolase spécifique des neurones
NT-3	Neutrophine – 3
P19	Cellules de carcinome embryonnaire murin
p38	p38 MAP kinases
p53	Protéine de masse moléculaire 53 kDa
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
pb	Pair de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PC-12	Cellules de phéochromocytome de rat
PCNA	“Proliferating cell nuclear antigen ”
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène glycol
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
pRb	Protéine du retinoblastome
PS	Phosphatidylsérine
RA	Acide rétinoïque
RAR	Récepteur nucléaire de l'acide tout <i>trans</i> rétinoïque
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Révolution par minute
RTK	Récepteurs tyrosine kinase

RXR	Récepteur nucléaire de l'acide 9-<i>cis</i> rétinoïque
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SH-EP1	Cellules épithéliales humain
SH-SY5Y	Cellules de neuroblastome humain
SK-NSH	Cellules de neuroblastome humain
Src	Sarcome de souris
St	Staurosporine
TBST	Tampon Tris avec le Tween 20
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TPA	12-0-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate
tRA	Acide tout <i>trans</i> rétinoïque
TrkA	Récepteur du facteur de croissance neuronale de type A
VMA	Acide vanilymandélique
WAF1	“Wild type activated fragment”

PROBLÉMATIQUE

Dans un organisme pluricellulaire, le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Cette homéostasie est régulée de l'extérieur par trois mécanismes de communications cellulaires: la communication extracellulaire à travers les hormones, les facteurs de croissances, les neurotransmetteurs et les cytokines. Les cellules ne fonctionnent pas indépendamment les unes des autres. Au contraire, leur activité est étroitement coordonnée. D'une part, elles sont alimentées par les mêmes signaux extracellulaires (hormones et facteurs de croissances spécifiques), d'autre part, elles échangent et partagent des nutriments et des molécules intracellulaires de masse moléculaire inférieure à 1000 Da. Le rôle des jonctions intercellulaires de type gap (JICGs) est donc d'harmoniser la teneur des cellules d'un tissu en petites molécules et spécifiquement en messagers secondaires (Ca^{2+} , diacylglycerol, pH, céramides et cAMP) qui sont les effecteurs des protéines kinases. En effet, les jonctions communicantes ou jonctions intercellulaires de type gap permettent des échanges directs d'informations moléculaires entre les cellules voisines au sein des tissus et organes. Les JICGs sont formées par le rassemblement d'un grand nombre de canaux qui mettent en relation le cytoplasme de cellules adjacentes. Les canaux des JICGs sont formés de deux parties identiques: les connexons. Un connexon est composé de six protéines transmembranaires appelées connexines. Les jonctions intercellulaires de type gap (jonctions lacunaires) assurent la coordination des activités cellulaires et la synchronisation de certaines fonctions cellulaires telles que la propagation de l'excitation dans le muscle cardiaque et le muscle lisse et les sécrétions glandulaires. Les JICGs participent aussi au contrôle de la multiplication cellulaire.

La perte de la communication via les jonctions intercellulaires de type gap est un trait commun aux cellules transformées et la restauration du couplage intercellulaire est associée à une diminution de la tumorigénicité. Donc, l'absence ou la rupture des communications intercellulaires médiées par les JICGs conduit à l'isolement des cellules, leur permet d'échapper aux contrôles des cellules environnantes, et conduit à divers

dysfonctionnements et pathologies, notamment les anomalies du développement embryonnaire et le cancer.

Le neuroblastome est un des cancers le plus fréquent chez les enfants en bas âges (Brodeur et al. 2000). Il a comme origine les neurones du système nerveux périphérique. Dans la plupart des cas, chez les enfants diagnostiqués avant l'âge d'un an, ces tumeurs sont bénignes et régressent sans aucun traitement. Cependant chez les enfants plus âgés, le taux de survie à long terme est de 15 % seulement. Lorsque diagnostiqué chez des enfants de plus d'une année, le neuroblastome est traité par chimiothérapie et radiothérapie (Brodeur et al. 2000). Cependant, cette tumeur présente une résistance accrue aux médicaments et elle est de plus en plus difficile à soigner (Lovat et al. 2001). Le contrôle de la prolifération par élimination des cellules cancéreuses est toujours le seul moyen de traiter cette maladie dans les stades avancés (Brodeur et al. 2000; Grosfeld. 1999).

Plusieurs lignes d'évidence appuient l'implication des JICGs dans le contrôle de la prolifération : pratiquement tous les cancers présentent une altération des JICGs (Yamasaki et al. 1999a; 1999b; 1999c), la transfection de certains Cxs dans les cellules tumorales induit un arrêt de croissance (Mehta et al. 1992; Rose et al. 1993), les promoteurs tumoraux tel que le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), ainsi que certains oncogènes inhibent les JICGs (Trosko et al. 2000a; Yamasaki et al. 1999a). Par contre, les substances anti-cancérigènes restaurent les JICGs (Hossain et al. 1999; Trosko et al. 2000a). Le traitement des tumeurs par des substances capables de rétablir les jonctions communicantes entre les cellules malignes et les cellules normales avoisinantes aboutit à la suppression du caractère malin (Yamasaki et al. 1996, 1999b; 1999c). Ces observations semblent donc confirmer l'hypothèse que le rétablissement des communications entre les deux types cellulaires inhibent le phénotype tumoral.

En tenant compte des données-ci-dessus et dans le but d'envisager une autre cible thérapeutique pour le traitement des neuroblastomes, il était nécessaire, dans un premier temps, d'explorer l'état des jonctions intercellulaires de type gap dans la lignée de

neuroblastome humain IMR-32. Dans un deuxième temps, dans le cas où les JICGs y étaient déficientes, il serait important de déterminer les mécanismes qui les régulent et d'étudier si la restauration de la fonction des JICGs est associée à une décroissance des critères de tumorigénicité. Les recherches présentées dans le cadre de cette thèse constituent à différents niveaux une contribution expérimentale et théorique à l'identification des différentes voies de signalisation impliquées dans la modulation des JICGs dans une lignée agressive de cellules de neuroblastomes humain.

OBJECTIF DU PROJET

Les différents traitements utilisés dans le contrôle de la prolifération des neuroblastomes ne sont pas efficaces principalement à cause de l'hétérogénéité des tumeurs et donc de leur réponse à la chimiothérapie. Le but de ce travail est l'identification des mécanismes de signalisation cellulaire qui régulent les communications intercellulaires et l'utilisation de cette information pour contrôler la prolifération du neuroblastome dans un modèle cellulaire humain. L'importance des études réalisées pour déterminer le niveau d'altération des jonctions gap dans les cellules de neuroblastome IMR-32 et les normaliser, réside dans la contribution des échanges intercellulaires via les jonctions intercellulaires de type gap à la signalisation, la différenciation et l'homéostasie.

Le premier objectif de ce projet était l'identification de la ou des connexines présentes dans le modèle cellulaire d'IMR-32 utilisé et d'explorer l'altération potentielle de la fonction des JICGs. Les techniques utilisées ont été: l'immunobuvardage pour identifier le profil d'expression et de phosphorylation de la Cx43, l'immunocytochimie en epi-fluorescence pour déterminer la localisation de la Cx43 (membranaire ou cytoplasmique) et enfin la technique de chargement par grattage en présence d'un colorant fluorescent pour mesurer le niveau de communication jonctionnelle dans les cellules IMR-32.

Le deuxième objectif consistait à étudier les différentes voies capables de rétablir la perméabilité jonctionnelle dans le cas d'une altération. Puisque les neuroblastomes sont originaires de cellules embryonnaires, qui sont bloquées durant leur développement embryonnaire (Matthay et al. 1995a; 1995b), l'induction de la différenciation était une cible évidente pour le rétablissement des communications intercellulaires. Ainsi les principales étapes projetées étaient: 1) établir des conditions de cultures et de traitements optimales pour l'induction de la différenciation morphologique et moléculaire dans la lignée de neuroblastome humaine IMR-32 en utilisant plusieurs inducteurs de différenciation seuls ou en combinaison. 2) Mesurer l'effet de la différenciation sur l'expression des marqueurs neuronaux et sur les critères de tumorigénicité des cellules IMR-32. 3) Mesurer l'effet de la différenciation sur la régulation de l'expression et de la

localisation de la Cx43 ainsi que sur la fonctionnalité des jonctions intercellulaires de type gap.

Le troisième objectif était l'identification des voies de signalisation qui interviennent dans la régulation des JICGs. En effet, un grand nombre de signaux (oncogènes, autocrine, facteurs de croissance, neurotransmetteurs et hormones) régulent le niveau des communications intercellulaires en activant les protéines kinases (Lau et al. 1996). Certaines de ces kinases phosphorylent les connexines dans la partie carboxy-terminale située dans le cytoplasme où plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés. Pour arriver à cerner notre objectif, notre approche consistait à identifier la ou les voies qui affecte (nt) les jonctions intercellulaires de type gap. Pour ce faire, nous avons procédé par l'inhibition spécifique de la PKC, de la ERK1/2 et de la p38 afin d'identifier celles qui sont impliquées dans la régulation des jonctions intercellulaires de type gap. Les techniques d'immunobuvardage, d'immunofluorescence et de chargement par grattage seront utilisées pour caractériser la fonction des jonctions intercellulaires après traitement par ces inhibiteurs. De plus, la question de la contribution possible de cette régulation à un arrêt de la prolifération ou à l'apoptose sera abordée.

Dans le même ordre d'idées, nous avons exploré si la céramide, un messenger secondaire naturel des cellules neuronale, connu pour induire la croissance et/ou induire l'apoptose est impliquée dans la régulation des jonctions intercellulaires de type gap. Ainsi, ce quatrième objectif nous a permis d'étudier l'effet de différentes concentrations de céramides exogènes sur l'induction de l'arrêt de la prolifération ou de l'apoptose dans les cellules IMR-32. De plus, nous avons tenté d'identifier les voies de signalisations empruntée par la céramide ainsi que son effet sur l'expression et la localisation de la connexine 43 et sur la fonction des jonctions intercellulaires de type gap.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Le cancer

Le cancer se caractérise par une prolifération cellulaire incontrôlée, une perte de la différenciation et l'absence de la mort cellulaire programmée. En général, l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de l'intégration au niveau cellulaire de multiples signaux qui stimulent ou freinent la division cellulaire. Dans les conditions normales dans l'organisme adulte, la prolifération des cellules est un processus strictement contrôlé, qui permet seulement la réparation de certains tissus ou leur renouvellement. Dans le cas de la peau par exemple, le remplacement des cellules mortes se fait grâce à la multiplication des cellules souches, qui acquièrent progressivement les caractéristiques des cellules matures de l'épiderme et perdent la capacité à se diviser. Cette stabilité du tissu est régulée par des interactions très étroites entre les cellules. Or, dans le cas du cancer, cette stabilité ou homéostasie est rompue: la prolifération cellulaire qui aboutit à la formation d'une tumeur ne s'accompagne pas d'un processus de différenciation compatible avec la fonction du tissu d'origine. Il est donc important de comprendre ce qui fait qu'à un moment donné, une cellule ne répond plus aux nécessités de l'organe, mais se multiplie sans cesse jusqu'à engendrer une tumeur.

1.2 Les Neuroblastomes

Le neuroblastome est la plus fréquente tumeur solide de l'enfant entre 0 et 5 ans (Voute et al. 1984) et représente la seconde cause de mortalité de cette tranche d'âge après les accidents domestiques. Il représente 20 % des cancers de l'enfant et son incidence est de 1/7500. Le neuroblastome a comme origine les neurones du système nerveux périphérique issus de la crête neurale. Il provient de cellule neuronales embryonnaires du cou, du thorax, de l'abdomen ou du bassin. Le neuroblastome est souvent présent au moment de la naissance, mais les symptômes ne font habituellement leur apparition que plus tard lorsque la tumeur progresse. Approximativement 70 % des

patients meurent de cette maladie même avec des traitements chimiothérapeutiques sévères (Evans et al. 1980). La tumeur montre une grande variabilité allant d'une régression spontanée à une forme maligne agressive (Brodeur et al, 1989). Les causes de cette maladie sont inconnues mais plusieurs facteurs environnementaux ont été associés au risque d'augmentation de cette maladie, incluant l'exposition prénatale à certains produits chimiques comme l'alcool, ou le phénobarbital ou à un certain type de traitement médical contre les infections vaginales durant les mois de grossesse de la mère (Black et al. 1999). La tumeur sécrète des substances appelées acide vanilymandélique (VMA) et acide homovanilique (HVA) qui sont des métabolites de l'adrénaline et de la noradrénaline et sont excrétés dans l'urine et permettent la détection précoce de la tumeur (Grosfeld, 1998).

Certains neuroblastomes chez les bébés de moins d'un an disparaissent spontanément, même ceux qui sont étendus. Il arrive à l'occasion que cette tumeur se transforme en lésion bénigne suite à sa différenciation ou se propage ailleurs dans le corps, particulièrement aux ganglions lymphatiques, à la moelle osseuse, au foie, aux os, aux tissus qui entourent l'orbite et à la peau (Castleberry et al. 1997; Grosfeld et al. 1993; Matthay et al. 1995b, 1999a). Chez les enfants de plus de un an au moment du diagnostic de neuroblastome, 70 pour cent ont une maladie de stade avancé qui s'est propagée à distance du site primaire (Brodeur, 2000). Les patients atteints de neuroblastome sont classés en différents groupes selon le stade de la maladie et les caractéristiques de la tumeur (Black et al. 1999) (Table 1.1 et 1.2). Les enfants aux stades I-III, jouissent d'un bon pronostic (tumeur localisée) et sont guérissables par la chirurgie seule. Par contre, les enfants avec une maladie disséminée au diagnostic stade IV ont généralement le plus mauvais pronostic et profiteront de la chimiothérapie, de la chirurgie et occasionnellement de la radiothérapie (Hartmann et al.1997; Grosfeld, 1998).

1.2.1 Les caractéristiques génétiques et chromosomiques des neuroblastomes

Le neuroblastome est une tumeur qui a une biologie et des caractéristiques génétiques diversifiées. Ainsi, un neuroblastome de stade avancé chez un enfant de moins

Table 1.1 Définition des différents stades de neuroblastome

Stade	Définition
I	Tumeur limitée à l'organe ou à la structure d'origine
II	Tumeur dépassant la structure ou l'organe d'origine, mais ne dépassant pas la limite médiane (colonne vertébrale). Les ganglions régionaux du même côté peuvent être atteints
III	Tumeur dépassant la ligne médiane. Les ganglions dans la même cavité peuvent être atteints
IV	Présence de métastases à distance
IVS	Stade I ou II avec métastases à la moelle osseuse et (ou) sous cutanée et (ou) au foie (sans évidence d'atteinte osseuse)

(Castel et al. 1999)

Table 1.2 Classification des neuroblastomes selon leurs caractéristiques génétiques et cliniques

Caractéristiques	Type		
	1	2	3
Pronostic	Bon	Intermédiaire	Mauvais
Ploïdie	Hyperploïde	Quasi diploïde	Quasi diploïde
Perte d'hétérozygocité du chromosome 1p	Absente	Absente	Présente
Nombre de N-Myc	Normal	Normal	Augmenté
Stade	I, II, IVS	III, IV	Tous
Âge	Moins de 12 mois	Tout âge	Tout âge

(Brodeur et al. 1992)

d'un an n'aura pas le même pronostic que s'il était présent chez un enfant plus âgé (Brodeur et al. 1989). L'histologie de ces tumeurs démontre la présence de cellules immatures, voisinant avec des cellules ganglionnaires différenciées ayant perdu la capacité de se multiplier (Ross et al. 2001). Cette tumeur présente plusieurs anomalies *in vitro* et *in vivo* (Foley et al. 1991) comme une amplification du gène N-myc (Brodeur, 1993; Brodeur, 1995a; 1995b; Nakagawara et al. 1992), une délétion 1p du chromosome 1 (Brodeur et al. 1997a; 1997b) ou une altération du récepteur de NGF (Eggert et al. 2000a; 2000b).

1.2.1.1 Les anomalies chromosomiques

Parmi les altérations génétiques des neuroblastomes on peut distinguer trois entités différentes: 1. les tumeurs présentant une large délétion du chromosome 1p associée à une amplification de l'oncogène N-myc et à une sur-représentation du 17q. Ce sont des tumeurs qui présentent un pronostic redoutable lié notamment au caractère d'emblée métastatique de la maladie, 2. les tumeurs présentant une petite délétion du chromosome 1p sans amplification de N-myc mais qui présentent également un pronostic défavorable, 3. les tumeurs ne présentant ni amplification de N-myc, ni délétion du 1p, qui peuvent être soit localisées (bon pronostic), soit métastatiques (mauvais pronostic), sans qu'il existe actuellement de marqueurs permettant d'apprécier cette agressivité clinique qui demeure variable (O'Neill et al. 2001, Brodeur et al. 1997a). Jusqu'à 70 % des patients atteints de neuroblastome présentent une perte de l'hétérozygocité du chromosome 1p et du bras long des chromosomes 13 et 14 (Brodeur et al. 1997a). Le locus 1p36 est le site de délétion le plus commun chez les neuroblastomes (Brodeur et al. 1997a), il peut représenter le site des gènes suppresseurs, qui lorsque affecté par une délétion ou une translocation induit une tumeur maligne en permettant l'amplification du gène N-myc (Black et al. 1999; Li et al. 1992; Grosfeld et al. 1993; Seegar et al. 1985).

1.2.1.1.1 L'amplification du N-myc

La famille d'oncogènes myc code pour les protéines des facteurs de transcription N-Myc, c-Myc et L-Myc qui sont impliquées d'une part, dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Cole et al. 1999; Obaya et al. 1999; Ferrer et al. 2000) et d'autre part dans l'apoptose (Hoffman et al. 1998; Prendergast, 1999). Les protéines N-Myc, c-Myc et L-Myc sont largement exprimées dans les tissus et organes adultes et en voie de développement. La fonction de N-myc dans les cellules neuroépithéliales dépend largement du type cellulaire et de son stade de développement (Bernard et al. 1992; Sawai et al. 1993; Wakamatsu et al. 1997). 30 % des tumeurs de patients atteints du neuroblastome montrent une amplification de l'oncogène N-myc, qui est associée à un stage avancé de la maladie et liée à un pronostic défavorable (Grosfeld, 1999; Black et al. 1999; Matthay, 1995a; 1999a). Environ 90 % des tumeurs qui présentent une amplification du N-myc deviennent résistantes à la thérapie (Zehnbuer et al. 1988). La démonstration de l'amplification de l'oncogène N-myc dans la transformation des cellules de neuroblastomes reste indirecte. Cependant, l'inhibition de l'ARN messager de N-myc par un antisense en culture, inhibe complètement le pouvoir tumorigène et permet le retour des cellules à un phénotype normal (Negroni et al. 1991; Galderisi et al. 1999a; Galderisi et al. 1999b).

1.2.1.1.2 L'altération de TrkA

L'altération moléculaire et génétique des cellules de la crête neurale peut contribuer à leur transformation en cellules malignes. Les facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs ont été impliqués dans la pathogeneticité des neuroblastomes mais leurs rôles restent inconnus (Baker et al. 1989). La succession d'événements conduisant à la prolifération ou au déclenchement de la différenciation dans les cellules de la crête neurale est régulée entre autres par les facteurs neurotrophiques parmi les plus importants, le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain derived neurotrophic factor) et le NT-3 (neurotrophin-3) à travers leurs récepteurs respectifs, TrkA, TrkB et TrkC (Chao, 1992;

Kogner et al. 1993; Aoyama et al. 2001). Le TrkA est le récepteur de haute affinité de NGF (Eggert et al. 2000c, Eggert et al. 2001). Il est largement exprimé dans les neuroblastomes qui ont un pronostic favorable (Brodeur et al. 1997b). Il est impliqué dans l'induction de la différenciation chez les neuroblastomes et participe de cette façon à la régression spontanée de la tumeur (Aoyama et al. 2001). Les cellules de neuroblastome présentent plusieurs anomalies du récepteur de facteur de croissance NGF (Nakagawara et al. 1994). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que le TrkA est souvent non fonctionnel même s'il est exprimé, cela peut être attribué à une déficience dans la transmission de son signal en réponse à son ligand le NGF. La transfection du TrkA dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y entraîne la différenciation de ces cellules en réponse au NGF (Eggert et al. 2000a; 2000b) et l'inhibition de leur caractère tumorigène. De plus l'expression de TrkA dans les neuroblastomes est inversement proportionnelle à l'expression de N-Myc (Brodeur et al. 1997a). Finalement, comprendre la signalisation cellulaires à la base de ces altérations des neuroblastomes permettra d'établir de nouvelles solutions au traitement du neuroblastome et ainsi renverser le phénotype tumorigène.

1.2.2 Le traitement des neuroblastomes

Le dépistage du neuroblastome est rendu possible grâce à la propriété de cette tumeur de sécréter des catécolamines dans plus de 85 % des cas (Black et al. 1999). Lorsque le neuroblastome est diagnostiqué après l'âge d'un an, la maladie est fréquemment systémique et les approches thérapeutiques modernes permettent à moins de 25 % des enfants atteints de vaincre leur cancer (Grosfeld, 1998; Ross et al. 2001). Le potentiel évolutif, et donc le pronostic, est dépendant, pour des raisons non élucidées, de l'âge: plus l'enfant est jeune, meilleur est le pronostic, avec un seuil situé schématiquement autour de 12 mois (Black et al. 1999). Dans les premiers mois de vie, des régressions et guérisons spontanées sont possibles, et le caractère métastatique est beaucoup moins grave qu'après 12 mois (Eggert et al. 2000c; Eggert et al. 2000b). La chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie sont les trois armes classiques du traitement de ces cancers (Grosfeld, 1999; Brodeur, 2000).

1.2.2.1 La chirurgie

Il existerait plusieurs formes de la maladie au potentiel évolutif distinct : tumeurs de bas grade de malignité (I, II, IVS) dont la plupart se comportent plutôt comme des tumeurs bénignes. Ces tumeurs sont caractérisées par des anomalies génétiques et moléculaires comme une anomalie du chromosome 1, la présence d'une seule copie de N-myc, une expression élevée de TrkA et une activité enzymatique normale de l'énolase spécifique des neurones (Eggert et al. 2000d; Nickerson et al. 2000; DuBois et al. 1999). Le traitement privilégié dans ce cas est la chirurgie qui produit à elle seule des taux de survie sans maladie à long terme sans récurrence chez plus de 90 % des enfants atteints d'un neuroblastome localisé (Kaneko et al. 1997; Grosfeld et al. 1993). La chirurgie est parfois impossible à cause de l'emplacement de la tumeur ou par crainte de lésions des tissus cérébraux essentiels (Kaneko et al. 1997).

1.2.2.2 La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour le traitement des enfants dans le cas où la maladie a atteint le stade III et IV en prenant en considération la taille de la tumeur, sa localisation ainsi que l'âge de l'enfant atteint. L'utilisation de la radiothérapie est limitée en raison de la crainte de séquelles. L'indication de la radiothérapie reste l'amplification de N-myc (Deacon et al. 1985; Cheug et al. 1994). Pour les enfants avec des tumeurs au stade IV ou ceux présentant une rechute systémique, à l'obtention d'une rémission complète ou quasi complète, il a été suggéré d'utiliser des anticorps anti-neuroblastome radiologiquement marqués (Deacon et al. 1985; Cheug et al. 1994).

1.2.2.3 La chimiothérapie et la transplantation

La chimiothérapie est souvent indispensable puisque 60 % des patients de plus de un an sont métastatiques au diagnostic (stades IV). Le traitement standard des neuroblastomes métastatiques comporte une combinaison de plusieurs agents comme la

doxorubicine, le cyclophosphamide, le carboplatine, l'ipropaltine, l'acide rétinoïque, la vincristine ...etc. (Pritchard et al. 1986; Lovat et al. 1997). La persistance d'un envahissement médullaire à la fin de la chimiothérapie ainsi que la résistance multiple aux drogues sont les principaux facteurs de risque des tumeurs à mauvais pronostic (Brodeur, 1993). Pour les enfants réfractaires au traitement, ayant une rechute systémique, il est présentement suggéré de leur offrir une chimiothérapie lourde suivie d'une autogreffe des cellules souches de la moelle osseuse (Grosfeld, 1999).

1.2.2.4 La régression spontanée

La caractéristique la plus fascinante des neuroblastomes est leur régression spontanée spécifique du stade IVS. En effet, la plupart des neuroblastomes de ce stade particulier présentent une régression spontanée en ganglioneuroma, tumeurs plus bénignes. Cette caractéristique a été largement étudiée. Plusieurs chercheurs ont attribué ce phénomène soit à l'induction de la différenciation ou à l'apoptose (Teitz et al. 2001; Ambros et al. 2001). En effet, l'hypothèse proposée postule que ces tumeurs sont généralement bloquées durant leur processus de différenciation embryonnaire par un mécanisme encore inconnu (Brodeur, 2000; Brown et al. 1998). Il a été aussi suggéré que ces tumeurs détiennent encore les propriétés moléculaires et cellulaires pour entreprendre une différenciation qui aboutira dans des conditions appropriées soit à la formation de neurones, soit à la mort programmée des cellules de neuroblastes comme l'élimination durant le développement embryonnaire du système nerveux périphérique des neuroblastes en excès (Lovat et al. 1997; Boix et al. 1997; Ronca et al. 1997; Encinas et al. 2000; Guarneri et al. 2000; Malik et al. 2000).

L'induction de la différenciation et/ou de l'apoptose a été souvent étudiée dans les lignées de neuroblastomes. Il semble donc que l'exploration d'une voie qui régit le maintien de l'homéostasie cellulaire et moléculaire et ainsi permet la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose serait judicieuse. En effet, les jonctions communicantes de type gap sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie au niveau des tissus et des organes. La perte de communication cellulaire isole les

cellules de stimuli externes qui les maintient en état de différenciation et les entraîne à la prolifération et ainsi la formation des tumeurs (Trosko et al. 2000a; 2000b; Phipps et al. 1997).

1.2.3 Origine et caractéristiques des cellules IMR-32

Le modèle de lignée cellulaire utilisé dans ce travail est la lignée cellulaire de neuroblastome humain IMR-32. Les cellules IMR-32 dérivent d'une masse abdominale de neuroblastome formée dans un fœtus mâle de 13 mois (Tumilowicz et al. 1970). Des cultures cellulaires contenant les cellules non différenciées ont été établies à partir d'une culture primaire (Tumilowicz et al. 1970). En général, la tumeur de neuroblastome est formée d'un mélange hétérogène de trois types de cellules: cellules de type-N de forme neurales, de type-S (Schwann-like) de forme épithéliale et finalement le type I pour intermédiaire qui est un mélange de type S et N. Les cellules IMR-32 sont de type I et donc formées de deux types cellulaires soit des fibroblastes et des neuroblastes (Ross et al. 2001).

La lignée des cellules IMR-32 est caractérisée par une amplification du gène N-myc ainsi que par une sur-expression du gène mdm2 et une séquestration cytoplasmique de la forme sauvage de la protéine p53 (Marechal; 1997; Moll et al. 1996; Keshelava et al. 2001). En effet, les cellules IMR-32 contiennent 25 copies de N-myc (Brodeur et al. 1989). D'après les études de Azar et al. (1994) ces cellules ne répondent pas au NGF même si elles expriment son récepteur le TrkA. Ceci est attribué à l'absence d'autophosphorylation de TrkA consécutive à sa liaison avec le ligand le NGF, ce qui peut être dû à une anomalie moléculaire du récepteur TrkA (Tanaka et al. 1995; Tang et al. 2001). De plus, plusieurs caractéristiques font des cellules IMR-32 un modèle attrayant pour l'étude des événements cellulaires majeurs comme la différenciation, l'apoptose et la prolifération cellulaire: leur immortalité, la grande quantité de matériel disponible, la croissance et le maintien aisé dans un état non différencié, la manipulation possible de leur composition génétique, l'induction de la différenciation par une modification des conditions de culture.

1.3 L'implication possible des communications intercellulaires de type gap dans le neuroblastome

Le fonctionnement normal de tout organisme multicellulaire dépend de la coordination et de la synchronisation des réponses aux stimulus externes des cellules qui composent les organes (Trosko et al. 2000a). Cette coordination implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines (Trosko et al. 1998a). Ce système consiste en les jonctions intercellulaires de type gap. Les JICGs sont impliquées dans de nombreux processus fondamentaux, du développement embryonnaire à l'homéostasie des tissus et des organes adultes. Elles assurent la coordination des activités cellulaires et la synchronisation des réponses tissulaires (Yamasaki et al. 1996). Les JICGs sont constituées par des protéines transmembranaires, les connexines qui généralement s'associent en 6 pour former un canal permettant le passage de petites molécules d'une cellule à l'autre assurant ainsi un couplage intercellulaire (Yamasaki et al. 1999a; 1999c).

1.3.1 Les altérations des jonctions de type gap et les syndromes associés

Les JICGs sont impliquées de façon très importante dans la régulation de l'homéostasie et de la quiescence, le développement embryonnaire, la synchronisation des battements du cœur et les sécrétions glandulaires (Risek et al. 1990, Kelsell et al. 2001a; 2001b). Les mutations de certaines Cxs sont à l'origine de nombreuses maladies humaines héréditaires telles que, la cataracte (Shiels et al. 1998), la surdité profonde (Mignon et al. 1996; Sculerati et al. 2000; Kenna et al. 2001), l'infertilité (Simon et al. 1997), l'arythmie (Simon et al. 1998; Kirchhoff et al. 1998), la maladie d'hétérotaxie viscéroatriale (Syndrome D'Ivemark) (Britz-Cunningham et al. 1995). Les enfants atteints de cette dernière maladie présentent des mutations ponctuelles de la Cx43, entraînant le plus souvent la substitution du résidu Ser³⁶⁴ par un résidu proline (Britz-Cunningham et al. 1995). La maladie neuro-dégénérative de Charcot-Marie et Tooth se caractérise par des mutations ponctuelles diverses de la Cx32 pouvant survenir tout au long de la molécule et qui empêchent l'établissement de canaux jonctionnels compétents (Bergoffen et al. 1993, Seeman et al. 2001; Dubourg et al. 2001). L'altération de la fonction des

JICGs en l'absence de mutation contribue à un grand nombre de maladies comme le diabète, l'hypertension, la neuro-dégénération, l'altération des fonctions rénales et le dysfonctionnement érectile (Melman et al. 2001; Gutstein et al. 2001; Simon et al. 1999). En outre, l'expression forcée des gènes de connexines à l'intérieur de plusieurs lignées cellulaires a permis le rétablissement des JICGs et la suppression de la croissance tumorale tel que montré dans la Table 1.3.

1.3.2 Les jonctions gap et le cancer

Les jonctions communicantes sont des composantes importantes dans le maintien de la stabilité tissulaire puisqu'elles permettent aux cellules d'un même tissu de communiquer directement grâce à un échange direct de leurs contenus, principalement, des messagers secondaires qui régulent les protéines kinases. Or, dans le cas du cancer cette homéostasie est rompue. La prolifération cellulaire qui aboutit à la formation d'une tumeur ne s'accompagne pas d'un processus de différenciation compatible avec la fonction du tissu d'origine. Plusieurs études *in vitro* ont démontré l'influence des cellules normales avoisinantes sur la croissance des tumeurs (Enomoto et al. 1984, Yamasaki et al. 1999a; 1999b). Stoker et al. (1966) ont observé qu'en co-culture, les cellules normales contrôlent la prolifération des cellules tumorales et ils proposent le rôle possible des JICGs dans ce phénomène. Lors du traitement *in vitro* de cellules de rongeurs avec de la TPA (une substance tumorigénique), à des doses non toxiques, les communications par les jonctions gap sont réduites (Murray et al. 1979; Trosko et al. 1979; Mesnil et al. 1993; Chaumontet et al. 1997; Stahl et al. 2000). Cela suggère qu'une inhibition des communications par des substances cancérogènes favorise l'isolement des cellules précancéreuses (Table 1.4). En effet, Yamasaki et al. (1987) ont montré que la diffusion des substances de faible poids moléculaire ne se réalisait qu'entre les cellules malignes et ne débordait pas dans les cellules normales adjacentes à cause de l'absence de jonctions communicantes entre deux types cellulaires. Le traitement des tumeurs par des substances capables de rétablir les jonctions communicantes entre les cellules malignes et les cellules normales avoisinantes (AMP cyclique, acide rétinoïque, dexaméthasone) aboutit à la suppression du caractère malin (Yamasaki et al. 1988; Li et al. 1998).

Table 1.3 Effet suppresseur de tumeur induit par l'expression de gènes de connexines

Gène de connexine transfecté	Lignées cellulaires	Connexine normalement transcrite	Inhibition de la croissance	
			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Connexine 32	Hépatome humain	Connexine 32	-	+
Connexine 43	Fibroblastes de souris	Connexine 43	+	+
	Gliome de rat	Connexine 43	-	-
	Cellules Hela	Connexine 26	-	-
Connexine 40	Cellules Hela	Connexine 26	-	-
Connexine 26	Cellules Hela	Connexine 26	+	+
L'effet suppresseur de tumeur semble dépendre du type de connexine normalement exprimé				

(Yamazaki et al. 1999)

Table 1.4 Exemples de mécanismes impliqués dans la modulation des jonctions intercellulaires de type gap observées dans des tumeurs ou induits par des agents promoteurs de tumeurs

Mécanismes	Type de tumeurs ou de facteurs
Mutation des gènes de connexines	Tumeur primaire du foie de rat Cellules cancéreuses de poumon
Aberration au niveau de l'expression des gènes des connexines	Tumeur primaire humaine du foie (apparence de la Cx43) Tumeur primaire du foie de rat (réduction de la Cx32) Cellules cancéreuses de la vessie chez l'humain Tumeur de la vessie chez le rat
Réduction de l'expression protéique de la connexine	Tumeurs humaines variées Tumeur de la peau chez la souris Tumeur du foie chez le rat
Phosphorylation aberrante de la connexine	Par des agents promoteurs de tumeur (TPA, DDT, endosulfane ...) Par des oncogènes
Localisation aberrante de la connexine (cytoplasmique)	Tumeur primaire humaine du foie Tumeur primaire du foie de rat Par des agents promoteurs de tumeur dans le foie de rat Par des agents promoteurs de tumeur dans les cellules en culture
Absence de molécules d'adhésion	Tumeur des cellules de la peau chez la souris

(Yamzaki, 1996)

Ces observations semblent donc confirmer l'hypothèse que la présence de communication entre les deux types cellulaires inhibe le phénotype tumoral. Cette hypothèse a été renforcée par le fait que le gène de la connexine 26 (Cx26) n'est plus exprimé dans certains cancers du sein. Le gène de la Cx26 pourrait être un suppresseur de tumeur ou (anti-oncogène), c'est à dire un gène dont l'inactivation est un événement clé dans la cancérogenèse de certains tissus (Mesnil et al. 1997; Temme et al. 1997). On retiendra que l'altération de la communication intercellulaire est un phénomène commun à presque tous les cancers.

1.3.3 Les gènes des connexines

Au cours des dernières années il y a eu un progrès énorme dans l'identification et la caractérisation de nouveaux gènes de connexines. L'ADN complémentaire codant pour la Cx32 dans le rat ainsi que dans le foie humain a été clonée en 1986 (Kumar et al. 1986; Paul, 1986). La Cx43 et la Cx26 ont été découvertes il y a plusieurs années respectivement dans le cœur et le foie de rat (Beyer et al. 1989; Zhang et al. 1994). Jusqu'à maintenant 13 gènes de connexines ont été identifiés appartenant à 2 groupes différents. Le groupe α comprend 9 gènes et le groupes β comprend 6 gènes. Le groupe α comprend les connexines comportant une boucle cytoplasmique courte soit: la Cx33, la Cx37, la Cx40, la Cx43, la Cx45, la Cx46, la Cx50 et la Cx57, alors que le groupe β comprend les connexines comportant une boucle cytoplasmique plus longue soit : la Cx26, la Cx30, la Cx30.3, la Cx31 et la Cx32 (O'Brien et al. 1996; Manthey et al. 1999; Teubner et al. 2000).

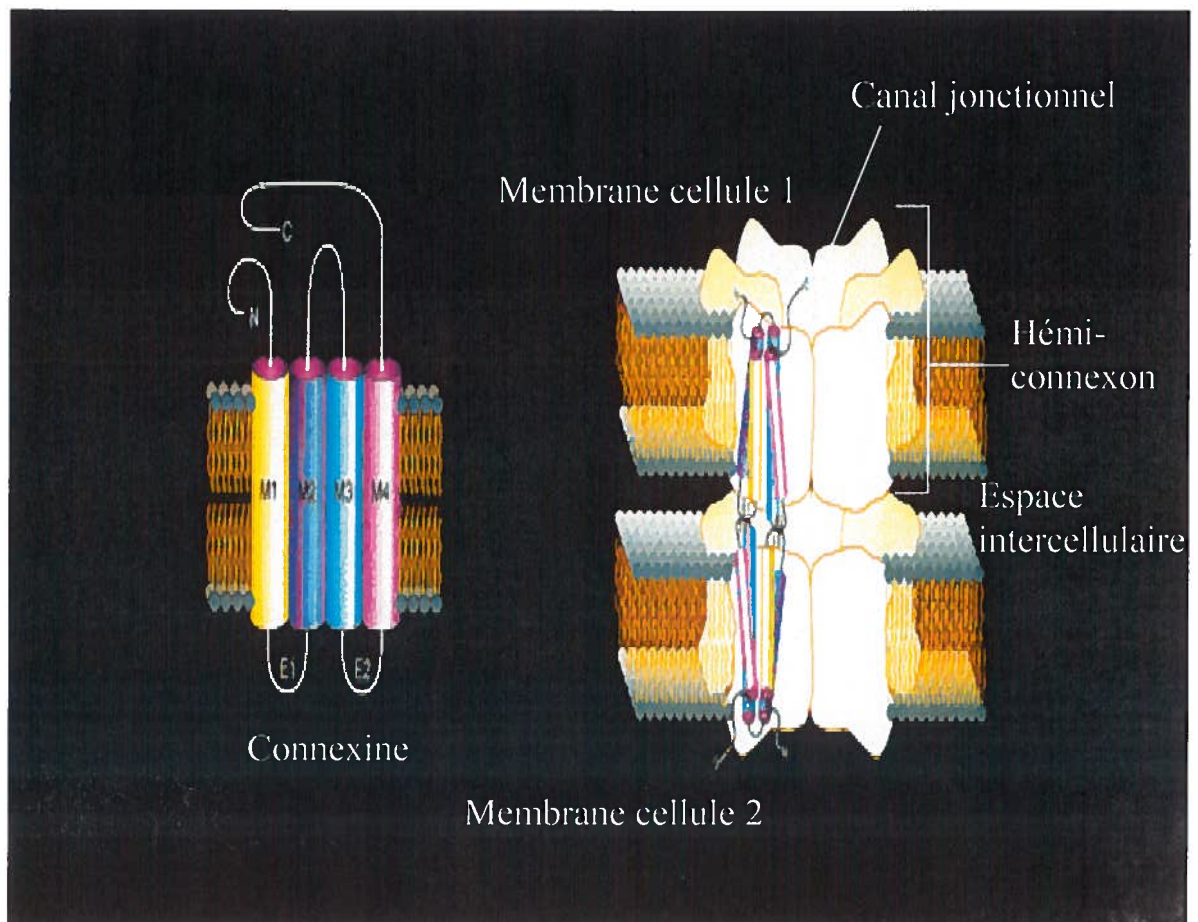
La plupart des gènes des connexines sont localisés sur des chromosomes différents (Meda, 1996). Chez l'humaine, les gènes codant pour les Cx26, Cx32 et Cx43 se trouvent respectivement sur les chromosomes 13, X et 6, et il y a un pseudogène pour la Cx43 sur le chromosome 5. Cependant, les gènes codant pour les Cx37 et Cx40 se trouvent tous les deux sur le chromosome 1, et ceux codant pour les Cx26 et Cx46 sur le chromosome 13 (Miller et al. 1988; Meda, 1996; Neuhaus et al. 1995; Sohl et al. 1996). Tous les gènes des connexines étudiés à ce jour montrent une structure similaire

comportant deux exons séparés par un long intron (Fishman et al. 1991; Young et al. 2001) Le petit exon (à peu près 100 paires de bases) code pour une séquence protéique non-transcrite, il est séparé du deuxième exon par un long intron (6000-8000 paires de bases) qui contient un site accepteur d'épissage en amont du codon du début. Le deuxième exon contient en un bloc toute la séquence codante pour la protéine. Les promoteurs du gène de la Cx43 de différentes origines soit humain, rat et souris ont été clonés (Sullivan et al. 1993; De Leon et al. 1994; Chen et al. 1995). Les 3 promoteurs contiennent une boîte TATA située en amont du codon d'initiation et plusieurs activateurs de protéines de transcription comme les sites AP-1 et AP-2 (Trosko et al. 1998a; 1998b).

1.3.4 Les connexines

Les connexines sont les protéines qui forment les jonctions intercellulaires de type gap. Dans la membrane cellulaire, elles sont arrangées en hexamères appelés connexons (Unger et al. 1997). Le canal de type gap situé dans la membrane plasmique résulte de l'association de deux demi-canaux identiques ou connexons, donnés séparément par chacune des cellules participantes (Figure 1.1) (Sosinsky, 1996). Le groupement des canaux constitue la plaque jonctionnelle qui est assez facilement identifiable en microscopie électronique (Unger et al. 1997).

La distribution des connexines varie au cours du développement et avec l'état fonctionnel du tissu ou de l'organe (Veenstra, 2001) (Table 1.5). Chacune des Cxs a son propre patron d'expression d'un type cellulaire à l'autre (Veenstra, 1996; Cao et al. 1998). Certaines Cxs sont produites par de très nombreux types cellulaires, alors que d'autres ont une distribution beaucoup plus restreinte, généralement plus d'une connexine est exprimé par cellule (Plum et al. 2000; Lo et al 2000). En effet, le patron d'expression peut être large, c'est le cas de la Cx43 qui est présente dans plusieurs tissus et organes ou plus spécifique, comme la Cx56 qui est restreinte aux cellules de la lentille cornéenne et la Cx33 aux cellules de Sertoli (Rousset, 1996). Chaque connexine est définie par la masse moléculaire de sa chaîne polypeptidique en kDa (ex. Cx26, Cx32, Cx43...). Elles



Kumar et al.1996

Figure 1.1 Schéma de la structure du canal jonctionnel de type gap et de la connexine

Table 1.5 La famille des connexines

Connexine	Poids moléculaire (kDa)	Organe d'expression
Cx50	49.6	Fibres du cristallin, cellules épithéliales de la cornée
Cx46	46.0	Fibres du cristallin, cellules musculaires cardiaques
Cx45	45.7	Cellules musculaires cardiaques, cellules du blastocytes, cellules épithéliales du poumon
Cx43	43.0	Cellules musculaires cardiaques, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices des glandes endocrines, kératinocytes
Cx40	40	Certaines cellules endothéliales, cellules du blastocytes, cellules du système de conduction cardiaque
Cx38	37.8	Embryon
Cx37	37.6	Certaines cellules endothéliales, certains kératinocytes et les cellules musculaires cardiaques
Cx33	32.9	Quelques cellules testiculaires
Cx32	32.0	Hépatocytes, cellules sécrétrices des glandes exocrines, certains neurones, oligodendrocytes, cellules de schwan
Cx31.1	31.1	Kératinocytes, cellules des épithéliums stratifiés
Cx31	31.0	Kératinocytes, cellules des blastocytes, cellules du trophoctoderme placentaire
Cx30.3	30.3	Blastocytes, certains kératinocytes
Cx26	26.5	Hépatocytes, cellules sécrétrices de glandes endocrines et exocrines, certains kératinocytes, cellules de l'épithélium intestinal

(Kumar et al. 1996)

ont leurs extrémités amine et carboxy-terminales dans le cytoplasme et comportent quatre portions hydrophobes (M1, M2, M3 et M4) reliées les unes aux autres par une boucle cytoplasmique et deux boucles intercellulaires (Figure 1.1). Les boucles extracellulaires sont impliquées dans la liaison entre connexons (Goodenough et al. 1996). Les différentes connexines diffèrent entre elles par la composition de leur extrémité carboxy-terminale (Goodenough et al. 1996). La Cx26 est la plus petite connexine puisque sa région carboxy-terminale ne possède que 18 acides aminés comparativement à 191 acides aminés pour la Cx46. L'extrémité C-terminale de la Cx43 est la mieux étudiée. Cette région comporte des résidus phosphorylables par des protéines kinases comme, la MAP kinase, la PKC et la PKA. Ces dernières sont impliquées dans la régulation des canaux de type gap (Cooper et al. 2000; Hertzberg et al. 2000).

1.3.4.1 La connexine 43

La Cx43 est la connexine la plus étudiée. Elle est largement distribuée dans une grande variété de cellules et tissus incluant, les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules endothéliales, les astrocytes, le myocarde, les fibroblastes et autres tissus lisses et connectifs (Beyer et al. 1993; Lo et al. 1997; Makarenkova et al. 1997). La Cx43 est en particulier exprimée dans toutes les glandes endocrines (antéhypophyse, parathyroïde, pancréas, corticosurrénales, thyroïde, testicules, ovaires), seule ou avec une ou plusieurs autres connexines (Munari-Silem et al. 1996). La thyroïde exprime par exemple la Cx43 et la Cx32. Au contraire, dans le pancréas endocrine, on ne détecte que la Cx43 (Rousset 1996; Zhao et al. 1999). Les cellules embryonnaires de la crête neurale expriment la Cx43 et la Cx46 durant leurs migrations, et leurs survies dépendent de la présence des JICGs (Huang et al. 1998; Bannerman et al. 2000). La délétion du gène de la Cx43 chez la souris conduit à la mort de cette dernière par suite d'une malformation cardiaque, ce type de mal formation cardiaque se retrouve également chez l'humain (Chen et al. 1995; Ewart et al. 1997; Ya et al. 1998).

1.3.5 Les canaux jonctionnels

Structurellement les JICGs sont constituées par des canaux intercellulaires hydrophiles qui présentent une faible résistance et une conductance élevée (Trosko et al. 2000a). Jusqu'à maintenant il n'y a aucune évidence montrant l'interaction des jonctions de type gap avec d'autres structures intracellulaires. Toutefois, les molécules d'adhésion intercellulaires tel que les cadherines qui sont requises pour le maintien d'une interaction physique des membranes plasmiques des cellules voisines donc, nécessaire au couplage des demi-canaux ou connexons (Hertig et al. 1996). Chaque connexon comporte un espace central hydrophile de 2 à 4 nm de diamètre. La reconnaissance entre connexons opposés est déterminée par la structure de leur domaine intercellulaire et par le type de connexine qui les forment (Bruzzone et al. 1996; Falk, 2000). Les canaux intercellulaires sont définis comme homomériques ou hétéromériques selon qu'ils sont formés d'une ou de plusieurs connexines (Thomas et al. 1998).

1.3.5.1 La perméabilité des canaux jonctionnels

Les Cxs forment un canal montrant des degrés différents de perméabilité, de sélection ionique et de taille de molécules transférées, indiquant que l'expression de l'une ou l'autre des connexines n'est pas fonctionnellement équivalente (Bruzzone et al. 1996). Les pores des canaux sont perméables aux molécules dont la masse moléculaire et le diamètre n'excèdent pas 1000 Da et 1.5 nm. Malgré cette limitation de taille, de nombreuses molécules telles que des ions, des acides aminés, des nucléotides, des co-facteurs vitaminiques, des métabolites de phospho-inositides, des sucres et des seconds messagers traversent les canaux des JICGs (Saez et al. 1989; 1993; Goodenough et al. 1996).

Les JICGs présentent une perméabilité différente selon leur composition en connexines ainsi les JICGs formés par la Cx43 permettent le transfert du jaune de Lucifer et de l'iodure de propodium, alors que les JICGs formés de Cx32 ne laissent passer que

le jaune de Lucifer. La sélection dépend du poids moléculaire du composé et de sa charge (Trosko et al. 2000b). Par la nature des molécules circulantes, les canaux de type gap régulent la transmission des messagers secondaires, effecteurs de protéine kinases et régulent ainsi l'activité de ces enzymes clés de la signalisation. En contre partie, comme les connexines sont un substrat pour les protéines kinases, un grand nombre de signaux (autocrine, facteurs de croissance, hormones et neurotransmetteurs) régulent le niveau des communications intercellulaires en contrôlant indirectement leur niveau de phosphorylation. On comprendra ainsi le rôle majeur que les canaux gap peuvent jouer dans l'organisation des processus cellulaires et tissulaires (Phipps et al. 1997; Yamasaki et al. 1996; Trosko et al. 1998b).

1.3.5.2 La fonction des canaux jonctionnels

Par opposition à d'autres formes de communication intercellulaire, le couplage par les jonctions gap permet l'équilibrer les gradients ionique et/ou moléculaire entre cellules voisines (Meda, 1996). Lorsque la concentration à l'équilibre atteint un seuil pour l'activation d'un mécanisme effecteur, plusieurs fonctions peuvent dès lors être modifiées simultanément dans toutes les cellules communicantes, assurant par-là un large recrutement de cellules fonctionnant de façon coordonnée (Saez et al. 1989). Le rôle principal des JICGs est vraisemblablement le contrôle des concentrations des messagers à travers les groupes de cellules. Il existe cependant d'autres fonctions physiologiques attribuées aux JICGs: la conduction des ondes électriques pour la coordination des contractions à travers des cellules excitées (contractions utérines, épilepsie) (Miyoshi, 1996). Chez certains tissus dépourvus de vaisseaux sanguins comme la cornée, elles représentent la seule voie de nutrition de ces cellules (White et al. 2000). Les JICGs propagent les stimulus hormonaux aux cellules non actives et régulent le développement embryonnaire (Trosko et al. 2000a; 2000b; Temme et al. 1997).

Il a été démontré récemment que, l'altération de l'expression génique d'une connexine durant l'embryogenèse conduit à plusieurs anomalies (Gasparini et al. 2000). Les JICGs sont aussi impliquées dans la croissance cellulaire. Cette fonction est

inversement corrélée à la différenciation (Yamasaki et al. 1999a). La preuve de l'implication des JICGs dans la prolifération cellulaire est basée sur trois observations expérimentales: 1- La relation inverse entre la capacité de croissance et la communication dans les cellules tumorales, 2- L'inhibition de leur croissance par la restauration des JICGs dans les cellules transfectées par des gènes de connexine, 3- La stimulation de la croissance en présence de certains mitogènes qui réduisent l'expression des JICGs, d'autre part l'inhibition de la croissance cellulaire augmente le couplage par les JICGs. Le mécanisme par lequel les JICGs régulent la prolifération cellulaire n'est pas entièrement élucidé. Il dépend de la régulation des connexines et de l'âge du tissu ou organe (Krutovskikh, 2000).

1.3.5.3 La régulation des canaux jonctionnels

La communication via les JICGs est régulée à plusieurs niveaux: la transcription du gène de la Cx, l'assemblage des Cxs en connexons, le transport à la membrane plasmique, l'assemblage de connexons en canaux jonctionnels, l'ouverture et la fermeture du canal jonctionnel, le désassemblage des JICGs et la dégradation des connexines par voie protéosomique et/ou lysosomique (Laird et al. 1995; 1996; VanSlyke et al. 2000a; 2000b). La phosphorylation est le principal mécanisme de régulation. Toutes les connexines peuvent être phosphorylées exceptée la Cx26 (Saez et al. 1990). La phosphorylation contrôle différents niveaux tel que la translocation de la Cx de l'appareil de Golgi à la membrane. Laird et al. ont trouvé que la Cx43 traverse l'appareil de Golgi et ont suggéré que la première phosphorylation conditionne la translocation dans le cytoplasme. En utilisant certains inhibiteurs du trafic protéique Musil et al. ont conclu que l'oligomérisation de la Cx43 en connexons se produit après son départ du réticulum endoplasmique (Musil et al. 1993). Le mécanisme par lequel les connexons sont délivrés à la membrane plasmique est controversé (Guerrier et al. 1995; Laird et al. 1996). Pour la Cx43, deux étapes de phosphorylation au moins sont connues: le transfert du cytoplasme vers la membrane plasmique et le contrôle du canal après localisation des connexons à la surface cellulaire (Laird et al. 1996; Musil et al. 1991).

Un grand nombre de signaux (oncogènes, autocrines, facteurs de croissance, neurotransmetteurs et hormones) régulent l'ouverture du canal, donc le niveau de la communication intercellulaire en activant les protéines kinases des récepteurs de la voie de la transduction et les cascades de signalisation (Lau et al. 1996).

Plusieurs études ont démontré que les Cxs peuvent être phosphorylées par plusieurs protéines kinases dans la partie carboxy-terminale située dans le cytoplasme où plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés (Beyer et al. 1993; Lampe et al. 2000). La phosphorylation des résidus serine, thréonine et tyrosine est la seule modification post-traductionnelle qui a été détectée dans les connexines (Filson et al. 1990; Saez et al. 1993; Rivedal et al. 2001). Les protéines kinases suivantes sont impliquées dans la phosphorylation des Cxs: PKC, PKA, MAPK et la Src-kinase (Figure 1.2). Elles altèrent la perméabilité des JICGs (Lampe et al. 2000). L'ester du phorbol (TPA) active spécifiquement la PKC, augmente la phosphorylation de la Cx43 et diminue les JICGs en agissant d'une part sur la perméabilité jonctionnelle et d'autre part sur l'assemblage des connexines en connexons dans une grande variété de cellules (Lampe, 1994; Lampe et al. 2000). La stimulation des cellules épithéliales par l'EGF (facteur de croissance épidermique) active le récepteur tyrosine kinase induisant une importante altération des JICGs suivie d'une augmentation de la phosphorylation de résidus serine (Ser²⁸², Ser²⁷⁷ et Ser²⁵⁵) de la Cx43 suivie d'une déphosphorylation (Kanemitsu et al. 1993; Rivedal et al. 2001). Le récepteur EGF n'agit pas directement, mais active une cascade aboutissant à l'activation de la MAP kinase qui est responsable de la phosphorylation des serines (Lau et al. 1996). Hossain et al. ont démontré que le PDGF induit une rapide inhibition des JICGs dans les cellules épithéliales de foie de rat (Hossain et al. 1999). L'action de PDGF est reliée à une hyperphosphorylation de la Cx43 par l'action combinée de la PKC et de la MAPK (Hossain et al. 1999).

En résumé la communication via les JICGs est un phénomène régulé: les canaux existent sous deux conformations ouverts ou fermés. L'exploration des mécanismes d'actions de certains régulateurs des voies de signalisations connus tel que la PKA, la PKC, la MAPK et d'autres moins connus tel que la céramide va

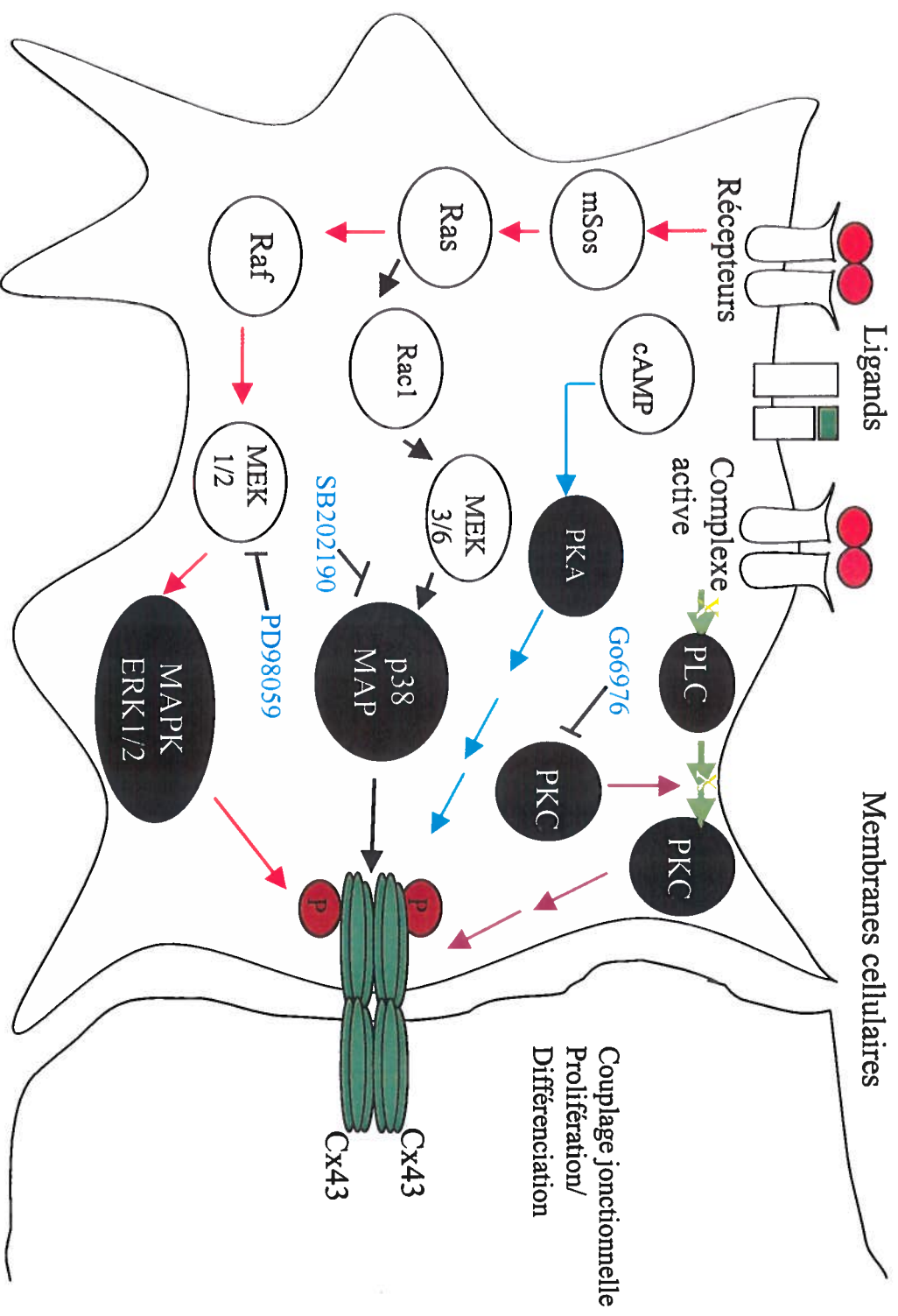


Figure 1.2. Représentations schématiques de quelques voies de signalisation impliquées dans la régulation des jonctions intercellulaires de type gap

Warn-Cramer et al. 1998

permettre d'élucider les voies nécessaires au contrôle du couplage jonctionnel et la régulation des phénomènes qui lui ont associés tel que la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

1.3.5.3.1 La protéine kinase A

La phosphorylation par les protéines kinases est probablement la voie métabolique la plus étudiée à l'heure actuelle, ayant servi dans les années 50 de premier modèle d'étude concernant la transmission d'un signal hormonal. Il s'agissait en effet de l'étude des effets de la noradrénaline sur la glycogénolyse au niveau de cellules hépatiques. Ces recherches ont permis à Sutherland, leur auteur, de développer le concept de messenger secondaire qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1960. Dans ce système, l'activation d'un récepteur membranaire par un premier messenger (la noradrénaline) induit dans le cytoplasme des cellules cibles la production d'un messenger secondaire qui à son tour va activer différents processus intervenant dans l'effet de l'hormone (Sutherland et al. 1966). L'identification de la glycogène phosphorylase kinase, nommée plus tard protéine kinase dépendante du cAMP (PKA) et son activation par la cAMP (Walsh et al. 1968), a conduit à l'élaboration de deux concepts fondamentaux soit, le système des cascades kinasiques et le concept du messenger secondaire (Smith et al. 1999). La PKA régule plusieurs fonctions vitales dont: le métabolisme énergétique, la transcription génétique, la prolifération et la différenciation cellulaire, la sécrétion, la contractilité et la motilité (Taylor et al. 1999a, 1999b).

La PKA est composée de deux sous unités, une sous unité régulatrice et une sous unité catalytique associées en un holoenzyme inactif. La sous unité régulatrice (R) est représentée par deux isoformes α et β (RI α , RI β et RII α , RII β), □□ alors que la sous unité catalytique (C) comprend 3 isoformes α , β et γ (Sandberg et al. 2001). En absence de la cAMP l'enzyme existe sous forme d'un holoenzyme tétramérique inactif (Sandberg et al. 2001). Les deux sous famille de PKA sont déterminées par leur sous unité R (Smith et al. 1999). La sous unité de type I n'est pas autophosphorylable est nécessite la présence de Mg²⁺ et d'ATP pour former un complexe avec la sous unité C. A l'opposé, la sous

unité R de type II, est autophosphorylable et ne nécessite pas la présence de Mg^{2+} et d'ATP pour former un complexe (Smith et al. 1999).

Dépendamment du type cellulaire, la cAMP est générée par l'activation de l'adenylyl cyclase qui répond à plusieurs stimuli (Sandberg et al. 2001). L'association de la cAMP avec la sous unité R du complexe enzymatique, provoque une diminution de l'affinité des sous unités R pour les sous unités C, et induit un changement conformationnel qui cause la dissociation du tétramère en dimère de sous unités régulatrices et de sous unités catalytiques actives. (Newlon et al. 2001). Les sous unités catalytiques ont plusieurs substrats connus (Zetterqvist et al. 1976). Leurs cibles varient suivant le type cellulaire et plus précisément la nature des protéines exprimées dans ces cellules. La sous unité C de la PKA permet la phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmiques comme la glycogène synthase (Parker et al. 1997), la pyruvate kinase (Hjelmquist et al. 1974), la phosphofructokinase II (Murray et al. 1984), l'inhibiteur I de la protéine phosphatase (Cohen et al. 1977) et toutes les protéines du foie qui contribuent à l'immobilisation du glycogène (Smith et al. 1999). La fonction la plus importante de la PKA est l'entrée de la sous unité catalytique dans le noyau ce qui induit la phosphorylation de la protéine CREB (cAMP - regulated enhancer binding protein) qui se lie à l'élément régulateur de la cAMP (CRE) et par conséquent l'activation de la transcription de plusieurs gènes (Singh et al. 2001).

1.3.5.3.1.1 La protéine kinase A et la différenciation

La différenciation cellulaire se caractérise par la disparition, dans une population cellulaire embryonnaire, de certains des caractères morphologiques propres à la souche dont elle dérive et qui s'accompagne d'une spécialisation dans la fonction (Gomez et al. 1998; Girgert et al. 2000). Chez les neuroblastomes, plusieurs composés chimiques et biologiques comme la cAMP peuvent induire une diminution de la prolifération, ce qui permet l'acquisition progressive de nouveaux caractères morphologiques et moléculaires, habituellement en rapport avec une spécialisation fonctionnelle (Reynolds, 2000a; Malik et al. 2000; Hewson et al. 2000; Hovland et al. 2001).

La mise en évidence morphologique de la différenciation dans les neuroblastomes est toujours possible, mais la différenciation moléculaire est le seul critère valable. On peut l'évaluer d'une part par l'observation de la diminution de la multiplication cellulaire ainsi que par la mesure de certains marqueurs de différenciation neuronale dont : les neurofilaments, l'énolase spécifique des neurones, les enzymes nécessaires à la sécrétion des neurotransmetteurs tel que l'acétylcholinestérase et la tyrosine hydroxylase (Brodeur et al. 1997).

L'amplification de N-myc ainsi que l'expression de TrkA et de H-ras servent comme des indicateurs de l'évaluation de la maladie de neuroblastome. Tandis que la sur-expression de N-myc sert comme un marqueur de pronostic défavorable, celles de TrkA et de H-ras sert comme marqueurs d'un pronostic favorable (Malik et al. 2000). Le 8-Br-cAMP un analogue perméable du cAMP permet d'induire la différenciation des cellules cancéreuses humaines dont le taux de divisions ralentit et provoque une diminution simultanée de la tumorigénicité (Kato et al. 1994; Naderi et al. 2000).

La différenciation des neuroblastomes par le 8-Br-cAMP est accompagnée de changements morphologiques concernant principalement l'extension des neurites et des changements dans l'expression de certains marqueurs neuronaux. Ces derniers incluent les neurofilaments (chaînes légères, moyenne et grande) et la tyrosine hydroxylase, une enzyme critique dans la synthèse des catécholamines et l'acétylcholinestérase (Misawa et al. 1993; Kim et al. 1994). L'inactivation du gène codant pour la sous unité C de la PKA bloque totalement le processus de différenciation. La transfection de cette souche PKA-nulle avec le gène sauvage rétablit la capacité des cellules à se différencier (Burgen et al. 2000).

1.3.5.3.1.2 La p53 et les neuroblastomes

Il existe dans notre organisme un subtil équilibre entre la division et la mort cellulaire qui est rompu dans les cancers en général. La faculté de prolifération

anarchique des cellules cancéreuses résulte le plus souvent de la modification de leur génome, qui touche principalement les oncogènes et les suppresseurs de tumeur (Weinberg, 1995; Levine, 1997; Sherr, 1996). Le gène p53 un suppresseur de tumeur est muté dans environ 60 % des cancers (Corvi et al. 1997). Il code pour une phosphoprotéine de 393 acides aminés, de poids moléculaire 53 kDa. Deux rôles particuliers sont dévolus à cette protéine: l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S dans les cellules normales et dans celles dont l'ADN est endommagé, et la mort cellulaire programmée ou apoptose (Gottlieb et al. 1996; Ko et al. 1996; Levine, 1997). La protéine p53 se lie à des séquences spécifiques de l'ADN. C'est un facteur de transcription aboutissant à une interaction avec le cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un gène appelé WAF1/Cip1 codant pour la protéine p21 inhibitrice de la kinase CDK2. La division cellulaire est bloquée avant la synthèse de l'ADN et permet de réparer d'éventuels dommages (Levine, 1997).

L'activité de la p53 est régulée par une autre protéine la Mdm2, fréquemment sur-exprimée dans les neuroblastomes (Corvi et al. 1997). Le gène mdm2 code pour une phosphoprotéine nucléaire de 491 acides aminés et 4 protéines présentant des délétions dans les parties N et C terminales. La protéine complète à des fonctions indépendantes de la p53 qui donnent un avantage de croissance aux cellules en inactivant la protéine onco-suppressive pRb (protéine du retinoblastome). La pRb phosphorylée active le facteur de transcription E2F permettant le passage des cellules de la phase G1 à la phase S.

La liaison de Mdm2 à la p53, fait sortir cette dernière du noyau cellulaire et la signale à un complexe protéique, appelé protéosome qui la dégrade (Haupt et al. 1997). Il a été démontré que la protéine p53 sauvage est séquestrée dans le cytoplasme des NB et cela aussi bien dans les biopsies que chez les lignées cellulaires non différenciées (Moll et al. 1996). Le mécanisme par lequel la p53 est séquestrée reste inconnu. On pense que l'induction de la différenciation est associée dans les neuroblastomes à la re-localisation de la p53 dans le noyau. Comme la p53 est impliquée à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules normales et tumorales et dans l'apoptose, la connaissance du

mécanisme qui régule sa sous-localisation pourrait être un paramètre important dans la thérapie des neuroblastomes.

1.3.5.3.1.3 La régulation des jonctions intercellulaires de type gap par la protéine kinase A

L'activation de la PKA par la cAMP permet l'augmentation de la stabilité et de la transcription des gènes qui codent pour les jonctions intercellulaires de type gap (Carystinos et al. 1999). Le flux entre différents états cellulaires (prolifération, différenciation) est régulé en partie par la PKA qui induit la modulation des jonctions intercellulaires de type gap qui en retour contrôlent l'arrêt de la croissance cellulaire ainsi que l'induction de la différenciation (Trosko et al. 2000b). Le traitement *in vitro* avec des analogues perméables de la cAMP induit l'arrêt de la prolifération en bloquant le cycle cellulaire à la phase G₁, un processus souvent lié à la présence des JICGs (Trosko et al. 2000a). Le processus de différenciation induit par le 8-Br-cAMP durant le développement embryonnaire est associé à la modulation de l'expression et de la fonction des JICGs (Trosko et al. 2000a; Warner-Cramer et al. 2001).

1.3.5.3.2 Les rétinoïdes

La vitamine A et ses dérivés actifs (acide tout *trans* rétinoïque, acide 9-*cis* rétinoïque) régulent de nombreux processus physiologiques incluant le développement, la morphogenèse, la croissance, le métabolisme et l'homéostasie cellulaire (Niles et al. 2000). Malgré leur importance établie dans ces processus biologiques, les rétinoïdes n'ont été utilisés que récemment en thérapie anti-cancéreuse (Lovat et al. 2001). Leurs effets sur la différenciation cellulaire, avec ou sans l'apport d'autres agents différenciateurs (cytokines, facteurs de croissance, interféron) ou sur l'apoptose sont de plus en plus documentés (Lovat et al. 2001). L'action des acides rétinoïques implique leurs liaisons à leurs récepteurs spécifiques. Deux classes de récepteurs nucléaires d'acides rétinoïques ont été identifiées, RAR et RXR, comportant chacune trois isoformes (RAR α , β , γ et RXR α , β , γ). Ces récepteurs se dimérisent en homo ou hétérodimères et agissent comme médiateur de la régulation de l'expression des gènes

(Ishikawa et al. 1990; Mattei et al. 1991; Hoopes et al. 1992; Niles et al. 2000). La spécificité de liaison des isoformes α , β et γ ne réside qu'au niveau de quelques acides aminés (Ostrowski et al. 1998; Scafonas et al. 1997; Renaud et al. 1995; Tairis et al. 1995).

Les récepteurs RARs lient l'acide tout *trans* rétinoïque (tRA) et l'acide 9-*cis* rétinoïque (cRA), alors que les récepteurs RXRs lient uniquement l'acide 9-*cis* rétinoïque (Miller et al. 2001; Lovat et al. 2001). Le transport de l'acide rétinoïque du cytoplasme jusqu'au noyau se fait par une protéine cellulaire de liaison appelé CRABP II (cellular retinoic acid-binding protein type II) (Gaub et al. 1998; Niles et al. 2000). L'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires requiert la formation d'interactions protéine:protéine directes ou indirectes avec un complexe multi-protéique, transcriptionnellement actif (Magni et al. 2000).

1.3.5.3.2.1 Les rétinoïdes et la différenciation

Les rétinoïdes sont des composés prometteurs en chimiothérapie aussi bien pour la prévention que pour le traitement des cancers (Chambon, 1996; Niles, 1998). Le chef de file des rétinoïdes naturels est le tRA utilisé en chimiothérapie depuis 1994 pour le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë, tout comme l'acide 9-*cis*-rétinoïque (Piedrafita et al. 1997; Nau et al. 1995; 1996). Après le succès obtenu dans le traitement de la leucémie promyélocytaire (Castaigne et al. 1993), un nombre croissant de tumeurs et d'hémopathie ont bénéficié d'essais cliniques.

Les résultats encourageants obtenus dans la plupart de ces cas montrent l'intérêt potentiel de l'utilisation des rétinoïdes dans ce type de thérapie. Par ailleurs, le tRA et l'acide 13-*cis*-rétinoïque sont utilisés couramment pour le traitement de certaines affections dermatologiques comme le psoriasis ou l'acné (Reynolds, 2000a; 2000b). Dans les deux indications, l'activité thérapeutique du tRA repose sur sa capacité à moduler la

prolifération et la différenciation cellulaires, qu'il s'agisse de cellules normales ou malignes (Grummer et al. 2000a; Grummer et al. 2000b; Magni et al. 2000).

L'interaction des rétinoïdes avec leurs récepteurs et leur capacité à induire la différenciation dans les neuroblastomes *in vitro* et *in vivo* à grandement influencé la pharmacologie anti-tumorale (Giannini et al. 1997a; Giannini et al. 1997b; Morriss-Kay et al. 1999). Le mécanisme à travers lequel le tRA induit la différenciation n'est pas complètement élucidé (Niles et al. 2000). Dans certaines lignées cellulaires, l'induction de la différenciation par le tRA nécessite la régulation de certaines kinases (Yen et al. 1998). Habituellement, cette voie de signalisation est associée à celle des facteurs de croissance activant la voie des MAP kinases et la prolifération, toutefois, la stimulation de la MAP Kinase par les facteurs de croissance est temporaire tandis que celle provoquée par le tRA est soutenue (Kharbanda et al. 1994; Niles et al. 2000). Dans les neuroblastomes, où a été mis en évidence le gène N-myc, et son amplification, le tRA semble diminuer l'expression de ce gène surtout en présence de l'interferon γ (Wada et al. 1997; Chambry et al. 1998).

1.3.5.3.2.2 L'acide rétinoïque et les jonctions intercellulaires de type gap

La communication cellulaire à travers les JICGs peut être modulée par plusieurs agents : les agents promoteurs de tumeur qui dans la plupart des cas diminuent la communication cellulaire tandis que les agents de différenciation induisent l'augmentation de la communication cellulaire (Clairmont et al. 1996b). Dans plusieurs lignées cellulaires, il a été démontré que le traitement par l'acide rétinoïque à des niveaux physiologiques induit une augmentation de la communication cellulaire. Cette augmentation est associée à une élévation des connexines au niveau de la transcription et de la traduction (Hossain et al. 1994a; Hossain et al. 1994b; Hanusch et al. 1995; Clairmont et al. 1996b; Carystinos et al. 2001). Dans le cas des tumeurs solides, le traitement avec l'acide rétinoïque induit une diminution de la croissance cellulaire et une induction de la différenciation corrélée avec une restauration de la communication cellulaire (Holder et al. 1993; Carystinos et al. 2001).

1.3.5.3.3 La protéine kinase C

La famille des protéines kinases C (PKC) comprend onze isoenzymes chez les mammifères (Dempsey et al. 2000). Cette famille de protéines étant impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et participe ainsi au contrôle de l'activité biologique. Les PKCs sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'émission des neurites dans plusieurs types de cellules incluant, les cellules nerveuses (Nishizuka et al. 1995; Steinberg et al. 1995; Carter, 2000). Les PKCs sont des serines/thréonines kinases découvertes en 1977 par Nishizuka et ses confrères (Takai et al. 1996; Inoue et al. 1999; 2000). Ces protéines kinases catalysent le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP au groupement hydroxyle des résidus serine ou/thréonine des protéines impliquées dans les voies de la signalisation cellulaire (Simkhovich et al. 1998).

Les isoformes des PKCs diffèrent par leur structure primaire (Dempsey et al. 2000). Elles sont classées en trois groupes, selon leurs activateurs et leurs similarités structurales (Watters et al. 1999). Les protéines kinases conventionnelles ou classiques (cPKC) qui comportent les PKC α , β I, β II et γ , nécessitent la présence du Ca^{2+} et de lipides (diacylglycérol (DAG), le phorbol ester et la phosphatidylsérine (PS)) pour leur activation. Les protéines kinases nouvelles (nPKC) qui regroupent les isoformes δ , ϵ , η et θ , sont indépendantes du Ca^{2+} , mais comme les cPKC, nécessitent la présence de lipides (DAG et PS) pour leurs activation. Et finalement, Les protéines kinases atypiques (aPKC) qui comportent les isoformes ζ et λ , ne sont activées que par le PS un effecteur obligatoire de chaque isoforme (pour revue voir Hofman et al. 1997; 2001; Mellor et al. 1998).

La structure des PKCs comporte une chaîne polypeptidique unique, divisée en 4 régions conservées à travers les différentes isoformes (C1, C2, C3 et C4) et 5 régions variables qui varient d'une isoenzyme à l'autre (V1, V2, V3, V4 et V5) (Way et al. 2000). Chaque isoenzyme possède à l'extrémité N-terminale un domaine régulateur et à l'extrémité carboxyle un domaine catalytique (Newton, 1997). Le domaine catalytique

(C) catalyse la phosphorylation des résidus serines et thréonines, alors que le domaine régulateur (R) contrôle (inhibe/active) le domaine C via des interactions intramoléculaires (Parissenti et al., 1998). Le domaine R contient entre autre une région d'auto-inhibition (pseudosubstrat), ainsi que les régions C1 et C2. Le rôle de la région C1 est de complexer le DAG et le phorbol ester (excepté pour les aPKC). La région C2, correspond au site de fixation des phospholipides (phosphatidylsérine) et du Ca^{2+} (seulement pour les cPKC). À noter que le Ca^{2+} est complexé dans une poche formée de résidus aspartates. De plus, des expériences ont démontré que chez les nPKC, dont l'activité n'est pas affectée par le Ca^{2+} , cette poche aspartate est absente (Newton, 1997; Johnson et al. 2000). Le domaine C contient la région C3, site de fixation de l'ATP, dont la séquence nucléotidique est conservée dans la plupart des PKCs. Le domaine C comprend aussi la région C4, correspondant au site actif de l'enzyme (Way et al. 2000).

Les PKCs sont activées par le DAG qui est généré par plusieurs phospholipases (Carricaburu et al. 2001). L'activation des PKCs requiert le retrait du pseudosubstrat qui occulte le site actif de l'enzyme ce qui permet au substrat de se fixer et d'être phosphorylé (Rybczynska et al. 2000). Ce changement conformationnel est accompli lorsque le DAG ou le PS, de la membrane, sont complexés avec les domaines C1 et C2 et que l'enzyme est phosphorylé à des sites précis. Il faut noter que les cPKC nécessitent aussi la chélation du Ca^{2+} au domaine C2, ce qui augmente l'affinité allostérique de ce domaine pour le phosphatidylsérine (Newton et al. 1997). L'activation de la PKC est associée à une translocation de l'enzyme du cytoplasme vers la membrane et une autophosphorylation du domaine C (Newton, 1997; Hofmann, 2001).

Les isoformes de PKC sont différemment impliquées dans la régulation des mécanismes cellulaires (Toker, 1998). La sur-expression de la PKC ϵ est liée à la différenciation (Zeidman et al. 1999a) ainsi qu'à la formation de tumeur, ce qui explique sa classification comme oncogène (Cacace et al. 1996; 1993). La PKC δ peut jouer différents rôles soient, un suppresseur de tumeur (Lu et al. 1997), un exécuteur du programme d'apoptose (Deacon et al. 1997) et un régulateur du transport des ions Na-K-2Cl (Liedtke et al. 1997a; 1997b; Saharinen et al. 1997). Les PKC Alpha et Zeta sont

souvent liées à la prolifération cellulaire et à la suppression du programme d'apoptose (Deacon et al. 1997; Watters et al. 1999; Cesaro et al. 2001).

1.3.5.3.3.1 La protéine kinase C et l'apoptose

L'apoptose est un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie cellulaire et le développement du système nerveux (Oppenheim et al. 1991a; 1991b). De nombreux signaux tant physiologiques que pathologiques, extracellulaires ou intracellulaires (drogues cytotoxiques, déprivation en facteur de croissance, p53, etc...), sont capables d'induire l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Blagosklonny, 2000a; 2000b; Cerda et al. 2001).

L'apoptose est personnalisée par la présence d'une condensation cellulaire accompagnée d'une fragmentation de la chromatine. Il s'ensuit une fragmentation nucléaire et cellulaire et l'apparition de corps apoptotiques contenant des fragments de cytosole contracté, des fragments de noyau et quelques organites qui seront phagocytés (pour revue voir Nicholson et al. 1997a; Xie et al. 2000). Au contraire, le phénomène définit comme nécrose se caractérise par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale et le relargage du contenu lysosomal provoquant une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant (Xie et al. 2000). Une apoptose inefficace, résultant d'anomalie génétique (telles que les mutations de p53 ou une sur-expression de c-myc ou de Bcl2), a été associée au développement de pathologies telles que les maladies auto-immunes ou le cancer. A l'inverse, un excès d'apoptose est symptomatique de maladies telles que les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer ou le sida (Burke et al. 1998; Guo et al. 1998; Guo et al. 1999; Duan et al. 1999). En dépit de la diversité des signaux inducteurs d'apoptose au nombre desquels la protéine p53 et le facteur de transcription NF- κ B, la plupart des cellules engagées dans le processus apoptotique aboutissent à l'activation irréversible de protéases à cystéine appelées caspases (pour cystéine aspartate protéase), bien qu'il existe d'autres déterminants importants de l'apoptose (Gorman et al. 1998; Thornberry et al. 1998a; 1998b; Green et al. 1998).

Divers travaux suggèrent que les PKCs soient impliquées dans le processus apoptotique (Woo et al. 1996; Heidkamp et al. 2001). Toutefois, l'effet régulateur de la PKC sur l'apoptose reste toujours controversé. En effet, dépendamment de la lignée cellulaire et du type du stimulus, la PKC peut agir comme inductrice ou inhibitrice de la mort cellulaire (Leszczynski et al. 1996; Zhuang et al. 1998a; 1998b). Dans les cellules HL-60 l'inhibition de la PKC augmente le processus apoptotique et l'activation de la PKC par exposition au PMA (phorbol-12-myristate 13-acetate) inhibe la mort cellulaire induite par les inhibiteurs de la topoisomérase I et II (Jarvis et al. 1996; Zhuang et al. 1998b). Il a également été observé, que l'inhibition de la PKC avec des inhibiteurs non-spécifiques comme le H7 ou la staurosporine provoque l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Toker, 1998, Behrens et al. 1999, Hofmann, 2001). C'est seulement depuis que les chercheurs s'intéressent à l'activité des isoformes de PKC que la question commence à se clarifier. De manière générale, les isoformes des classes cPKCs et aPKCs sont associées à la survie, tandis que les nPKCs, particulièrement l'isoforme delta, sont associés à l'apoptose (Nishizuka et al. 1995; Mak et al. 2001).

1.3.5.3.2 La protéine kinase C et les jonctions intercellulaires de type gap

Une des fonctions importante de la PKC est de réguler les jonctions intercellulaires de types gap par phosphorylation des connexines (Godwin et al. 1993; Budunova et al. 1994). En 1989, Takeda apporte la preuve que dans les hépatocytes, la régulation des PKCs augmente l'incorporation du ^{32}P dans la Cx32 suggérant que la PKC peut phosphoryler des acides aminées juste à côté de ceux phosphorylés par la PKA. En utilisant des peptides synthétiques correspondant à la région C-terminale de la Cx32, ils ont démontré que c'est le résidu Ser²³³ qui est phosphorylé par la PKC (Sàez et al. 1998). En général, dans les cellules contenant une forme non phosphorylée de la Cx43, la stimulation de la PKC avec le TPA engendre une diminution de la communication cellulaire et une augmentation de la phosphorylation de la Cx43. A l'opposé, dans les cellules où la forme phosphorylée de la Cx43 est déjà dominante le TPA augmente la

communication cellulaire mais ne cause aucun effet sur la phosphorylation de la Cx43 (Sàez et al. 1998; Sàez et al. 1997; Berthoud et al. 1993). La modulation directe de l'expression des connexines par les PKC Alpha et Epsilon a aussi été observée dans le cœur humain (Doble et al. 2000; Bowling et al. 2001).

1.3.5.3.4 La famille des MAP kinases

Les MAP-kinases (mitogen activated proteins kinases) sont un ensemble de protéine-kinases comprenant 3 groupes: Les ERKs (extracellular signal regulated kinases), la c-Jun terminal kinase (JNK) (stress activated protein kinase) et la p38 MAP kinase (p38) (Bennett et al. 1997; Burgen, 2000). Les MAP-kinases s'activent les unes les autres en cascade, par exemple, la MAP-kinase est activée par une MAP-kinase-kinase, elle-même activée par d'autres: MAP-kinase-kinase, MAP-kinase-kinase-kinase (Bogoyevitch, 2000). Les MAP kinases sont le point de convergence de différentes voies de signalisation. Activées, celles-ci transmettent en aval les signaux en phosphorylant différentes protéines cytoplasmiques et nucléaires dont des protéines kinases et des protéines contrôlant l'expression des gènes codant, entre autre, pour la synthèse de cytokines (Cobb, 1999). Dans les cellules neuronales, la voie de signalisation des MAP kinases est couplée à certains facteurs de croissance comme le EGF qui stimule la croissance cellulaire et le NGF (facteur de croissance neuronale) qui agit à la fois sur la survie et la progression de la différenciation cellulaire (Burgen, 2000). L'activation de la ERK1/2 MAP kinase implique la phosphorylation de résidus thréonine et serine et la formation d'un complexe multiprotéique. Il en résulte un transfert de la forme phosphorylée des ERKs dans le noyau et l'activation de l'expression de gènes spécifiques (Ono et al. 2000; Olsson et al. 2001).

Les MAP kinases sont classées en fonction de leurs modes d'activations et de la nature des acides aminés qui forment leurs sites d'activations (Burgen, 2000). Les MAP kinases de type ERK1/2 sont activées par le TPA et par des facteurs de croissance comme l'EGF (Haneda et al. 1999). Les MAP kinases c-Jun et les p38 sont activées par un certain nombre de protéines de stress et par des cytokines (Sluss et al. 1994; Meilke et al.

2000; Pawson et al. 1997). Une des voies d'activation de ERK1/2 passe par Ras qui joue un rôle important dans la transduction des signaux provenant des récepteurs tyrosine kinase. Par des intermédiaires le signal aboutit à la protéine Ras en l'activant sous la forme fixant le GTP (Jelinek et al. 1996; Morrison et al. 1997). Ceci provoque un changement de conformation de la protéine, la rendant capable d'interagir avec Raf (Kosako et al. 1992; Zheng et al. 1993a; 1993b). Activé, Raf phosphoryle et active les deux protéines kinases MEK1/2 et déclenche ensuite la voie complète des MAP kinases en phosphorylant les résidus tyrosines et thréonines de ERK1/2 (Michaud et al. 1997). Une fois l'ERK1/2 activée, sa localisation subcellulaire est modifiée, l'enzyme s'accumule dans le noyau en quelques dizaines de minutes. Il a été montré que cette re-localisation nucléaire était nécessaire à la reprise du cycle cellulaire en réponse aux stimuli mitogéniques (Cook et al. 1997; Brondello et al. 1997; Camps et al. 1998a; 1998b). Une fois dans le noyau les ERK/MAPK phosphorylent des facteurs trans-activateurs (Cobb, 1999).

Les p38 kinases représentent une famille de 4 kinases homologues qui dérivent de gènes différents soit, la p38 α (Han et al. 1997), la p38 β (Jiang et al. 1996), la p38 γ (Cuenda et al. 1997) et la p38 δ (Goedert et al. 1997a; Goedert et al. 1997b; Wang et al. 1997). Les p38 kinases sont exprimées dans plusieurs tissus incluant le cerveau, elles sont phosphorylées sur les résidus thréonine 180 et tyrosine 182 par l'intermédiaire d'une cascade de signalisation comprenant les MAP kinase kinases MKK3 et MKK6 (Raingeaud et al. 1995; Mielke et al. 2000; Derijard et al. 1995; Lin et al. 1995; Raingeaud et al. 1996). Les MAP kinase kinases MKK3 et MKK6 activent différemment les isoformes des p38 kinases. La MKK6 active la p38 α , la p38 β et la p38 γ tandis que la MKK3 active seulement la p38 α et la p38 γ (Enslen et al. 1998). L'activation de la p38 kinase entraîne la phosphorylation de plusieurs substrats cytoplasmiques comme la MAPKAP3 et la MAPKAP5 (MAP kinase activated protein kinase) (McLaughlin et al. 1996; Reynolds et al. 1997; Ni et al. 1998) et la Mnk1/2 (MAP kinase interacting kinase) (Han et al. 1997; Wang et al. 1998. Mielke et al. 2000).

1.3.5.3.4.1 La famille des MAP kinases et l'apoptose

Les inhibiteurs spécifiques de la voie de transduction du signal via la voie des MAP kinases fournissent un outil précieux qui permet de préciser la ou les voies impliquées dans l'apoptose (ERK, JNK, p38 ou l'ensemble de ces MAP kinases) (Flamigni et al. 2001a; Flamigni et al. 2001b). Le rôle que peuvent jouer les différentes voies de signalisations dans l'induction de l'apoptose a été le sujet de nombreux travaux. Généralement, la p44/42 MAP kinase, qui est activée par des facteurs de croissance a été considérée comme un médiateur de la survie cellulaire (Dent et al. 1998; Bonni et al. 1999). A l'opposé, la p38 qui est activée par des cytokines et certains facteurs de stress semble favoriser l'apoptose dans plusieurs modèles cellulaires (Berra et al. 1998; Birkenkamp et al. 1999; Jun et al. 1999a; 1999b). Cependant, le rôle exact de la p38 reste toujours controversé (Kong et al. 2000). En effet, tous les chercheurs n'interprètent pas de la même façon l'implication de la p38 dans l'induction ou la progression de l'apoptose : pour certains la p38 jouent un rôle pro-apoptotique, alors que pour d'autres, elle influence la survie cellulaire (Kong et al. 2000; Herrera et al. 2001).

La p38 joue un rôle dans l'apoptose induite par l'oxyde nitrique et le *cis*-platine dans les neurones en provoquant la translocation de la protéine Bax dans les mitochondries et contribue à l'induction de l'apoptose par les radiations ionisantes dans les cellules de kératinocytes en provoquant la libération du cytochrome C dans le cytoplasme (Huot et al. 1998; Ghatan et al. 2000). Certains travaux récents démontrent également la capacité de la p38 à jouer un rôle important dans l'induction de l'apoptose (Herrera et al. 2001; Flamigni et al. 2001a). En effet, de nombreux stimuli qui induisent l'apoptose activent la p38, cette activation est synchronisée avec les modifications morphologiques de la chromatine (Frasch et al. 1998; Karahashi et al. 2000).

1.3.5.3.4.2 La famille des MAP kinases et les jonctions intercellulaires de type gap

La partie C-terminale de la Cx43 renferme des sites de phosphorylation pour de nombreuses protéines kinases connues, incluant la PKC, La PKA, la Src kinase et la MAP kinase (Lau et al 1992). Ces protéines kinases phosphorylent la Cx43 et pourraient influencer la porosité des JICGs (Hossain et al. 1999). Divers travaux suggèrent que la

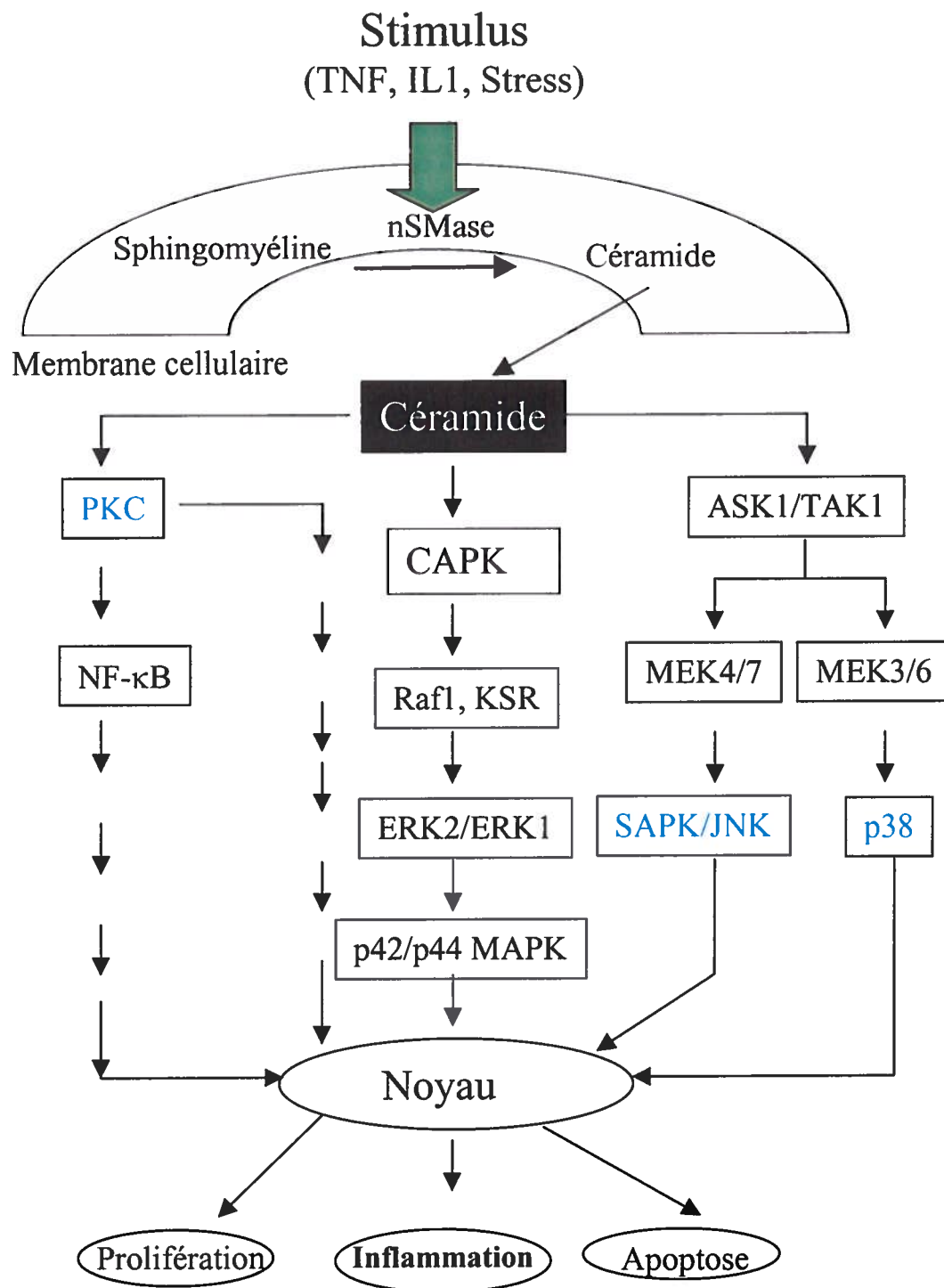
régulation des JICGs est corrélée à une phosphorylation post-transcriptionnelle de la Cx43 (Warn-Cramer et al. 2001). Ainsi, la phosphorylation des résidus serine, thréonine et/ou tyrosine a été associée à une diminution des JICGs (Cai et al. 1998; Bruce-Staskal et al. 2001). *In vitro*, la phosphorylation de la Cx43 au niveau du résidu serine semble mettre en jeu entre autres, les MAP kinases activées par l'EGF (Warn-Cramer et al. 1998). En effet, Warn-Cramer et al. (1998) ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation de Ras/Raf/MEK/MAP kinase dans la phosphorylation de la Cx43. La phosphorylation de la Cx43 dans ce cas se produit, au niveau de trois résidus serine soit : la Ser²⁵⁵, Ser²⁷⁹ et Ser²⁸² (Warn-Cramer et al. 1998; Warn-Cramer et al. 2001). Dans les cellules épithéliales il a été rapporté que la MAPK est responsable de l'hyperphosphorylation de la Cx43 et l'inhibition des jonctions cellulaires de type gap (Hossain et al. 1999).

1.3.5.3.5 Les céramides

La céramide, ou N-acyl-sphingosine, est un médiateur sphingolipidique généré sous l'effet de certains agonistes par la voie de signalisation dite voie sphingomyéline-céramide ou par synthèse *de novo* (Tavarani et al. 2000). La voie sphingomyéline-céramide consiste en l'hydrolyse par une sphingomyélinase neutre et/ou acide de la sphingomyéline avec génération concomitante de céramide (Johns et al. 1999; Han et al. 2000). La voie de transmission du signal dite "voie sphingomyéline-céramide" apparaît chez certains phénotypes comme une voie majeure de signalisation intracellulaire, qui serait impliquée dans la médiation de phénomènes biologiques aussi fondamentaux que la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire par apoptose (Pahlavani et al. 2000; Levade et al. 1999). De nombreux agents extracellulaires, dont le TNF (facteur de nécrose tumorale), IFN-gamma (interféron gamma), daunorubicine, et les radiations ionisantes (des agents utilisés dans la thérapie des neuroblastomes), peuvent stimuler cette voie en induisant l'hydrolyse de la sphingomyéline et la production, de céramide (comme messenger secondaire lipidique et un autre produit la phosphocholine) (pour revue voir Liu et al., 1999; Nardini et al. 2001).

La céramide est impliquée dans plusieurs maladies. En effet, plusieurs études ont démontré qu'elle joue un rôle central dans le développement de plusieurs maladies humaine incluant: l'athérosclérose, l'inflammation, la résistance à l'insuline, le diabète et les maladies neurodégénératives (Hannun et al. 1994; Mathias et al. 1998; Nardini et al. 2001). En accord avec ces études, d'autres résultats ont démontré que la concentration de céramide augmente sensiblement lors de l'infection des lymphocytes T par le virus du HIV, suggérant, un rôle potentiel de ce lipide dans la progression de l'acquisition du syndrome d'immunodéficience (Van Veldhoven et al. 1992; Rivas et al. 1993; Nardini et al. 2001).

La voie de la céramide induit la signalisation cellulaire en activant diverses cibles cellulaires incluant certaines isoformes de la PKC, des MAP kinases, des phosphatases, des facteurs de transcription et des oncogènes (Raf, Myc et Rb) (Ballou et al. 1996; Hannun et al. 1996; Mathias et al. 1998; Huwiler et al. 2001; Riboni et al. 2001) (Figure 1.3). La concentration intracellulaire de céramide est aussi strictement régulée à cause de la dualité de son effet qui, dépendamment de la dose, induit des effets différents (Pahlavani et al. 2000). Plusieurs analogues de la céramide ont été utilisés *in vitro*. Ces analogues ont généralement des courtes chaînes d'acides gras, comme la C2, la C6 et la C8-céramide (pour revue voir Mathias et al. 1998). La C2-céramide (N-acétylsphingosine) à cause de sa courte chaîne d'acides gras, est plus perméable comparée aux céramides naturelles qui ont des chaînes plus longues (Liu et al. 1999). L'exposition des cellules à la C2-céramide mimique l'effet d'une élévation de céramide endogène et permet donc de produire la concentration en céramide nécessaire à l'induction d'une réponse cellulaire contrôlée soit l'effet apoptotique ou l'arrêt de la prolifération (Han et al. 2000).



Liu et al. 1999

Figure 1.3 Les voies de signalisation des céramides

1.3.5.3.5.1 Les céramides et l'apoptose

L'induction et la régulation de l'apoptose n'est pas uniquement liée à l'activité des protéines de la famille de Bcl-2, de la p53 et des caspases (Snider et al. 1997; Salvesen et al. 1997; Zhivotovsky et al. 1999). Il existe d'autres déterminants importants de la voie d'apoptose au nombre desquels la céramide (Hannun et al. 2000; Engdal et al. 2001). En 1993, Obeid et al. ont démontré que la C2-céramide induit une perturbation du cytosquelette, une altération de la réplication et de la réparation de l'ADN, une fragmentation nucléaire et la désintégration de la cellule, qui sont des caractéristiques typiques de l'apoptose. Ces résultats ont été confirmés par divers travaux démontrant que la céramide est impliquée dans le processus apoptotique (Harada-Shiba et al. 1998; Sillence, 2001; Vanblitterswijk et al. 2001). En effet, de nombreux facteurs de stress comme les radiations ionisantes et le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) induisent l'apoptose en association avec une augmentation rapide de la céramide endogène (Verheij et al. 1998; Liu et al. 1999).

La céramide induit l'apoptose par une voie indépendante de la voie de signalisation de la p53 par activation de la caspase 3 (Yoshimora et al. 1998). Cette dernière active alors, la cascade pro-apoptotique de la kinase JNK/SAP (Cuvillier et al. 1998; Maurer et al. 1999). D'autres résultats plus récents ont montré que l'augmentation de la concentration de céramide dans des cultures primaires de neurones, induit une production mitochondriale de radicaux libres. Cet événement est immédiatement suivi de la translocation du facteur de transcription NF-kB dans le noyau. Ceci suggère que la production des radicaux libres et l'activation de NF-kB sont des événements précoces du processus apoptotique, alors que le dysfonctionnement mitochondrial est un processus plus tardif (Nardini et al. 2001). Le rôle du facteur de transcription NF-kB dans le processus apoptotique induit par les céramides reste encore très controversé et peut aller d'un rôle protecteur à un rôle activateur, et dépend probablement du phénotype cellulaire (Aggarwal et al. 1997; Nardini et al. 2001).

1.3.5.3.5.2 Les céramides et la protéine kinase C

Plusieurs faits suggèrent l'implication des certaines isoformes de PKC dans la transmission du signal induit par les céramides (Liu et al. 1999). En effet, Certains activateurs de PKCs comme les esters de phorbol et le diacyl glycérol inhibent l'abilité de la céramide à induire l'apoptose, tandis que certains inhibiteurs de PKC augmentent cet effet (Levade et al. 1999). Jusqu'à maintenant, peu de travaux ont été faits sur l'étude du rôle de la PKC dans la régulation de la production de céramide (Han et al. 2000). Certains inhibiteurs de la PKC agissent sur la sphingomyélinase neutre, ce qui suggère que la PKC joue un rôle important en régulant l'activité basale de la sphingomyélinase (Chmura et al. 1996a; 1996b; Chmura et al. 1997). Ces observations coïncident avec d'autres études qui rapportent que le TPA inhibe la génération de la céramide ainsi que l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales irradiées (Goldkorn et al. 1998; Garzotto et al. 1998). Certains travaux démontrent également la capacité de la céramide à prévenir la translocation des protéines G et des phospholipases D du cytoplasme jusqu'à la membrane (Abousalham et al. 1997; Chen et al. 2000). En effet, la céramide inhibe la capacité du phorbol ester d'induire l'activation de la phospholipase D mais sans empêcher la translocation de la PKC (Venable et al. 1996). Enfin, de façon générale, divers travaux rapportent que plusieurs isoformes de PKC (Alpha, Beta, Delta, Epsilon et Zeta) sont impliquées dans la voie de signalisation induite par la céramide, cependant, l'implication d'une ou l'autre des isoformes semble spécifique du phénotype cellulaire (Abousalham et al. 1997; Tanabe et al. 1998; Galve-Roperh et al. 1997; Han et al. 2000).

1.3.5.3.5.2 Les céramides et la famille des MAP kinases

Les cascades des MAPK kinases interviennent au niveau de différentes étapes de la transduction du signal depuis la surface de la cellule jusqu'au noyau (Flamigni et al. 2001a; Flamigni et al. 2001b). La première voie est fortement stimulée par des signaux de croissance conduit à l'activation des MAPK/ERK kinases et traduit un message mitogénique. Les autres voies sont principalement activées en réponse à différents stress cellulaires, tels que les coupures de l'ADN ou l'action du $\text{TNF}\alpha$, et conduisent à

l'activation des SAPK/JNK et des p38 kinases (Robinson et al. 1997; Dhanasekaran, 1998; Dhanasekaran et al. 1998). La céramide semble induire l'activation des voies de signalisation de ERK/MAPK (Gulbins et al. 1996a; Gulbins et al. 1996b; Modur et al. 1996). En effet, le traitement de certaines lignées cellulaires avec la céramide provoque une augmentation intracellulaire de l'activité des ERKs (Suchard et al. 1997; Liu et al. 1999; Conway et al. 2000).

Par ailleurs, d'autres études ont également rapporté que l'induction de l'apoptose par les céramides est spécifiquement liée à l'activation de la voie de signalisation Raf1/ERK (Suchard et al. 1997; Blazquez et al. 2000). Ces observations sont compatibles avec le fait que la céramide est un cofacteur lipidique qui agit indirectement sur l'activation de la voie de signalisation de ERK/MAP kinase (Basu et al. 1998; Guzman et al. 2001). Toutefois, l'activation des voies de signalisation des MAP kinases par les céramides paraît très complexe et implique plusieurs signaux ainsi que la réponse de certaines protéines spécifiques (Liu et al. 2001).

1.3.5.3.5.2 Les céramides et les jonctions intercellulaires de type gap

L'importance que jouent les jonctions intercellulaires de type gap ainsi que les céramides dans les différents processus physiologiques nous amène à penser à l'existence potentielle d'un lien entre les deux. En effet, les céramides et les JICGs jouent des rôles communs dans plusieurs réponses cellulaires comme l'apoptose, la différenciation cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire. Donc, il apparaît important d'identifier si des liens relient ces deux mécanismes directement ou indirectement et si la régulation de la voie de signalisation par les céramides et le contrôle des jonctions intercellulaires de type gap relèvent de processus communs.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture des cellules IMR-32

2.1.1 Conditions générales

Les cellules IMR-32 et les cellules C6 ont été cultivées selon le protocole établi par Tumilowicz et al. (1970). Les cellules sont cultivées à 37 °C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, et dans un milieu complet MEM ou "Minimum essentiel medium", (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) contenant 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco BRL), préalablement inactivé 30 min à 56 °C, ainsi que 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 0.24 µg/ml de gentamycine, 1 % de pyruvate de sodium (100 mM), 1 % de sodium nucléosides, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de glutamine (100 mM) (Gibco BRL).

Lors de la trypsinisation et du passage des cellules, le milieu de culture est retiré des boîtes de Pétri (Gibco BRL) et les cellules sont lavées une fois avec une solution saline tamponnée (PBS sans calcium ni magnésium) (Gibco BRL) et incubées 1 min à 37 °C en présence de 0.5 ml d'une solution de trypsine 0.25 % p/v-EDTA 5 mM (Gibco BRL). La réaction de trypsinisation est arrêtée par addition d'un volume équivalent de milieu complet. Les cellules sont ensuite récupérées dans un tube conique par centrifugation à 1000 (centrifugeuse Beckman GPR) pendant 5 min. Les cellules sont comptées avec un hémacytomètre sous un microscope optique par la méthode d'exclusion du trypan bleu puis réensemencées à raison de 2×10^4 et/ou 1×10^5 cellules dans des plaques de six puits, des fioles de 25 cm² ou des boîtes de pétri de 100 mm (Gibco BRL), selon le type d'expérience.

2.1.2 Évaluation de la prolifération cellulaire

Les cellules sont mises en culture comme indiqué dans le paragraphe précédent dans des plaques de 96 puits (Sarstedt) contenant 2×10^4 cellules par puits. Les cellules

sont rincées 2 fois avec 250 µl de PBS. Ensuite, 100 µl de tampon de lyse (0.02 % de SDS dans 1x SSC) préparé à partir d'une solution stock de 20 x SSC (157.3 g de NaCl et 88.2 g d'acétate de sodium, préalablement maintenue à la température de la pièce) est ajouté dans tous les puits exceptés ceux réservés à l'ADN standard. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pour 1 heure. Après l'incubation, 100 µl d'ADN (40 µg/ml) est ajoutée aux puits réservés à l'ADN standard. Un volume de 100 µl du réactif de Hoechst 33258 (4.0 µg/ml dans 1 X SSC) (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, Mo, USA) est ajouté à chacun des puits de la plaque et le tout est agité doucement pendant 5 min à 37 °C. Le nombre des cellules est déduit de l'intensité de fluorescence mesurée aux longueurs d'onde suivantes : excitation 355 nm et émission 460 nm avec le CytoFluor™ 2300/2350. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN (le réactif de Hoechst fluorescent quand il est lié à l'ADN) et donc indirectement proportionnel au nombre de cellules. Des courbes standards permettent de connaître le nombre de cellules par rapport aux mesures d'intensité de fluorescence.

2.1.3 Différenciation cellulaire

La différenciation neuronale des cellules IMR-32 est établie de la façon suivante. Au jour zéro du protocole de différenciation, 1×10^5 cellules IMR-32 sontensemencées dans des pétris de culture ou dans des fioles de 25 cm² dans le milieu MEM contenant 10 % de FBS. Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture est retiré et remplacé par un milieu contenant soit 0.5 mM de 8-Br-cAMP (Boehringer Mannheim, Dorval, Québec, Canada) ou 1 µM d'acide *trans* rétinolique (tRA) (Sigma-Aldrich Chemical Company) ou la combinaison des deux. Les cellules IMR-32 traitées sont incubées pendant des durées croissantes selon les expériences.

2.1.4 Traitement cellulaire

Environ 5×10^5 cellules sontensemencées dans des boîtes de pétris de 100 mm de diamètre, cultivées à 37 °C, et traitées 24 heures plus tard. Les inhibiteurs suivant ont été utilisés durant ce travail: Bisindolylmaleimide GF 109203X (4.0 µM), Go6983 (1 µM),

Go6976 (160 nM), TPA (100 nM), H7 (200 μ M); staurosporine (250 nM); SB202190 (25 μ M); PD98059 (25 μ M) et C2-céramide (25 et 100 μ M). L'accroissement des populations cellulaires est analysé à différents temps de traitement et cela après exposition aux effecteurs cités ci-dessus tel que décrit dans les sections 2.1.1 et 2.1.2. Pour les traitements combinés, les cellules sont traitées durant 24 heures par des solutions d'effecteurs, aux concentrations données ci-dessus, suivi d'un traitement par un second effecteur exemple la C2-céramide.

2.2 Technique de cytométrie de flux

Les cellules traitées et non traitées sont trypsinisées et énumérées tel que décrit plus haut. Les cellules sont ensuite réparties à raison de 1×10^5 dans des tubes à essai, lavées deux fois avec un tampon phosphate PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) (Boehringer Mannheim, Dorval, Québec, Canada) et 0.02 % d'azide de sodium (Sigma-Aldrich Chemical Company) centrifugées à $500 \times g$ à 4 °C pendant 5 min et fixées par une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur la glace. Les cellules fixées sont ensuite lavées avec la solution de PBS/BSA deux fois comme décrit auparavant. Après la préparation de l'anticorps aux dilutions adéquates (Table 2.1), on ajoute un volume de 100 μ l d'anticorps primaire par tube. L'ensemble est incubé à la température de la pièce pendant 30 min. Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon précédant et mises en présence de 100 μ l du second anticorps conjugué à la fluorescéine (FITC) (Chemicon International Inc., Temecula, Ca, USA) puis incubées à la température de la pièce pendant 30 min à l'abri de la lumière. Les cellules sont de nouveau lavées deux fois pour éliminer l'excès d'anticorps, resuspendues dans le même tampon et conservées à l'obscurité jusqu'à leur analyse.

2.3 Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre sur des lamelles (Bellco Glass, Inc. Vineland, NJ, USA). Les lamelles sont préalablement traitées

au NaOH 1 M pendant 4 heures. Après neutralisation avec une solution HCl 1 N et lavage à l'eau distillée courante pendant 30 min, elles sont stérilisées au four à une température de 125 °C pendant 4 heures. Les cellules sont cultivées sur les lamelles et incubées à 37 °C jusqu'à sub-confluence. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées avec une solution de 4 % paraformaldéhyde dans du PBS (Sigma-Aldrich Chemical Company) pendant 20 min. Les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de BSA 1 % (p/v) dans du PBS. Les cellules sont ensuite exposées à une solution d'anticorps primaires, dilués aux concentrations adéquates dans du PBS (Table 2.1), pendant 1 heure à 37 °C. Après 3 lavages au PBS les cellules sont exposées à l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline couplé à un fluochrome Alexa (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) dilué dans du PBS pendant 1 heure à 37 °C. Après 3 lavages et séchages, les lamelles sont déposées sur une goutte de milieu de montage (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA). Les cellules sont examinées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence et contraste de phase (IMT2-NIC2 Olympus ou UFX-DX Nikon) ou bien à l'aide d'un microscope confocale équipé d'un microscope MRC-1000 (Bio-Rad) qui possède 2 lasers: laser U.V. (Argon Ion): excitation : 351 nm, 488 nm et 514 nm, laser visible (Krypton Argon): excitation: 488 nm, 568 nm et 633 nm. Ensuite, les cellules sont photographiées en utilisant une combinaison appropriée de filtres, pour la détection du fluochrome utilisé, à l'aide d'un caméra 35 mm équipé d'un film Ektachrome 400.

2.4 Reconnaissance de l'apoptose par la méthode de Hoechst

Par cette méthode, on utilise le fait que l'apoptose s'accompagne d'une condensation de l'ADN. Les cellules contrôle ou traitées avec les différents effecteurs sont rincées avec du PBS, et fixées par 4 % paraphormaldéhyde dans du PBS pendant 20 min. Après 3 lavages au PBS les cellules sont exposées à une solution de 1 µg/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dilué dans du PBS pendant 10 min. Les cellules ont été ensuite lavées 3 fois avec du PBS pendant 5 min et examinées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence et contraste de phase (IMT2-NIC2 Olympus) équipé du filtre approprié et associé à un programme d'imagerie (Image-Pro Plus 3).

Table 2.1 Les différents types d'anticorps utilisés, leurs provenances et leurs dilutions pour la cytométrie de flux, l'immunofluorescence et l'immunobuvardage

Nom	Dilutions	Provenance
Anti-N-Myc	1:250	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, USA
Anti-PKC	1:250	"
Anti-TrkA	1:250	"
Anti-p53	1:250	"
Anti-p21	1:250	"
Anti-Mdm2	1:250	"
Anti-Cx43	1:250	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, USA
Anti-Cx43	1:50	Zymed Lab., San Francisco, Ca, USA
Anti- NSE	1:50	Chemicon International Inc., Tenecula, Ca, USA
Anti-NF 200 et 68	1:50	"
Anti-H-ras	1:50	"

2.5 Analyse des communications intercellulaires par la technique du “scrape loading”

L'évaluation directe de la perméabilité des jonctions intercellulaires de type gap est effectuée à l'aide d'un colorant fluorescent de faible poids moléculaire le jaune de Lucifer (445) (Sigma-Aldrich Chemical Company), auquel les cellules sont imperméables (Trosko et al. 2000a; 2000b). La monocouche de cellules est lésée par une entaille faite par un scalpel dans la couche cellulaire en présence d'une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dissout dans du PBS et incubée à l'abri de la lumière pendant 10 min. Les cellules lésées se chargent de colorant fluorescent qui ne peut se propager aux cellules avoisinantes qu'à travers les canaux intercellulaires de types gap. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont fixées avec une solution de 4 % paraphormaldéhyde dilué dans du PBS pendant 30 min et lavées 3 fois avec du PBS. L'ensemble est examiné au microscope à épi-fluorescence tel que décrit à la section 2.3.

2.6 Technique d'incorporation des anticorps

Les cellules (1×10^6) sont mises en suspension dans 30 μ l du milieu MEM sans sérum contenant 10 μ l d'anticorps anti-PKC et 20 μ l de solution hypertonique composée d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de sucrose selon les instructions du vendeur (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA). Le tout est ensuite incubé pendant 10 min à une température de 37 °C. Un volume de 1 ml d'une solution hypotonique (milieu cellulaire sans sérum et eau déionisée dans un rapport de 6 : 4) est ensuite ajouté. Le tout est transféré, dans un tube conique contenant 2 ml de la solution hypotonique, pour ensuite être incubé 2 min à 37 °C et centrifugé 2 min à 2000 g (Beckman GPR). Enfin, le surnageant est retiré et les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture MEM (voir Figure 2.1).

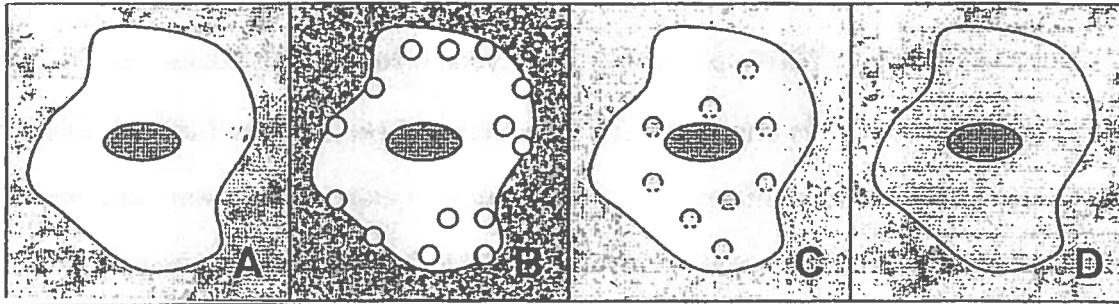


Figure 2.1 Représentation de la technique de la lyse osmotique des vésicules pinocytiques

(A) Les cellules sont cultivées dans du milieu (MEM). (B) Le milieu est remplacé par la solution hypertonique (contenant l'anticorps), ce qui favorise la formation de vésicules, qui transportent l'anticorps, (C) Ensuite, les cellules sont exposées à une solution hypotonique, ce qui fait éclater les vésicules dans la cellule. (D) Finalement, les cellules incorpore l'anticorps et peuvent être remises en culture.

2.7 Extraction des protéines et immunobuvardage

2.7.1 Extractions des connexines

Les cellules sont cultivées tel que décrit dans la section 2.1. À confluence, les cellules sont lavées avec du PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les connexines sont extraites par la technique de Brissette et al. (1991). Les cellules sont lysées par 0.375 ml de tampon de lyse hypotonique (0.1 M NaHCO_3 , pH 7.0) contenant différents inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1 mM de phénylméthylsulfonylfluorure, 1 mM d'orthovanadate de sodium, 10 mM de pyrophosphate de sodium et 1 mM de leupeptine). À l'aide d'une mini-spatule caoutchoutée les cellules sont ensuite transférées dans un tube eppendorf. Un volume de 0.375 ml de NaOH 40 mM fraîchement préparé est ajouté à chaque tube. L'ensemble est bien mélangé, incubé sur la glace pendant 30 min et centrifugé à 14 000 g pendant 30 min. Les culots cellulaires sont relavés avec le tampon NaHCO_3 telle que décrit auparavant puis recentrifugés pendant 30 min. La quantification des protéines est

effectuée selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant le réactif commercial de Bio-Rad selon les instructions du fournisseur (Bio-Rad, Mississauga, Ont. Canada).

2.7.2 Extraction des protéines

Les cellules sont traitées tel que décrit dans la section 2.1.4. Après 24 heures d'incubation dans un milieu complet, les cellules sont rincées avec du PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} . Le PBS est retiré, les cellules sont grattées dans 0.6 ml du tampon RIPA (1 % Nonidet P-40; 0.5 % sodium déoxycholate et 0.1 % SDS) contenant les inhibiteurs leupeptine 0.7 $\mu\text{g/ml}$, aprotinine 30 $\mu\text{g/ml}$ et phénylméthylsulfonylfluorure 20 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich Chemical Company). La suspension de cellules est ensuite incubée pendant 30 min sur la glace et centrifugée à 14 000 g pendant 20 min. Les surnageants des extraits cellulaires représentent l'extrait cellulaire total.

2.7.3 Immunoprécipitation

Les cellules traitées et non traitées sont lavées avec du PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} , puis lysées par 1 ml de tampon de lyse (50 mM Hepes, pH 7.5; 1 % Triton X-100; 50 mM NaCl, 1 mM de phénylméthylsulfonylfluorure, 1 mM d'orthovanadate de sodium, 10 mM de pyrophosphate de sodium et 1 mM de leupeptine) et incubées sur la glace pendant 10 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. La quantification des protéines est effectuée selon la méthode de Bradford, tel que décrit auparavant (section 2.7.1), et 1 ml d'extrait cellulaire est incubé en présence de 1 μg d'anticorps anti-connexine 43 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, USA) pendant 1 heure à 4 °C. Le complexe formé est récupéré par précipitation avec la protéine A-agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc.) et lavé 4 fois avec le tampon RIPA (1 % Nonidet P-40; 0.5 % sodium déoxycholate et 0.1 % SDS, 0.7 $\mu\text{g/ml}$, aprotinine 30 $\mu\text{g/ml}$ et phénylméthylsulfonylfluorure 20 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich Chemical Company).

2.7.4 Électrophorèse des protéines (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) selon la méthode de Laemmli (Laemmli et al. 1985). Un gel de séparation de 12.5 % est préparé avec un mélange d'acrylamide: bisacrylamide (30:1), (Bio-Rad) dans un tampon contenant 0.1 % (p/v) SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.03 % (v/v) TEMED et 0.07 % (p/v) persulfate d'ammonium. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons resuspendus dans du tampon de chargement (0.625 M Tris pH 6.8 contenant 2 % (p/v) SDS, 5 % (p/v) β -mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycérol et 0.02 % (p/v) de bleu de bromophénol) ont été chauffés à 100 °C pendant 1 min, puis chargés sur le gel de compaction (5 % de polyacrylamide dans 0.5 M Tris pH 6.8, 0.03 % (v/v) TEMED et 0.07 % (p/v) persulfate d'ammonium). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon contenant 0.025 M tris-HCl pH 8.3, 0.2 M glycine et 0.1 % (p/v) SDS pendant une période de 60 min à 100 mvolts.

2.7.5 Électrotransfert

L'électrophorèse terminé, les gels de polyacrylamides sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose en utilisant un appareil trans-blot (Trans-Blot transfer mini, Bio-Rad, Mississauga, Ont. Canada). Le transfert de protéine est effectué sous un voltage constant de 100 volts pendant 60 min dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20 % MeOH) de pH 8.2.

2.7.6 Immunodétection

La membrane de nitrocellulose est incubée à la température ambiante pendant 30 min à la température de la pièce dans une solution de 1 % d'albumine bovine dans du TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.05 % Tween-20). Cette solution de blocage est ensuite remplacée par la solution d'anticorps primaire dilué dans un tampon TBST et mise à incuber avec la membrane pendant 1 heure à la température de la pièce. Après 3

lavages de 5 min avec du TBST afin d'enlever toute trace d'excès d'anticorps primaire, la membrane est exposée à l'anticorps secondaire anti-IgG conjugué à la phosphatase alcaline, dilué 1:5000 dans du TBST, puis incubée à la température ambiante durant 1 heure avec agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 min avec le tampon TBST puis transférée dans une solution de substrat chromogène (2 mg nitro-tetrazolium blue et 4 mg de 5 bromo, 4 chloro, 3 indolylphosphate dans 20 ml de tampon de réaction (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.02 % sodium azide) pour la révélation. Après une incubation de 4 à 10 min à la température ambiante la réaction est arrêtée par immersion dans une solution d'acide acétique à 5 %. L'analyse densitométrique est réalisée avec le logiciel Image-Pro Plus 3.

2.8 Extraction de l'ARN et analyses par RT-PCR

2.8.1 Extraction de l'ARN

Les cellules d'IMR-32 sont cultivées dans des plaques de pétri et traitées comme décrit plus haut. Après la période de traitement appropriée, les cellules sont lavées avec du PBS, préparé avec de l'eau traitée avec du diéthylpyrocarbonate (DEPC) pour inactiver les ARNases et récoltées avec un policeman dans des tubes eppendorff de 1.5 ml dans des conditions dépourvus d'ARNases. L'ARN est extraite à l'aide du kit de Qiagen Rneasy pour l'isolation de l'ARN total des cellules eucaryotiques et des tissus selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Canada). Brièvement, 600 µl de tampon de lyse RTL est ajouté aux cellules et l'ensemble est homogénéisé par passage à travers une seringue de 21 jauge 10 fois sur la glace. Ensuite, 600 µl d'une solution d'éthanol 70 % est ajoutée à l'homogénat. Le tout est mélangé puis appliqué à une colonne RNeasy et centrifugé 15 secondes à 10 000 g. La même colonne est lavée avec 700 µl du tampon de lavage RW1 par une centrifugation de 15 secondes à 10 000 g. La colonne est placée dans un tube de collection de 2 ml et lavée deux fois avec 500 µl de tampon de lavage RPE. Finalement, la colonne est transférée dans un nouveau tube de collection de 1.5 ml et l'ARN est éluée avec 30 µl d'eau traitée au DEPC par une

centrifugation de 1 min à 10 000 g. L'ARN obtenu est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 et à 280 nm. Une unité de densité optique est considérée égale à 40 µg/ml d'ARN. Le rapport de 260/280 pour tous les échantillons d'ARN est supérieur ou égal à 1.9, indiquant la pureté de l'ARN obtenu.

2.8.2 Traitement de l'ARN total

Afin d'enlever toute trace d'ADN génomique qui peut contaminer l'ARN totale, 10 unités de Dnase I dans son tampon approprié (Boehringer Mannheim) sont ajoutée à chaque 5 µg d'ARN puis le tout est incubé à 37 °C pour 1 heure. Avant de procéder au RT-PCR, la DNase est inactivée par une incubation à 65 °C pour 15 min.

2.8.3 Analyses par RT-PCR

2.8.3.1 Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)

À partir de l'ARN obtenue, l'ADNc est synthétisé en utilisant les amorces random et la transcriptase inverse du kit d'Amersham Pharmacia Biotech selon les instructions du fournisseur (Amersham Pharmacia Biotech, Canada). Brièvement, 2 µg d'ARN total est placé dans un tube et ramené à un volume de 8 µl par addition d'eau traitée avec du DEPC. Ensuite, la solution d'ARN est incubée à 65 °C pendant 10 min et placée sur de la glace. Le mélange de réaction «Bulk first stranded c-DNA » qui contient déjà les oligonucléotides, la reverse transcriptase, le Mg^{2+} et le tampon sont ensuite homogénéisés et 5 µl est ajouté à la solution d'ARN ainsi que 1 µl de DTT et 1 µl des amorces Random pd (N)₆. L'ensemble est mélangé par pipettage et incubé à 37 °C pour 1 heure. La première chaîne d'ADNc est ainsi formée.

2.8.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La première chaîne d'ADNc obtenue est chauffée à 90 °C pendant 5 min pour dénaturer le brin duplex ARN-ADNc et inactiver la transcriptase inverse. Le tout est refroidi sur la glace. 15 µl d'ADNc sont ajoutés au mélange réactionnel qui contient une concentration finale de 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chacun des oligonucléotides dATP, dGTP, dCTP et dTTP, 0.5 mM de chacune des amorces du gène humain de la Cx43 (Amorce 5'GCGTGAGGAAAGTACCAAAC 3' et l'amorce 3'GGGCAACCTTGAGTCTTCC 5'), et 2.5 U de la Taq polymérase (Pharmacia), dans un volume finale de 20 µl. Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 30 sec dans un thermocycler de marque Perkin-Elmer-Cetus. L'amplification comporte 35 cycles séquentiels à 95 °C pendant 20 secondes, 58 °C pendant 40 secondes et 72 °C pendant 40 secondes, suivi d'une incubation pour 7 min à 72 °C. Les produits de PCR sont analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % sous un voltage de 100 V pendant 30 min en présence de Bromure d'Ethidium. Les gels sont photographiés par un film Kodak 1700. La taille attendue du fragment amplifié par les amorces utilisées est de 506 bp.

2.9 Analyse statistique

Les valeurs sont rapportées sous formes de moyenne $\pm$ écart type. L'analyse de variance à un critère de classification (ANOVA) suivi du test de Tukey ou bien le Test-t de Student ont été utilisés pour analysés les donnés. Une valeur $p < 0.05$ a été considérée comme significatif.

3. RÉSULTATS

3.1 L'expression des connexines et la fonction des JICGs dans les cellules IMR-32

Durant l'embryogenèse les neuroblastes du système nerveux périphérique d'où dérivent les neuroblastomes expriment la Cx43, la Cx26 et, après la naissance, la Cx32 (Rozental et al. 1998). Le patron cinétique de l'expression de ces connexines ainsi que leurs fonctions sont régulées selon le stade embryonnaire (Bruzzone et al. 1997).

Le but de ce travail étant d'étudier les JICGs dans la lignée de neuroblastome IMR-32, nous avons commencé par détecter la présence des connexines protéines qui forment les JICGs dans cette lignée cellulaire. L'expression de la connexine 43 a été démontrée dans les cellules de neuroblastome IMR-32. L'analyse par immunobuvardage de la Cx43 d'un extrait cellulaire d'IMR-32 en prolifération a montré que ces cellules expriment la Cx43 (Figure 3.1A, 3.1B). Dans la Figure 3.1B, nous avons utilisé un anticorps (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, USA) qui ne précipite qu'une seule forme de connexine dont la masse moléculaire correspond à la forme non phosphorylée (NP) (43 kDa) (Orsino et al. 1996; Kanemitsu et al. 1997). Dans la Figure 3.1A où un anticorps reconnaissant la forme non phosphorylée et les deux formes phosphorylées P1 et P2 est utilisé (Zymed Laboratories, San Francisco, Ca, USA) (Hosny et al 1998; Martin et al. 1998), on observe trois bandes, soit la forme non phosphorylée et les deux formes phosphorylées.

Puisque, cette phosphorylation suggère l'implication potentielle des protéines kinases dans la régulation des JICGs dans ces cellules et que les formes phosphorylées ont été souvent associées à une fermeture des JICGs nous avons, étudié la fonction des JICGs par la technique de chargement par grattage. Cette technique consiste à léser les cellules en culture par un ou deux traits de scalpel et de les incuber dans une solution contenant un colorant fluorescent de petit poids moléculaire (jaune de Lucifer) auquel les cellules ne sont pas perméables. Ainsi, seules les cellules lésées vont se charger en colorant. Le passage du colorant vers les cellules voisines ne peut se faire que par les jonctions intercellulaires de type gap. Le chargement par le fluorochrome jaune de Lucifer par incision des cellules IMR-32 en prolifération a montré que juste les cellules

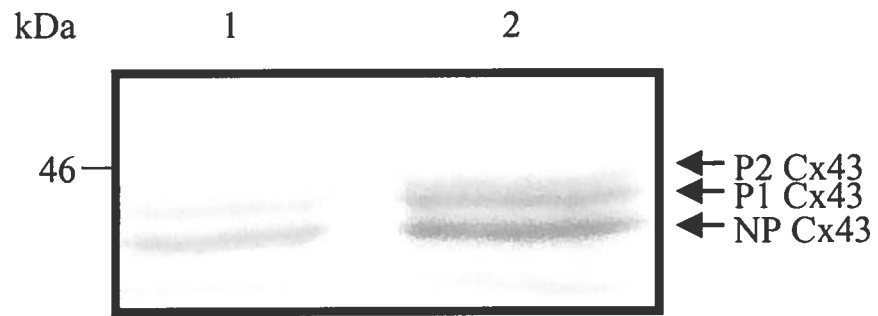
Figure 3.1 Profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Analyse par immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules de neuroblastome IMR-32, (B) immunoprécipitation de la Cx43 dans les extraits des cellules de neuroblastome IMR-32.

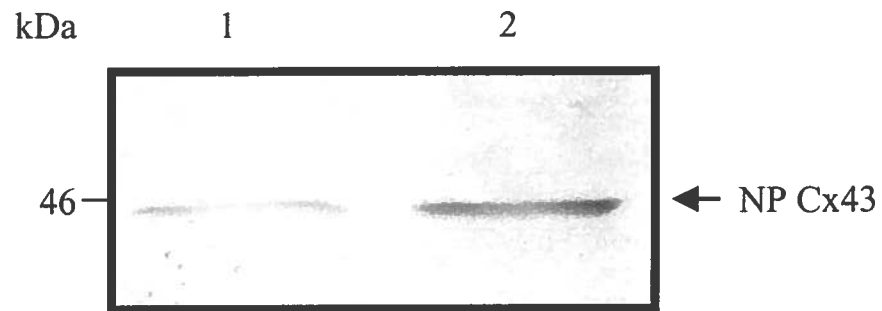
Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 (1) et dans les cellules gliales C6 transfectées par la Cx43 (contrôle positif) (2).

25 µg d'extraits protéiques d'IMR-32 et C6 sont soumis à une électrophorèse dénaturante, transférés sur une membrane de nitrocellulose, révélés par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 reconnaissant la forme non phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées P1 et P2 (A) (Zymed Lab., San Francisco, Ca, USA) ou juste la forme non phosphorylée (B) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, USA) et détectés par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7).

A



B



lésées deviennent fluorescentes sous le microscope et non les cellules avoisinantes (Figure 3.2). Ces résultats suggèrent que les JICGs ne sont pas fonctionnelles dans la lignée de neuroblastome IMR-32 malgré l'expression de la Cx43.

Le dysfonctionnement de la communication cellulaire peut être dû soit à un blocage au niveau de l'ouverture du canal lui-même soit à l'absence des protéines (connexines) formant les canaux au niveau membranaire.

En utilisant la technique d'immunofluorescence nous avons déterminé la localisation intracellulaire de la Cx43 dans les cellules d'IMR-32 en prolifération. La Figure 3.3 indique que la Cx43 est absente de la membrane plasmique et est présente dans le cytoplasme au niveau de la partie perinucléaire. Ceci suggère que les JICGs sont défectueux dans les cellules IMR-32 à cause d'une altération de la localisation intracellulaire de la Cx43.

3.2 L'induction de la différenciation dans les cellules IMR-32

Afin d'établir un modèle de différenciation des neuroblastomes, nous avons testé l'effet de plusieurs composés inducteur de différenciation sur la lignée de neuroblastome IMR-32. Plusieurs composés sont connus pour induire la différenciation dans les neuroblastomes *in vitro* et *in vivo*. Parmi ces composés, on retrouve particulièrement les rétinoïdes et les analogues de la cyclique AMP (Reynolds, 2000a; Malik et al. 2000; Hewson et al. 2000; Hovland et al. 2001). Nous avons testé les effets de ces composants seuls ou en combinaison sur la différenciation morphologique et moléculaire des cellules de neuroblastomes IMR-32 afin de déterminer les conditions de culture et de traitements optimaux pour induire la différenciation dans cette lignée. Sur le plan morphologique, un traitement avec le tRA à une concentration de 1 μ M pendant une semaine induit la formation de neurites (Figure 3.4B) par comparaison avec le contrôle non traité (Figure 3.4A). Ce traitement induit aussi une diminution de la prolifération cellulaire d'environ 70 $\pm$ 5.4% (Figure 3.5). Une formation plus importante de neurites a

Figure 3.2 Évaluation des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastome IMR-32 en prolifération

L'évaluation directe du degré d'échange intercellulaire est effectuée à l'aide d'un colorant le jaune de Lucifer. Les cultures cellulaires sont lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées dans une solution de 4 % paraformaldéhyde dans le PBS pendant 20 min, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié avec un film kodak ektachrome 400 en contraste de phase en (A) et en épifluorescence en (B) tel que décrit dans matériel et méthode (section 2.5). Barre: 25 μ m.

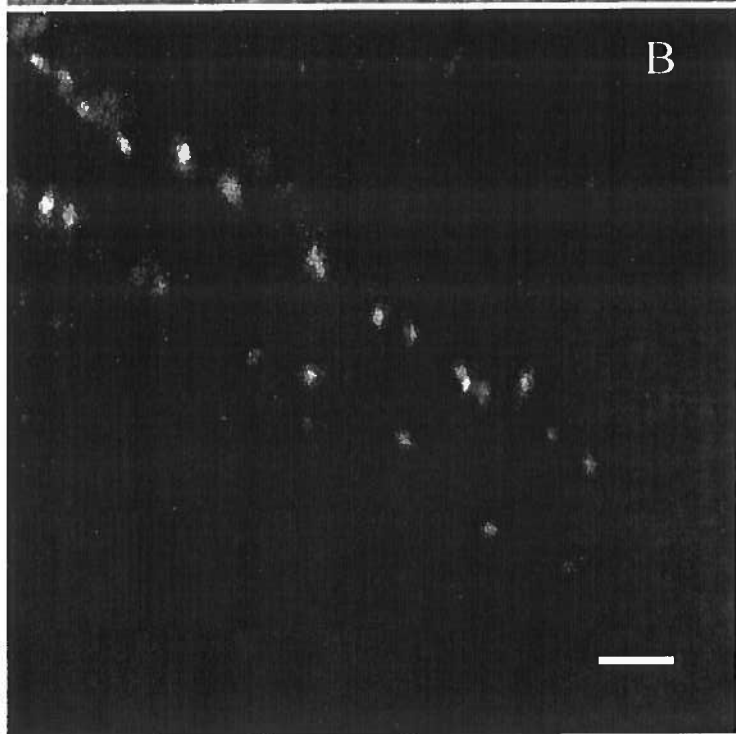
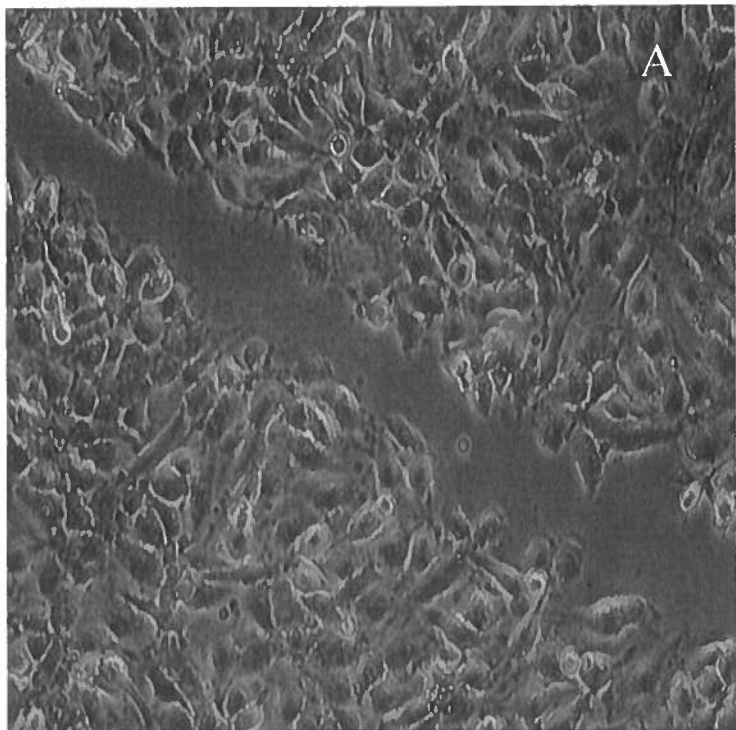


Figure 3.3 Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées avec un film kodak ektachrome 400 en contraste de phase en (A) et en épifluorescence en (B) tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Barre: $6 \mu\text{m}$.

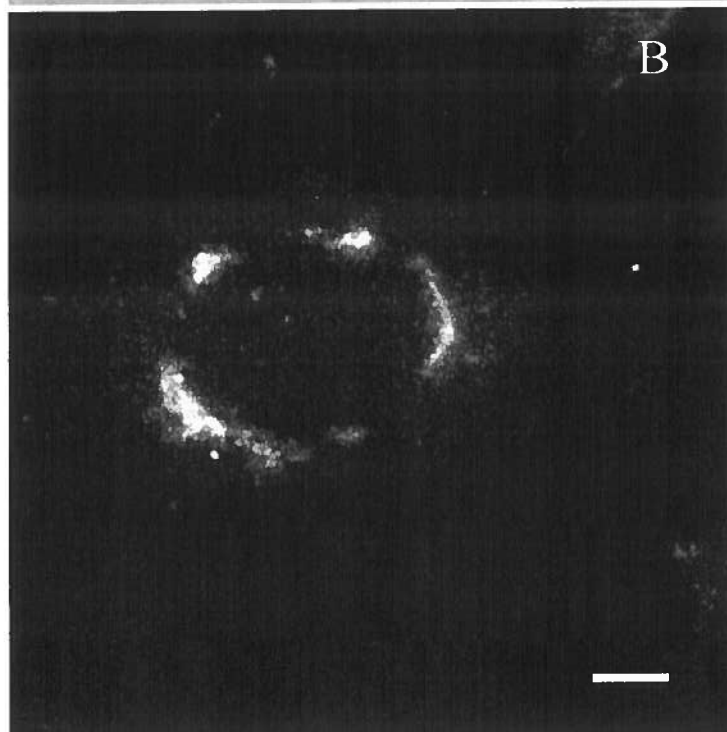
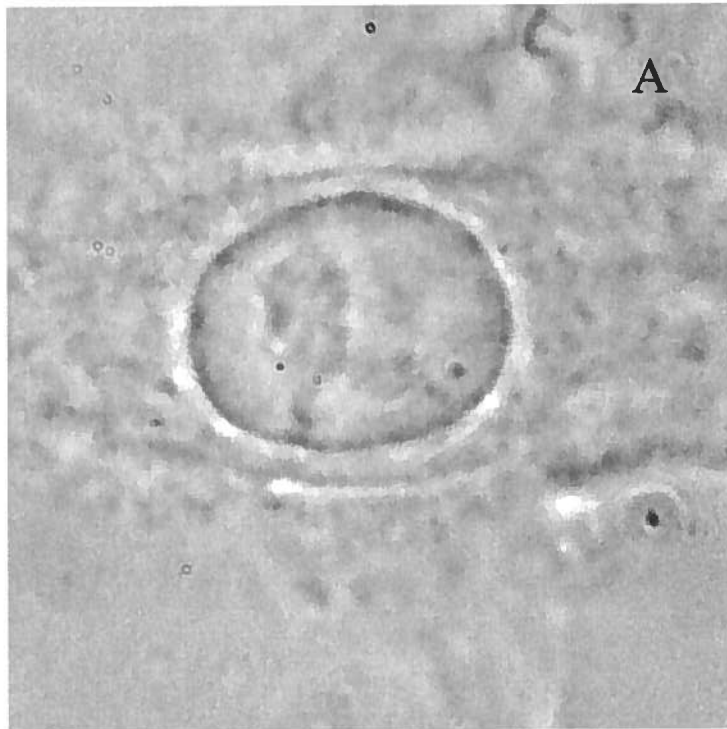


Figure 3.4 Effet des inducteurs de la différenciation sur la morphologie des cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules de neuroblastome IMR-32 non traitées en (A), traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (B), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (C) et la combinaison des deux (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.3). Les cellules sont observées et photographiées en microscopie à contraste de phase. Barre: 50 μ m.

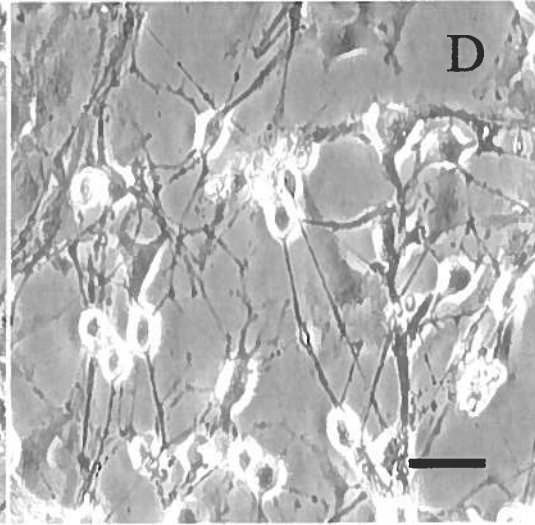
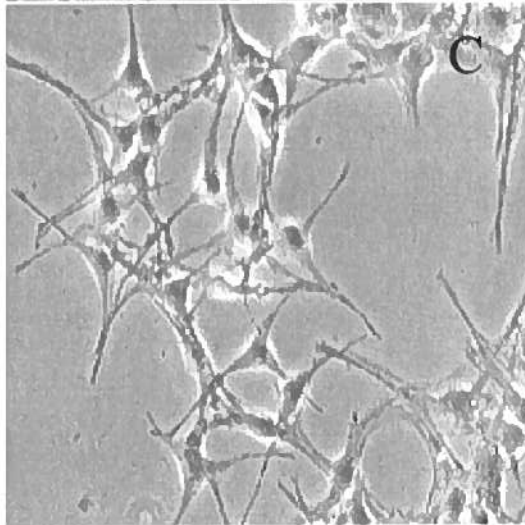
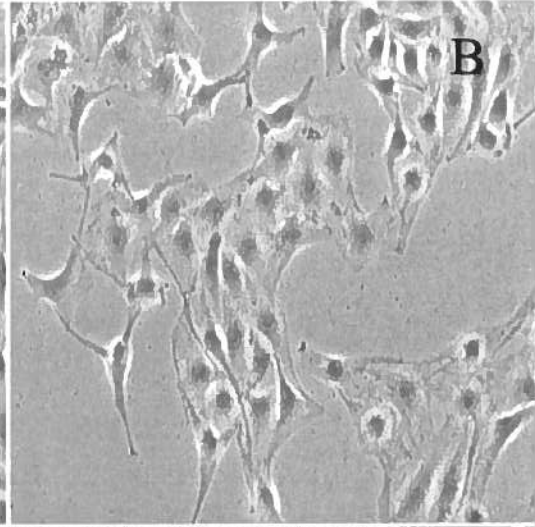
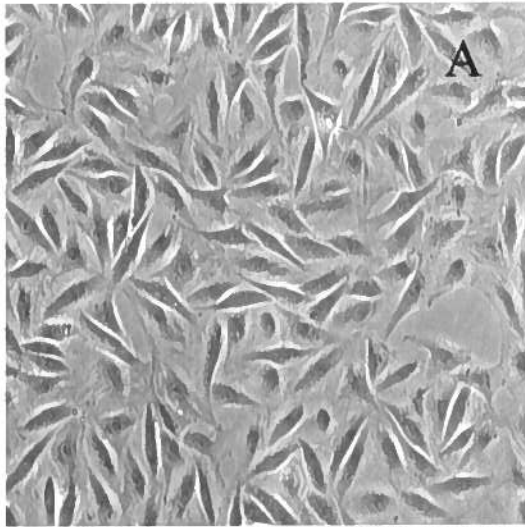
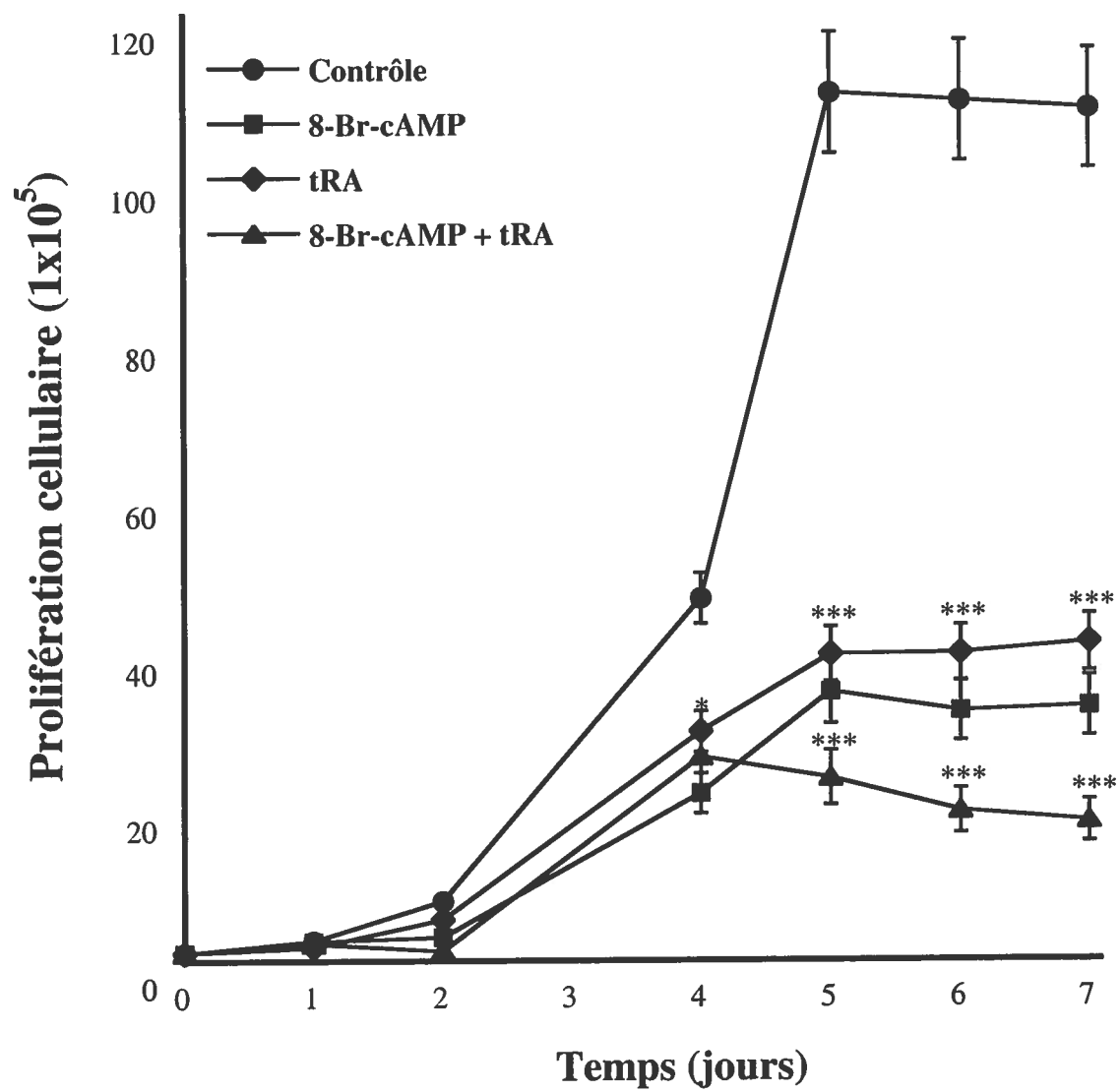


Figure 3.5 Effet des inducteurs de la différenciation sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

L'évaluation de la croissance des cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec: 1 μ M de tRA, 0.5 mM de 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux.

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm² dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hématocytomètre sous un microscope à contraste de phase tel que décrit dans matériels et méthodes (sections 2.1.2 et 2.1.3). Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, *** = $p < 0.0001$).



été observée lors du traitement par 0.5 mM de 8-Bromo-cyclique AMP (8-Br-cAMP), un analogue perméable du cAMP qui mime son action endogène (Figure 3.4C). L'exposition des cellules au 8-Br-cAMP induit une diminution de la prolifération comparable à celle induite par le tRA. La combinaison du 8-Br-cAMP et du tRA induit un effet additifs d'une part sur la différenciation morphologique (Figure 3.4D), d'autre part sur la diminution de la prolifération cellulaire (Figure 3.5). En effet, ce traitement combiné induit la formation de neurites plus longs et une morphologie qui est semblable à celle des neurones matures (Figure 3.4D). De plus, le traitement continu des cellules par le 8-Br-cAMP en combinaison avec le tRA pendant une plus longue période (25 jours), entraîne une augmentation de la différenciation morphologique et moléculaire tel que montré dans la section 3.4.

3.3 Caractérisation de la différenciation moléculaire dans les cellules d'IMR-32

Les cellules neuronales partagent entre elles plusieurs propriétés communes: i- une morphologie caractéristique: présence de neurites, axones et dendrites, dont la formation dépend de l'action des cônes de croissances et suppose des réorganisations cytosquelettiques sous-jacentes, ii- l'apparition de macromolécules spécifiques et iii- le retrait définitif et irréversible du cycle cellulaire (Reynolds, 2000a; Malik et al. 2000). Comme l'arrêt de la division cellulaire n'est pas obligatoire à l'établissement de la morphologie neuronale (Gomez et al. 1998), la caractérisation de la différenciation sur le plan moléculaire était nécessaire.

3.3.1 Expression des marqueurs neuronaux

Les cellules de neuroblastomes sont originaires des cellules souches de neuroblastes qui se différencient en neurones au cours du développement (Brodeur, 2000). Nous avons étudié l'expression de deux types de marqueurs neuronales dans les cellules IMR-32 en cours de la différenciation. Ceux du cytosquelette tels que les neurofilaments 200 (NF 200) et 68 (NF 68), des marqueurs caractéristiques des neurones du système nerveux périphérique, et ceux qui caractérisent la fonction neuronale tel que

l'énolase spécifique des neurones (NSE), la tyrosine hydroxylase (TH) et l'acétylcholinésterase (ACTH). La toxine tétanique a été aussi utilisée pour confirmer la nature neuronale de ces cellules.

L'expression des NF 200 et NF 68 dans les cellules différenciées et non différenciées a été détectée par immunobuvardage et par cytométrie de flux en utilisant des anticorps spécifiques contre ces deux protéines. La Figure 3.6 et la Figure 3.7 montrent que la différenciation morphologique induite par le 8-Br-cAMP et/ou le tRA est accompagnée par une augmentation de l'expression des marqueurs neuronaux NF 200 et NF 68. Le même effet additif entre le 8-Br-cAMP et le tRA a été observé dans l'expression des neurofilaments. L'expression des autres marqueurs de différenciation comme la NSE (Figures 3.8 et 3.9), la toxine tétanique (TT) (Figure 3.9), l'ACTH et la TH (Figure 3.10) montrent la même augmentation après 7 jours de traitement.

3.3.2 Expression des marqueurs cliniques

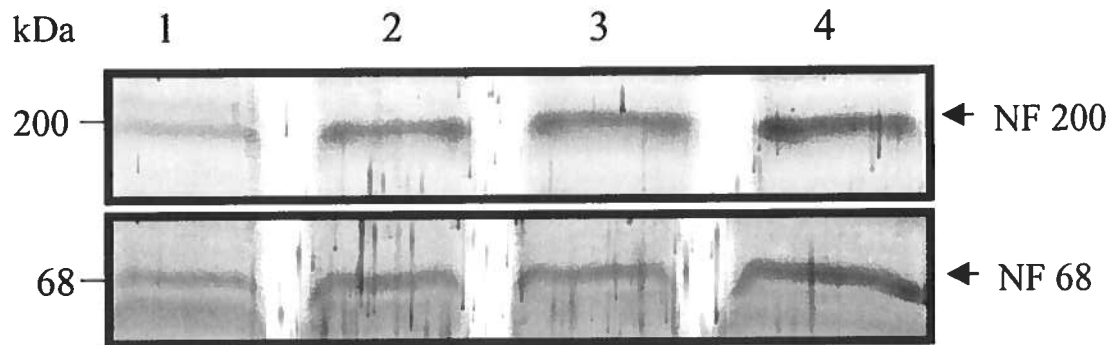
L'oncogène N-myc est amplifié dans les neuroblastomes en général. La lignée d'IMR-32 présente 25 copies de cet oncogène (Galderisi et al. 1999b; Galderisi et al. 1999c; Cole et al. 1999; Obaya et al. 1999;). L'expression de l'oncogène N-myc est utilisée dans les tests cliniques pour déterminer le stade de tumorigénicité de cette tumeur (Schwab et al. 1993; Ferrer et al. 2000). Dans nos expériences, l'expression de N-myc diminue de moitié dans les cellules d'IMR-32 traitées avec le 8-Br-cAMP en combinaison avec le tRA (Figure 3.11). Le traitement avec le tRA a un effet non significatif sur la régulation de l'expression de N-myc ($p > 0.05$; $n=3$). De plus, les cellules IMR-32 traitées par une combinaison du 8-Br-cAMP et de tRA pendant sept jours continuent d'exprimer le N-myc même si la prolifération de ces cellules devient très réduite. Cet effet sur l'expression de N-myc est accompagné par une diminution de la prolifération mesurée par l'expression du PCNA par la cytométrie de Flux (Figure 3.11). Le PCNA est une protéine du cycle cellulaire qui est utilisée en clinique pour déterminer le taux de prolifération dans les tumeurs.

Figure 3.6 Effet des inducteurs de différenciation sur le profil d'expression des neurofilaments 200 et 68 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage des NF 200 et 68 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec différents inducteurs de différenciation. (B) profils densitométriques correspondants. Détection de l'expression des NF 200 et 68 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (2), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (3) et la combinaison des deux (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux spécifiques anti-NF 200 et anti-NF 68 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont obtenus en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$).

A



B

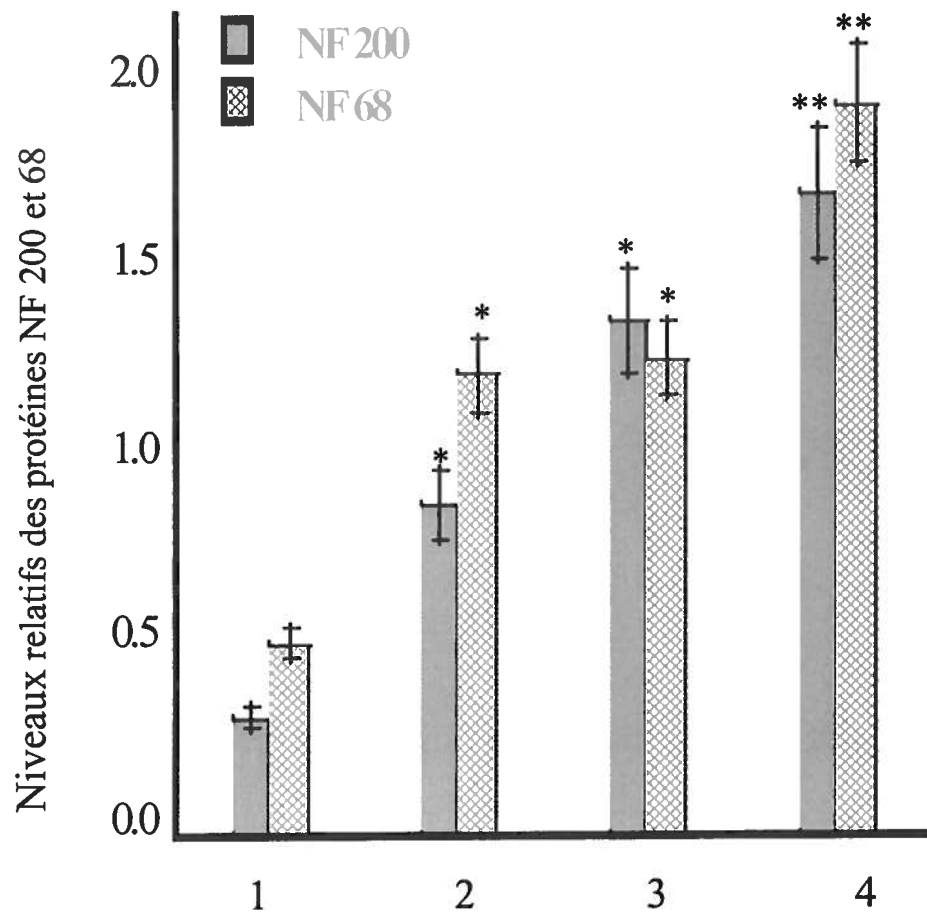


Figure 3.7 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression des neurofilaments 200 et 68 en réponse aux inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de $1 \text{ }\mu\text{M}$ tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules traitées et non traitées (contrôle) sont fixées dans une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur glace. Les cellules fixées sont lavées et incubées en présence des anticorps primaires anti-NF 200 et anti-NF 68. Après une incubation de 30 min, les cellules sont lavées deux fois et mises en présence d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2). Les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux (FACS). L'intensité moyenne de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'antigène présent dans chaque cellule. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

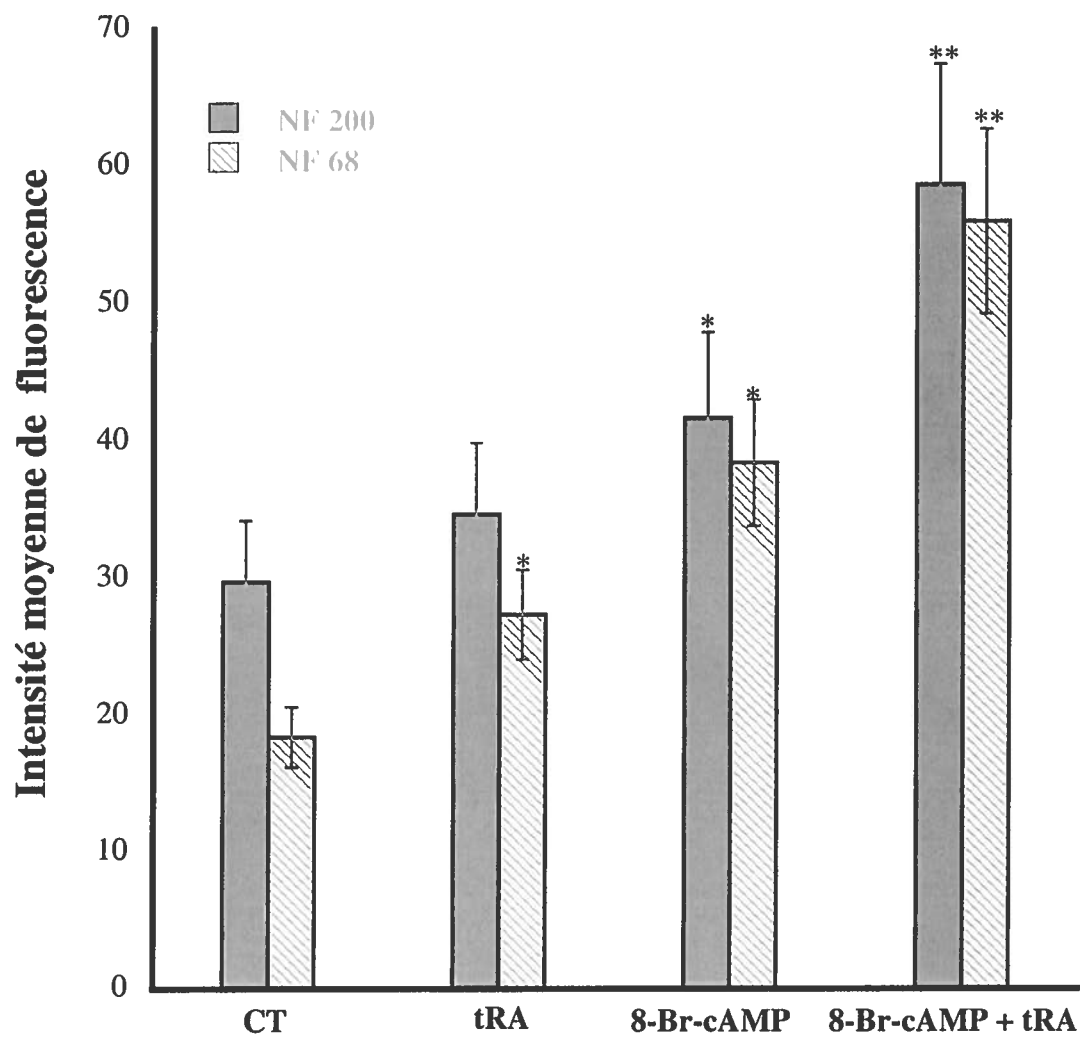
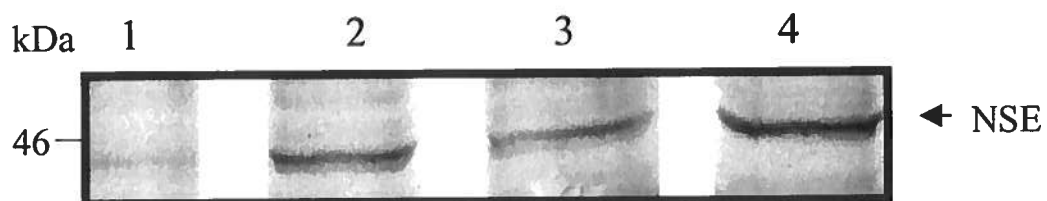


Figure 3.8 Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de l'énolase spécifique des neurones dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la NSE dans les extraits des cellules IMR-32 traitées avec différents inducteurs de différenciation. (B) profils densitométriques correspondants. Détection de l'expression de la NSE dans les cellules IMR-32 non traitées en (1) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA en (2), 0.5 mM de 8-Br-cAMP en (3) et la combinaison des deux en (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-NSE et détectées par un anticorps secondaire conjuguée à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$).

A



B

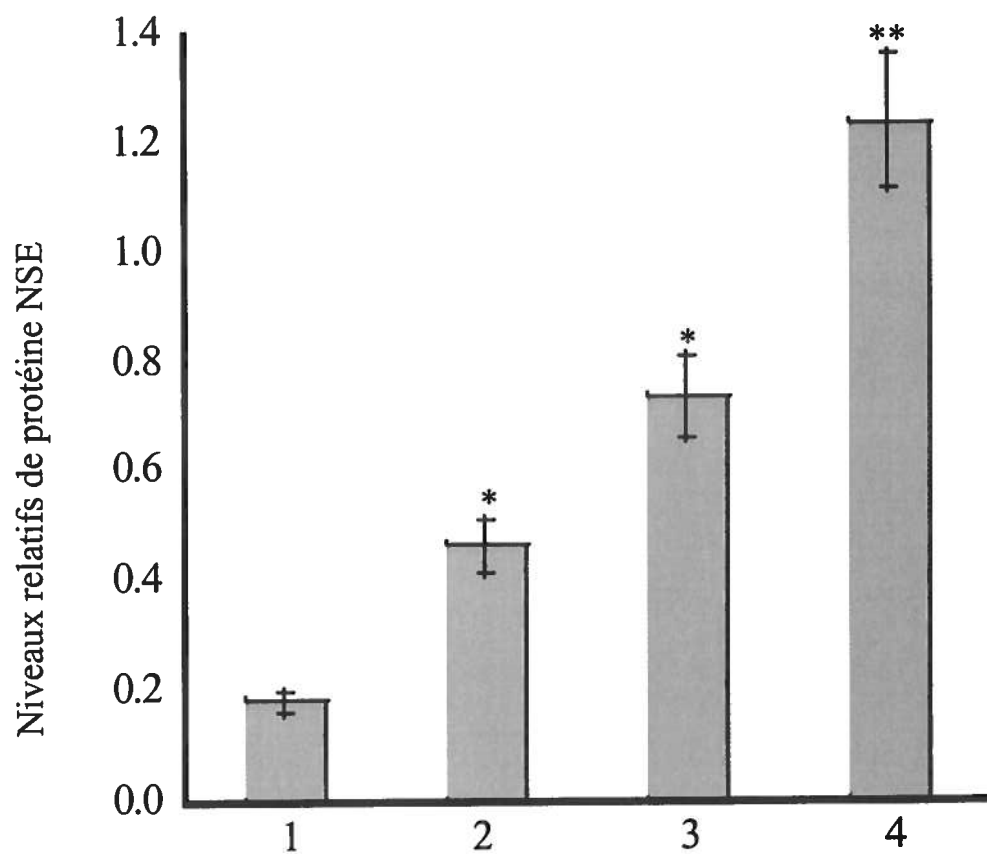


Figure 3.9 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'énolase spécifique des neurones et de la toxine tétanique en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de $1 \text{ }\mu\text{M}$ tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules traitées et non traitées (contrôle) sont fixées dans une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur la glace. Les cellules fixées sont lavées avec du PBS et incubées en présence d'anticorps primaires anti-énolase spécifique des neurones ou anti-toxine tétanique. Après une incubation de 30 min, les cellules sont lavées deux fois et mises en présence d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine (FITC) tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2). Les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux en utilisant les filtres appropriés. L'intensité moyenne de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'antigène présent dans chaque cellule. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

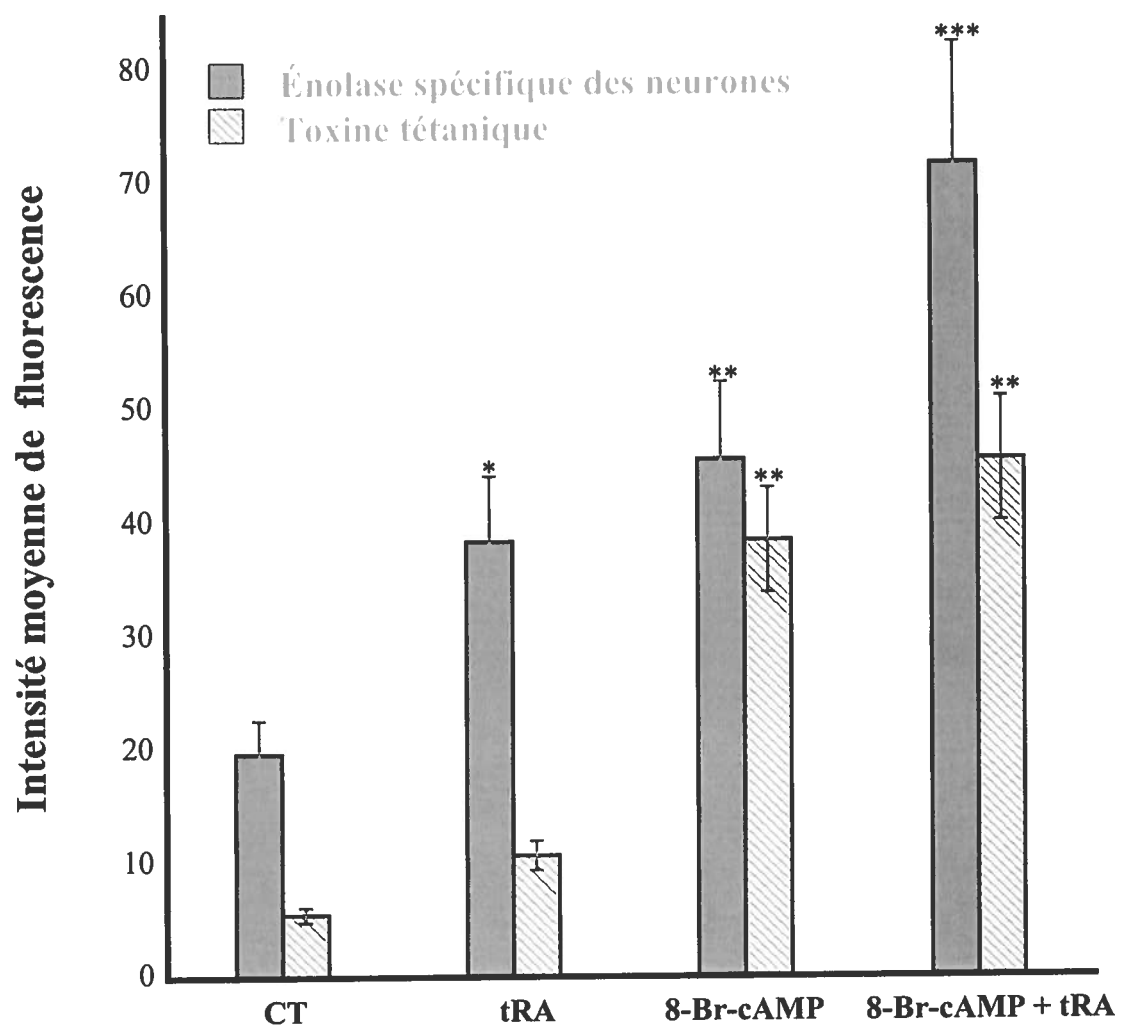


Figure 3.10 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'acétylcholinestérase et de la tyrosine hydroxylase en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de $1 \text{ }\mu\text{M}$ tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules traitées et non traitées (contrôle) sont fixées dans une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur la glace. Les cellules fixées sont lavées puis incubées en présence des anticorps primaires anti-acétylcholinestérase ou anti-tyrosine hydroxylase. Après une incubation de 30 min à 4°C , les cellules sont lavées deux fois et mises en présence d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2). Les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux. L'intensité moyenne de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'antigène présent dans chaque cellule. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle ($p < 0.0001$; $n = 3$).

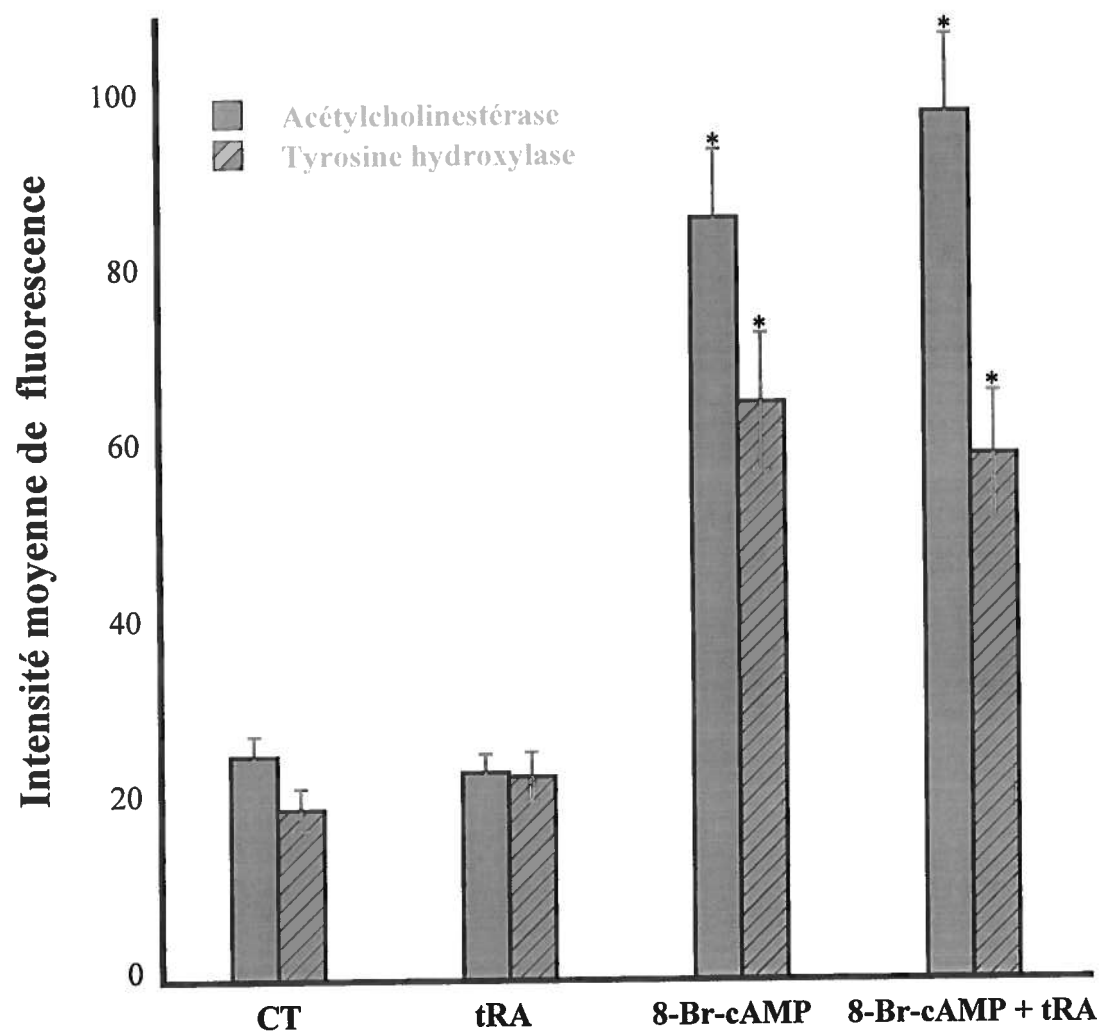
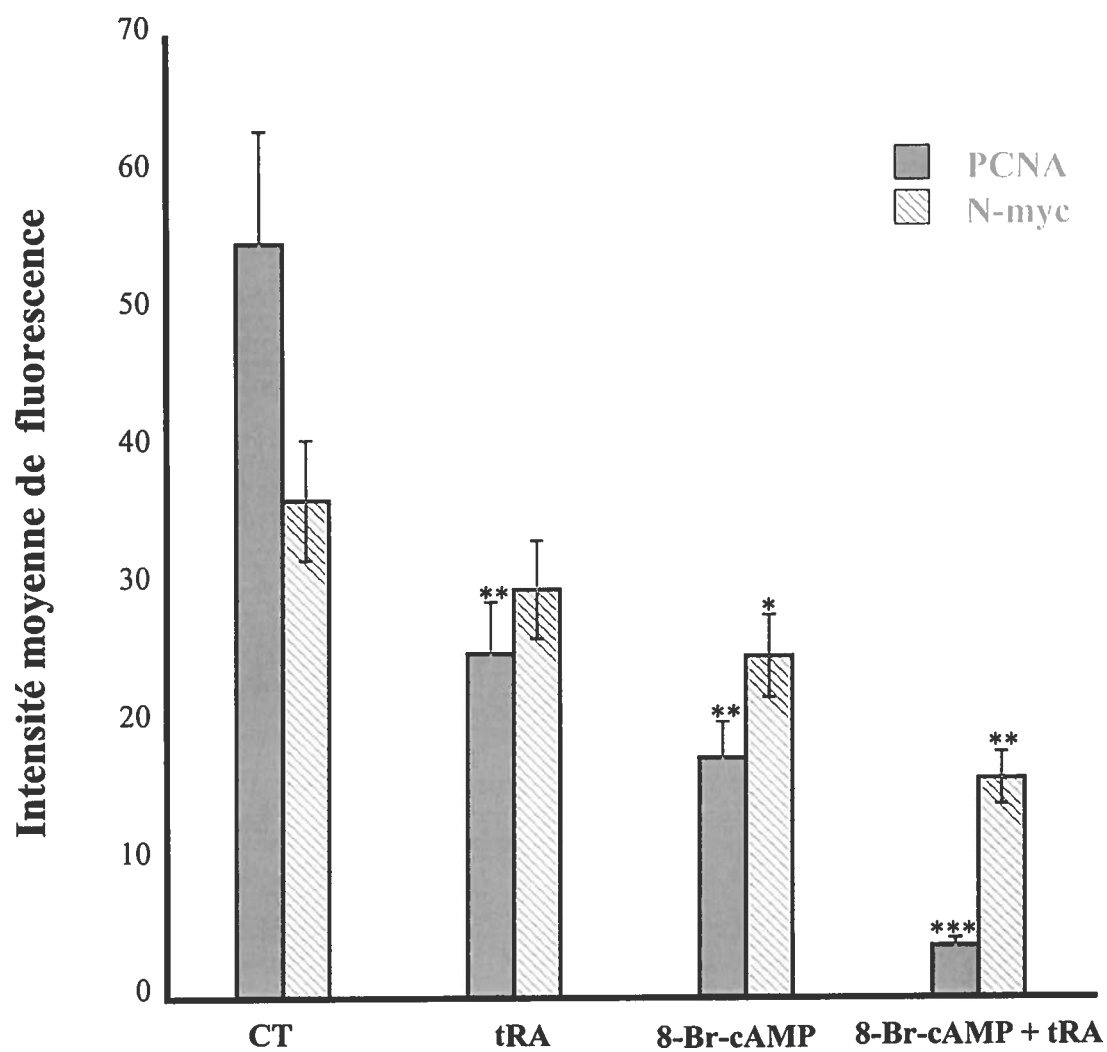


Figure 3.11 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de la PCNA et de N-myc en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de $1 \text{ } \mu\text{M}$ tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules traitées et non traitées (contrôle) sont fixées dans une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur la glace. Les cellules fixées sont lavées et incubées en présence des anticorps primaires anti-PCNA ou anti-N-Myc. Après une incubation de 30 min à $4 \text{ } ^\circ\text{C}$, les cellules sont lavées deux fois et mises en présence d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2). Les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux. L'intensité moyenne de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'antigène présent dans chaque cellule. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).



Un autre marqueur utilisé dans les tests cliniques est le TrkA. Ce dernier est le récepteur de haute affinité du facteur de croissance neural (NGF). Le traitement avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA induit une augmentation de l'expression de TrkA (Figure 3.12). Comme pour le TrkA, le profil d'expression de H-ras, un autre marqueur de bon pronostic chez les neuroblastomes, montre aussi une augmentation de cette protéine dans les cellules de neuroblastome traitées avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA (Fig. 3.12).

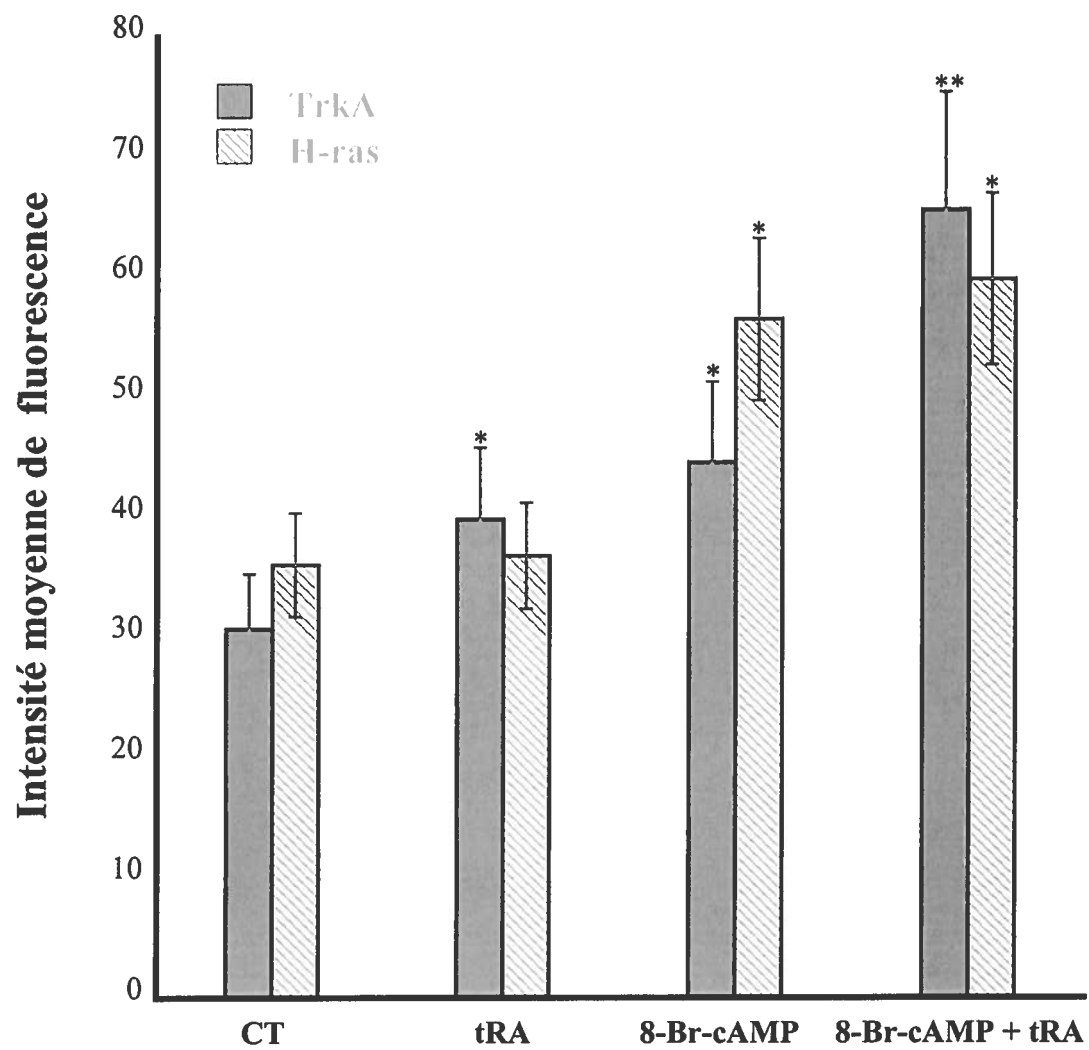
3.3.3 Induction de la différenciation et expression de la p53 dans la lignée de neuroblastome IMR-32

L'activité de la protéine p53 est régulée très étroitement par le produit du proto-oncogène cellulaire mdm2, une phosphoprotéine nucléaire qui se lie à la p53 et inhibe plusieurs de ses activités biochimiques et biologiques (Corvi et al. 1997). La protéine Mdm2 est surexprimée dans plusieurs lignées de neuroblastome et elle est associée à une augmentation de leur pouvoir tumorigène (Corvi et al. 1997). Contrairement aux autres types de cancers, les neuroblastomes expriment la p53 sous forme sauvage (non-mutée) (Moll et al. 1995). Par contre, cette protéine est retrouvée séquestrée dans le cytoplasme et donc absente du noyau où elle exécute normalement son rôle de régulateur du cycle cellulaire (pour revue voir Tweddle et al. 2001). L'absence de p53 du noyau est caractéristique des neuroblastomes et a été souvent liée à leur prolifération excessive (Goldman et al. 1996).

L'effet du traitement par le 8-Br-cAMP et le tRA sur la localisation de la p53 est étudié dans les conditions de culture induisant la différenciation, afin de déterminer le rôle possible de la p53 dans la réduction de la prolifération résultant de la progression de la différenciation des cellules IMR-32. Après seulement 24 heures de traitement, on observe un transfert de la p53 vers le noyau dans un faible pourcentage de cellules. Ceci a été démontré par immunolocalisation en utilisant un anticorps contre la p53 lié au fluorochrome de rhodamine (rouge). Le noyau a été coloré par un chromophore

Figure 3.12 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression du TrkA et du H-ras en réponse à certains inducteurs de différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de $1 \text{ }\mu\text{M}$ tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules traitées et non traitées (contrôle) sont fixées dans une solution de méthanol/acide acétique 95 % / 5 % pendant 5 min sur glace. Les cellules fixées sont lavées et incubées en présence des anticorps primaires anti-TrkA ou anti-H-ras. Après une incubation de 30 min, les cellules sont lavées deux fois et mises en présence d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine (FITC) tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2). Les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux. L'intensité moyenne de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'antigène présent dans chaque cellule. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).



spécifique du noyau le Topo1 qui fluoresce en vert alors que la rhodamine fluoresce en rouge (Figure 3.13).

La microscopie confocale a permis de détecter la localisation cellulaire de la p53 et d'identifier le noyau qui est coloré au Topo1 (Figure 3.13) un fluorochrome qui se lie à l'ADN. La Figure 3.13A met en évidence la séquestration de la p53 dans le cytoplasme et son absence du noyau puisque le cytoplasme est coloré en rouge et le noyau en vert. Le traitement des cellules de neuroblastome IMR-32 avec le 8-Br-cAMP pendant 24 heures provoque le transfert de la p53 vers le noyau tel que démontré par la coloration jaune du noyau Figure 3.13B qui représente le mélange de la couleur verte du Topo 1 et celle de la p53 lié à la rhodamine.

En immunofluorescence, après un traitement de 7 jours, nous avons observé que la p53 continue d'être transférée du cytoplasme vers le noyau sans toutefois qu'elle ne soit complètement absente du cytoplasme (Figure 3.14). Le 8-Br-cAMP permet donc le rétablissement de la localisation de la p53, normalement séquestrée dans le cytoplasme dans les cellules de neuroblastome IMR-32. Ce transfert est progressif et semble être parallèle à la diminution de la prolifération observée lors d'un traitement de 24 heures en présence de 8-Br-cAMP. Le 8-Br-cAMP semble donc induire une diminution de la croissance cellulaire en rétablissant probablement la localisation de la p53.

La réduction du taux de prolifération peut aussi contribuer au progrès de la différenciation cellulaire observé lors du traitement avec le 8-Br-cAMP. En effet, la p53 est normalement retrouvée en très faible quantité dans les cellules normales (Konikova et al. 2001; Downing et al. 2001) où elle a une demi-vie très courte (McKenzie et al. 1999). Par contre, d'après nos résultats, la p53 de type sauvage est présente en grande quantité dans les cellules de neuroblastomes au stade prolifératif indiquant probablement que le mécanisme de dégradation de cette protéine est dérégulé dans ce type de cellules. Dans nos expériences, l'analyse par immunobuvardage de la protéine p53 dans les cellules IMR-32 montre une grande accumulation de cette dernière dans les cellules en prolifération

Figure 3.13 Mise en évidence par microscopie confocale de l'effet du 8-Br-cAMP sur la sous-localisation cellulaire de la protéine p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie confocale de la sous-localisation cellulaire de la p53 dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 24 heures avec 0.5 mM de 8-Br-cAMP (B).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont incubées dans un milieu culture additionné de 0.5 mM 8-Br-cAMP. 24 heures après, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-p53 suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluochrome Alexa en présence du fluorochrome spécifique du noyau Topo1 pendant 30 min. Ensuite, les cellules sont lavées, montées et examinées à l'aide d'un microscope confocale. Barre: 12 μm .

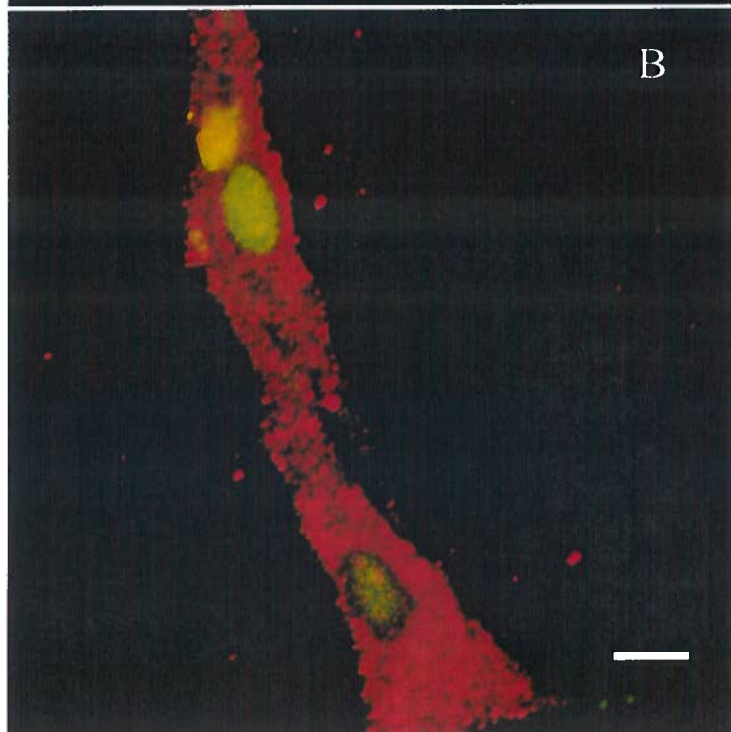
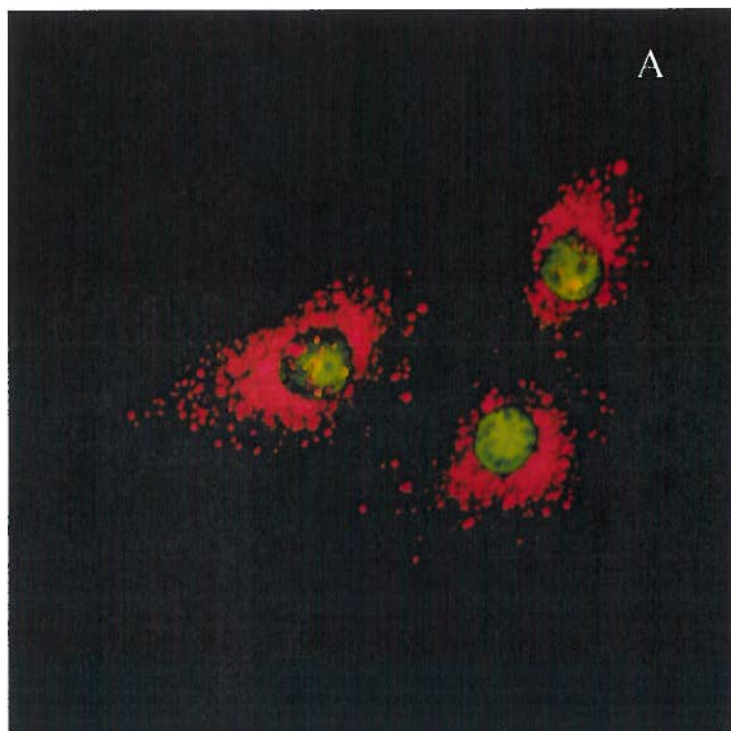
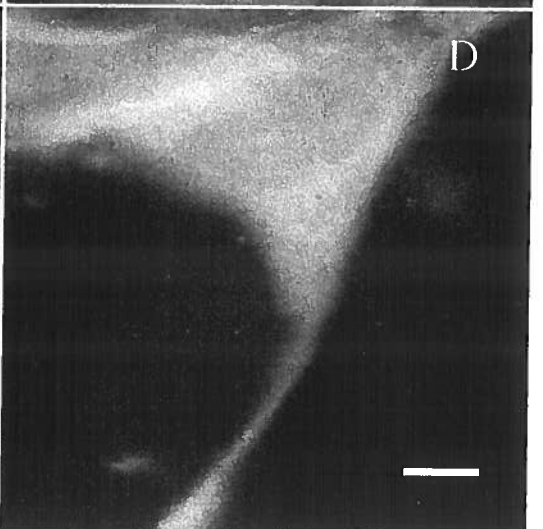
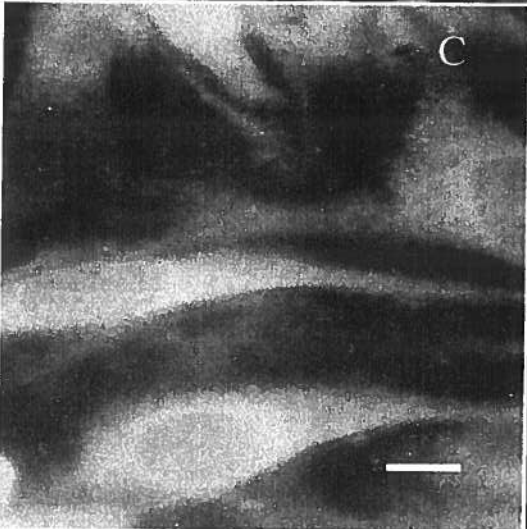
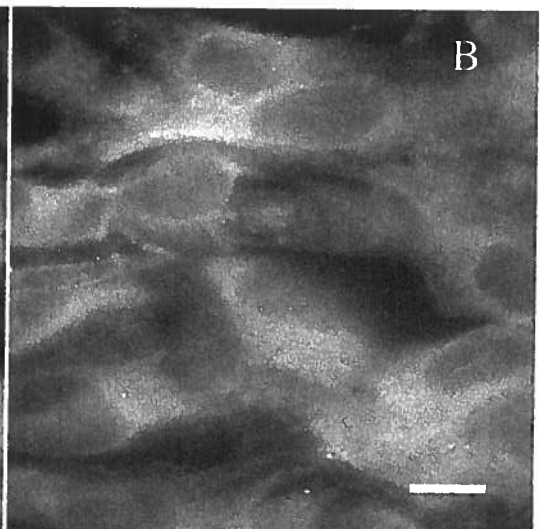
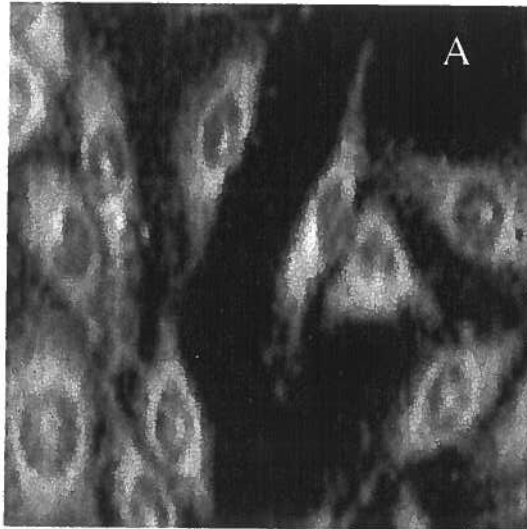


Figure 3.14 Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation sur la sous-localisation cellulaire de la p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie à épi-fluorescence de la sous-localisation de la p53 dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant une semaine par 1 μM de tRA (B), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (C) et de la combinaison des deux (D). Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μM de tRA, 0.5 mM de 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont lavées et incubées avec un anticorps primaire anti-p53 suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées en épi-fluorescence avec un film kodak ektatachrome 400. Barres: 12 μm (A, B); 8 μm (C), 6 μm (D).



(contrôle), alors que les cellules IMR-32 différenciées avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA montrent un niveau plus bas de p53 (Figure 3.15).

Parallèlement aux travaux ci-dessus, nous avons démontré également de façon qualitative une accumulation de la protéine Mdm2 par immunofluorescence, dans les cellules IMR-32 non différenciées (Figure 3.16A) comparativement à celles traitées avec le 8-Br-cAMP ou le tRA individuellement (Fig. 3.16B, C) où à celles traitées par la combinaison du 8-Br-cAMP et du tRA (Figure 3.16D).

Cette étude nous a permis d'établir un modèle de différenciation neuronale basé sur l'utilisation de la lignée de neuroblastome IMR-32 que nous avons utilisé subséquentement pour étudier la contribution potentielle des communications intercellulaires de type gap dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation.

3.4. Différenciation à court terme et jonctions communicantes de type gap dans la lignée de neuroblastome IMR-32

Les JICGs sont régulées durant la différenciation cellulaire du système nerveux périphérique (Trosko et al. 2000a; 2000b), le mécanisme moléculaire de cette régulation reste inconnu. Nous avons montré que les JICGs sont non fonctionnels dans la lignée de neuroblastomes IMR-32 malgré l'expression de la Cx43 sous ses formes phosphorylées et non phosphorylées (Figure 3.1 et 3.2). L'établissement d'un modèle de différenciation cellulaire de neuroblastome, nous a permis d'étudier les JICGs au cours de la différenciation. Nous avons trouvé que l'incubation avec le 8-Br-cAMP induit une régulation positive de l'expression de la Cx43 tel que démontré par immunobuvardage (Figure 3.17). Le traitement combiné de 8-Br-cAMP et de tRA augmente davantage l'expression de la Cx43 non phosphorylée et de la forme phosphorylée P1 (Figure 3.17). Cette augmentation de l'expression de la Cx43 est due à une augmentation de la transcription puisque nous avons observé de façon qualitative une élévation apparente de l'ARN messager correspondant (Figure 3.18).

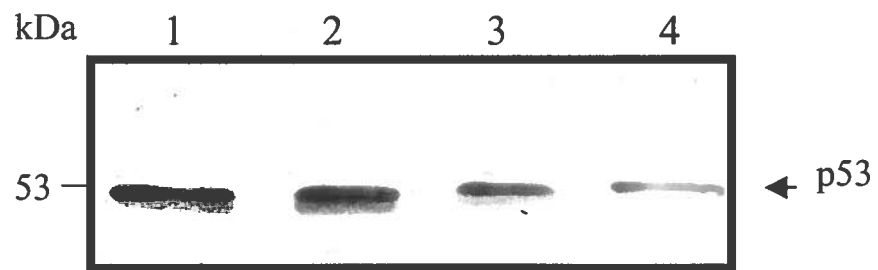
Figure 3.15 Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de la protéine p53 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la p53 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec différents inducteurs de différenciation. (B) profils densitométriques correspondants.

Détection de l'expression de la p53 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant une semaine par 1 μ M de tRA (2), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (3) ou de la combinaison des deux (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M de tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-p53 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

A



B

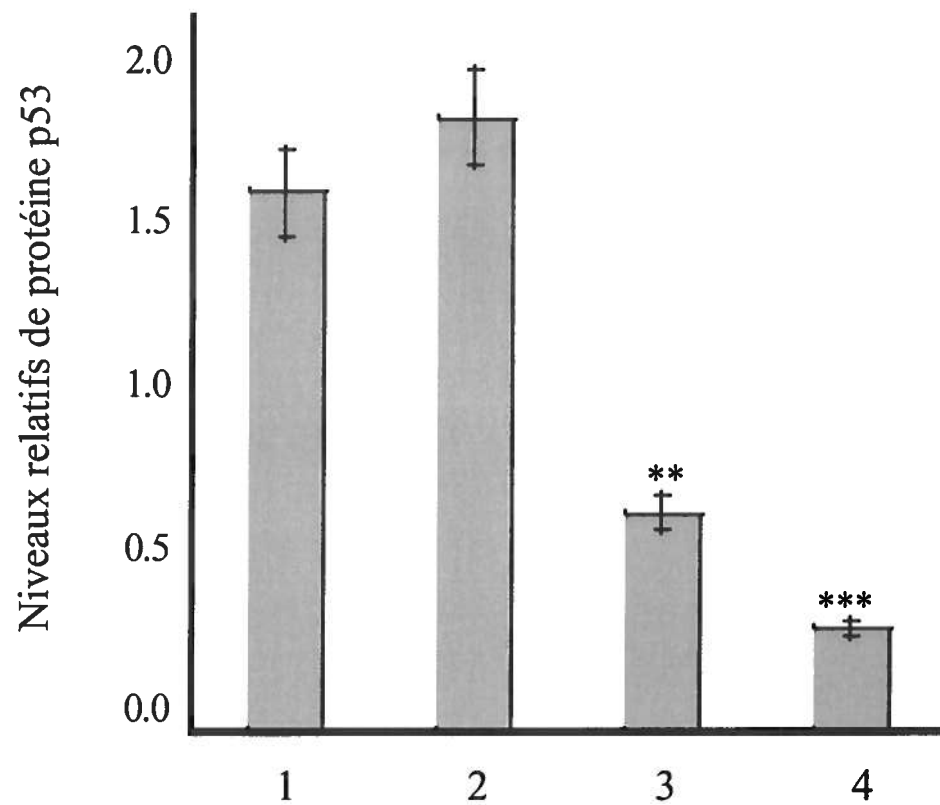


Figure 3.16 Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation sur la sous-localisation cellulaire du Mdm2 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie à épi-fluorescence de la sous-localisation de la protéine Mdm2 dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant une semaine par 1 μ M de tRA (B), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (C) ou la combinaison des deux (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm² dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M de tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Mdm2 suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées en épi-fluorescence avec un film kodak ektatachrome 400. Barres: 12 μ m (A, B, C); 8 μ m (D).

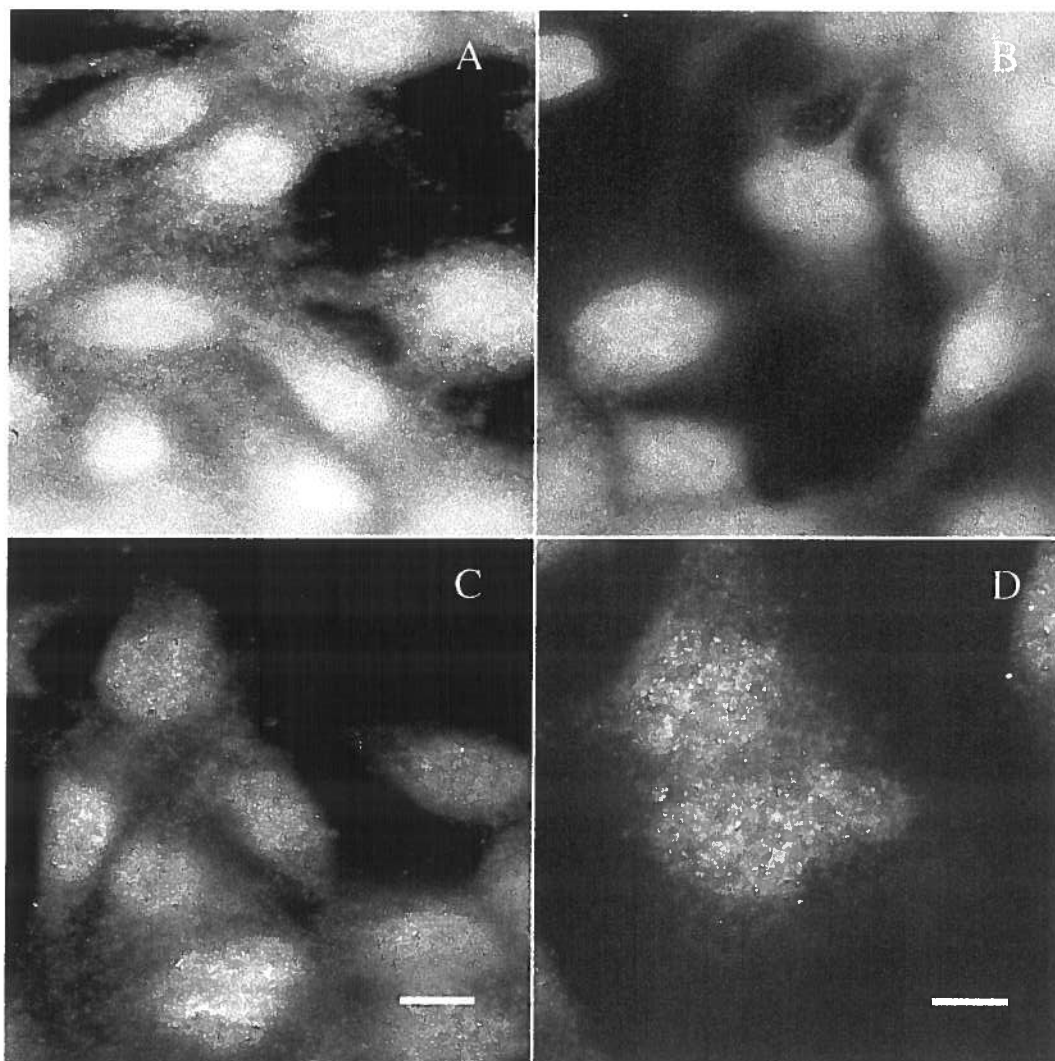


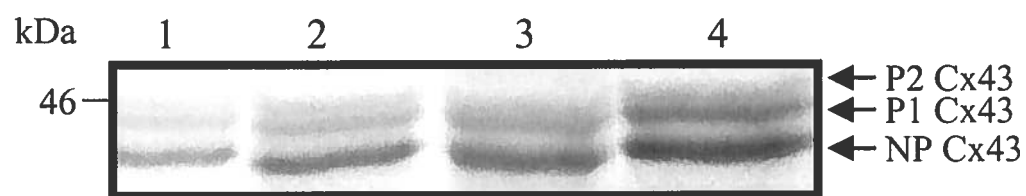
Figure 3.17 Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec différents inducteurs de différenciation. (B) profils densitométriques correspondants.

Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (2), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (3) ou la combinaison des deux (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M de tRA, 0.5 mM de 8-Br-cAMP ou la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 et détectées par un anticorps secondaire conjuguée à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

A



B

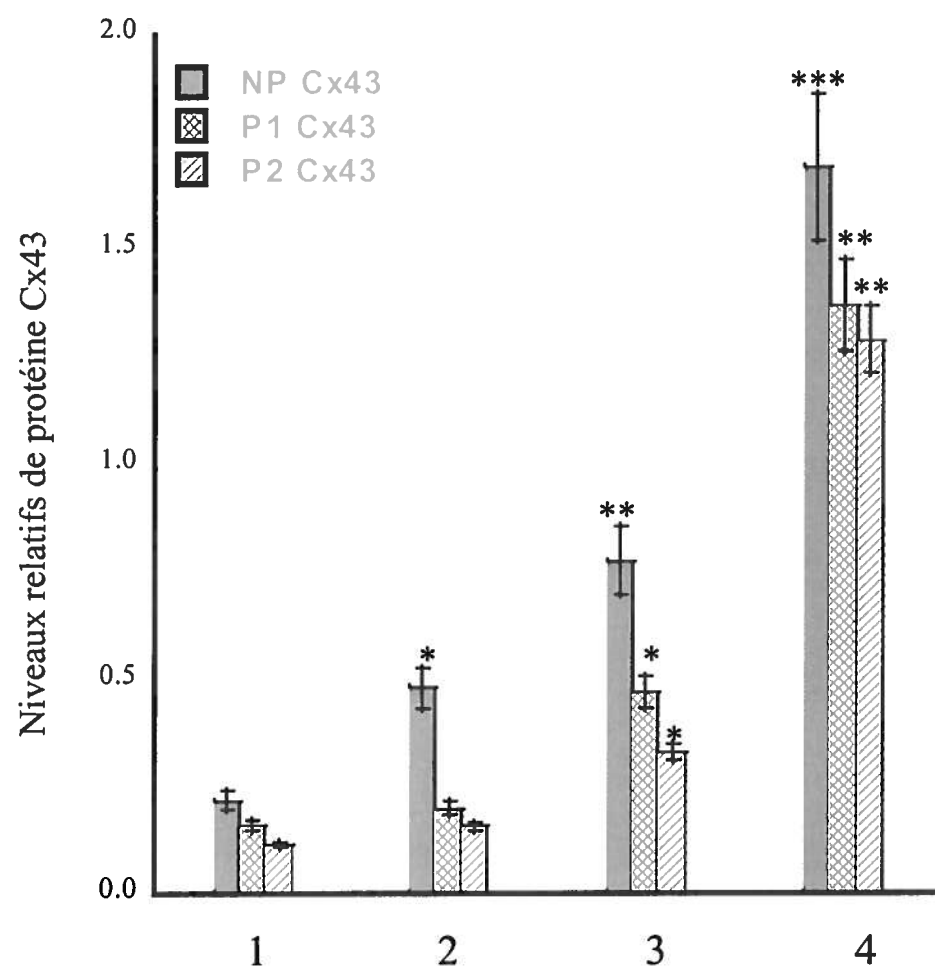
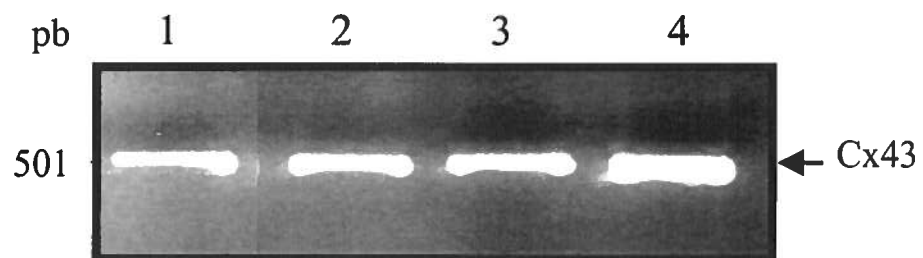


Figure 3.18 Effet des inducteurs de la différenciation sur le profil de transcription de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

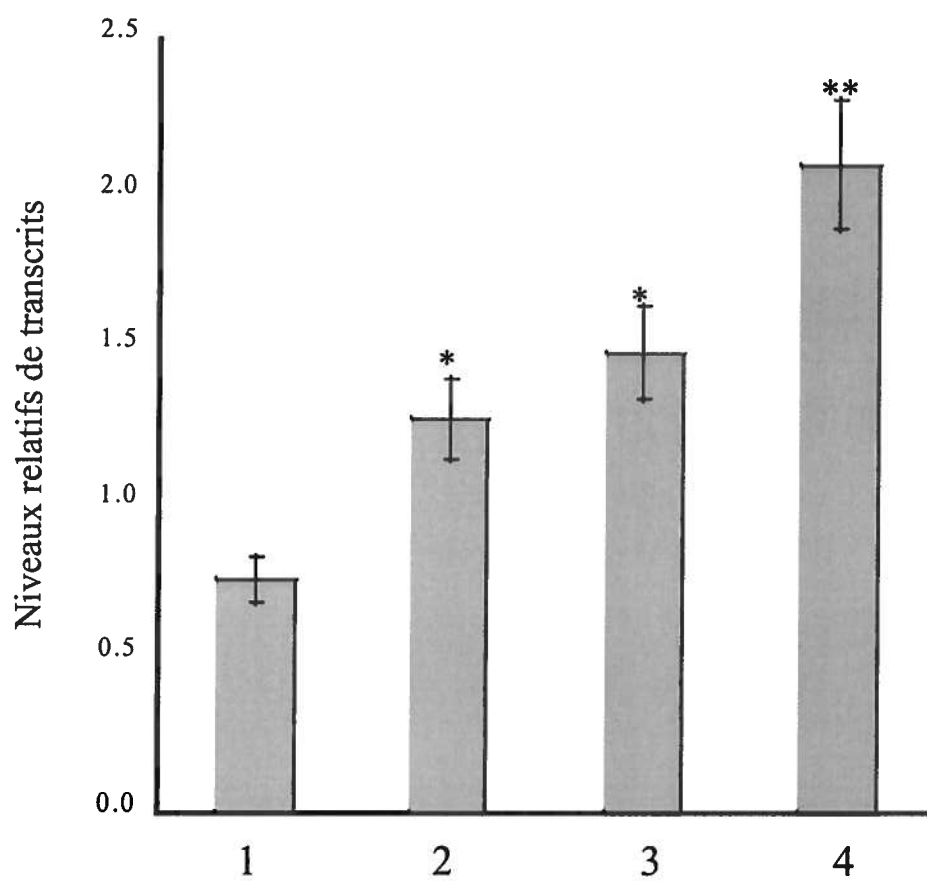
(A) Analyses de la transcription de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec différents inducteurs de différenciation. (B) profils densitométriques correspondants. Détection de la transcription de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (2), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (3) ou la combinaison des deux (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, 0.5 mM de 8-Br-cAMP ou la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Ensuite, l'ARN total est extrait des cellules différenciées et non différenciées en utilisant le kit de Qiagen. L'ARN total est utilisé pour préparer l'ADNc en utilisant le kit de Pharmacia. Le gène de la Cx43 et celui de l'actine sont ensuite amplifiés par une réaction de PCR en utilisant les amorces déduites du gène humain de la Cx43 selon les conditions expérimentales décrites dans matériels et méthodes (section 2.8). Un même volume du produit de PCR est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % en présence de bromure d'éthidium sous un voltage de 100 V pendant 30 min. Ensuite le gel est visualisé sous UV et photographié en utilisant un film Polaroid Kodak 1700. Les profils densitométriques sont mesurés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$).

A



B



Tel que décrit auparavant (section 3.1) la méthode de chargement par grattage a permis d'évaluer l'effet de la différenciation sur les communications intercellulaires. L'induction de la différenciation induit aussi une augmentation de la perméabilité des canaux jonctionnels (Figure 3.19). L'effet additif du traitement combiné de 8-Br-cAMP et de tRA sur l'induction de la différenciation est observé aussi au niveau de la perméabilité des canaux jonctionnels puisqu'on observe une amplification des communications intercellulaires dans les cellules traitées avec le cAMP/tRA (Figure 3.19D).

Nous avons démontré auparavant (section 3.1) que les cellules d'IMR-32 sont déficientes en communication via les jonctions communicantes de type gap et que cette altération est due à une localisation aberrante de la Cx43 au niveau du cytoplasme et à son absence de la membrane cellulaire. L'induction de la différenciation par un traitement avec le 8-Br-cAMP ou encore la combinaison du 8-Br-cAMP et de tRA, induit une augmentation de la perméabilité des jonctions communicantes et une augmentation de l'expression de la Cx43. D'après la Figure 3.20, cette augmentation de la perméabilité jonctionnelle est due à une re-localisation de la Cx43 au niveau membranaire après traitement avec le 8-Br-cAMP (Figure 3.20E, F, G, H). Le tRA n'a pas d'effet direct sur la re-localisation de la Cx43 au niveau membranaire (Figures 3.20C, D) mais induit une augmentation de la transcription du gène de la Cx43 (Figure 3.18).

3.5. Différenciation prolongée et jonctions communicantes de type gap dans la lignée de neuroblastome IMR-32

Le patron d'expression des connexines ainsi que le niveau de perméabilité des JICGs change au sein du même tissu au cours du développement embryonnaire (Trosko et al. 2000a; 2000b). La Cx43 et la Cx26 prédominent dans les tissus embryonnaires. À une certaine période du développement, les cellules du PNS, arrêtent d'exprimer la Cx43 et elle est remplacée par une autre connexine probablement la Cx32. Cette dernière est associée au maintien de l'homéostasie cellulaire (Bruzzone et al. 1996; Rozental et al. 1998).

Figure 3.19 Effet des inducteurs de la différenciation sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastomes IMR-32

L'évaluation de la communication intercellulaire dans les cellules IMR-32 non traités (A) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (B), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (C) ou la combinaison des deux (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans les conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou de la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cultures cellulaires sont lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavages au PBS, les cellules sont fixées avec une solution 4 % paraformaldéhyde dans du PBS pendant 20 min, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié en épi-fluorescence avec un film kodak ektachrome 400 tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.5). Barre: 50 μ m.

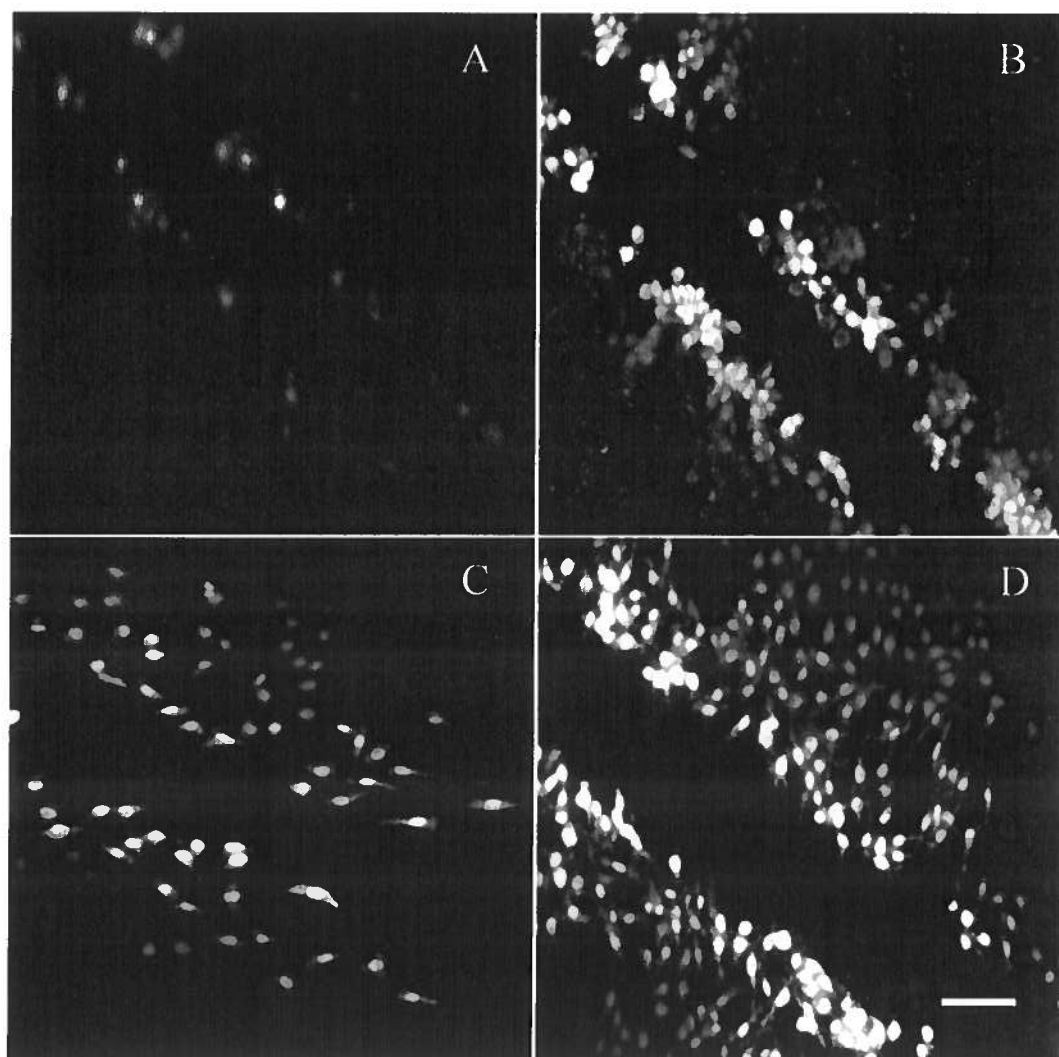
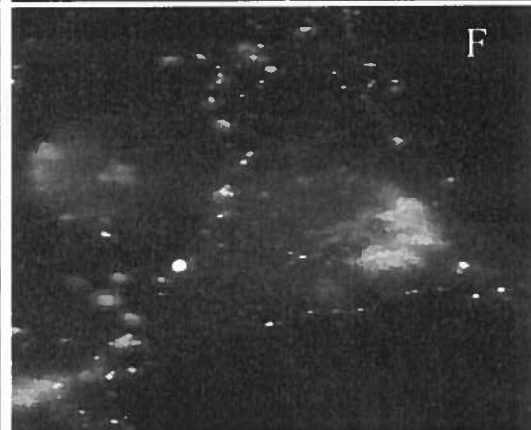
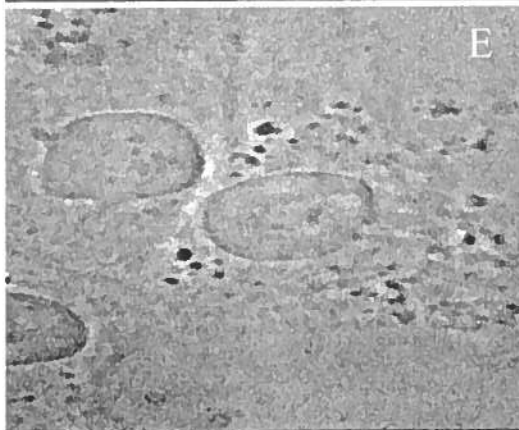
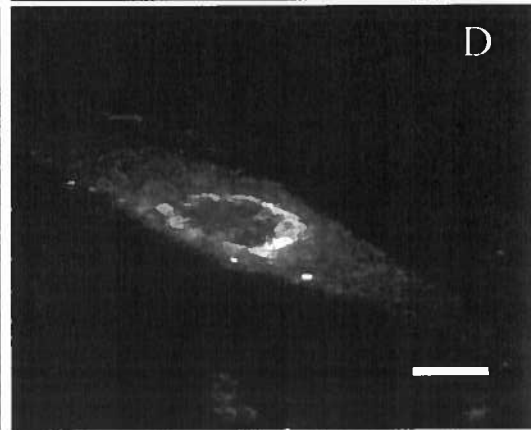
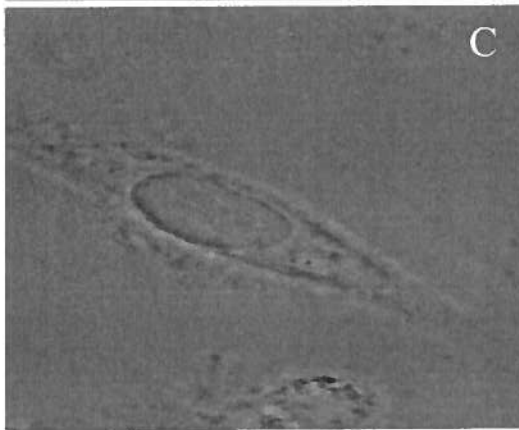
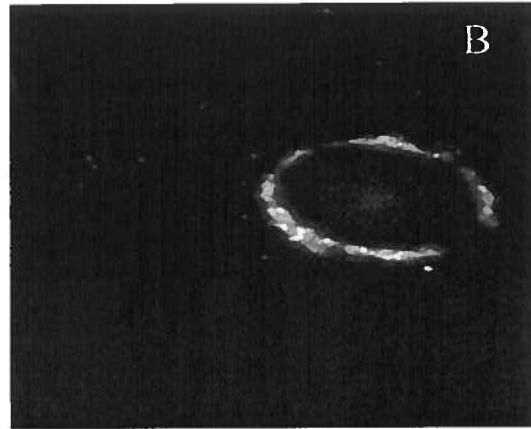
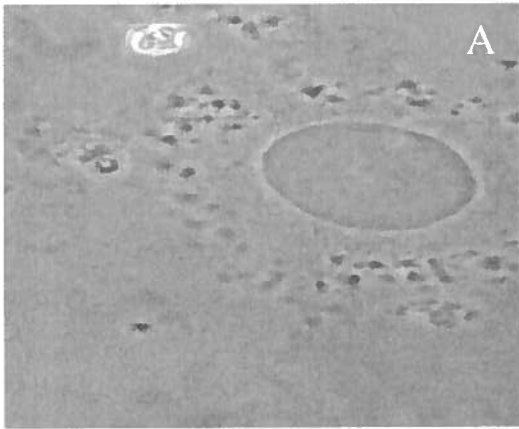


Figure 3.20 Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie à épi-fluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A, B) et traitées pendant une semaine avec 1 μ M de tRA (C, D), 0.5 mM de 8-Br-cAMP (E, F) ou une combinaison des deux (G, H).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA, de 0.5 mM 8-Br-cAMP ou la combinaison des deux tous les deux jours pendant une semaine. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.3). Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire couplé au fluochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont lavées, montées et examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié avec un film kodak ektachrome 400 en contraste de phase (A, C, E, G, I) et en épi-fluorescence (B, D, F, H, J). Barres: 6 μ m (A, B, C, D); 8 μ m (E, F, G, H).



Afin de mesurer l'effet cinétique de la différenciation sur les JICGs, les cellules d'IMR-32 ont été traitées par le 8-Br-cAMP et le tRA tous les 2 à 3 jours pour des périodes de 10, 15 et 20 jours. Après 25 jours, les cellules ont commencé à montrer des signes de mortalité et nous avons observé une différenciation optimale (Figure 3.21D) avec une élongation des neurites montrant des cellules neurales avec de longs axones (Figures 3.21B, C, D).

Cette différenciation morphologique a été accompagnée d'une augmentation de l'expression de la Cx43 tel que montré par la technique d'immunobuvardage (Figure 3.22). Cependant ni la Cx26 ni la Cx32 n'ont été détectées ni par immunobuvardage ni par RT-PCR (résultats non montrés). Parallèlement, nous avons observé qualitativement une élévation du transcrit de la Cx43 au cours de la différenciation (Figure 3.23). Cette élévation peut être due soit à une augmentation de la stabilité du messenger soit à une augmentation de la transcription ou les deux à la fois. Nous avons aussi montré que plus la différenciation progresse plus la perméabilité des jonctions intercellulaires de type gap augmente et qu'après 21 jours de traitement la perméabilité jonctionnelle est à son maximum (Figure 3.24). En effet, après cette période de traitement le fluochrome jaune de Lucifer atteint presque toutes les couches cellulaires (Figure 3.24F) et ne reste pas localisé uniquement dans les cellules lésées tel est le cas du contrôle (Figure 3.24A). Cette augmentation du couplage cellulaire durant la différenciation semble due à une re-localisation de la Cx43 sur la membrane cellulaire. Cet effet atteint son maximum vers 15 jours de traitement (Figure 3.25H). Après cette période, presque la totalité de la coloration immunologique (immunostaining) se retrouve sur la membrane plasmique et disparaît de la partie cytoplasmique (Figure 3.25J).

Nous avons déterminé que la capacité d'induire la différenciation par le 8-Br-cAMP et/ou le tRA en activant entre autre la PKA va de pair avec la capacité de rétablir progressivement la localisation des connexines sur la membrane plasmique. Les jonctions intercellulaires de type gap étant régulées par d'autres protéines kinases, la suite logique de notre travail, était de déterminer l'effet de certaines protéines kinases sur la régulation de ce type de communication cellulaire.

Figure 3.21 Évolution cinétique de la différenciation dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout *trans* rétinolique

Examen par microscopie à contraste de phase de la morphologie des neuroblastomes IMR-32 non traitées (A), traitées par une combinaison de 0.5 mM de 8-Br-cAMP et de 1 μ M tRA pendant 5 jours (B), 10 jours (C) et 20 jours (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 1 μ M tRA et de 0.5 mM 8-Br-cAMP tous les deux jours pendant vingt cinq jours. Les cellules sont examinées et photographiées en microscopie à contraste de phase. Barre: 50 μ m.

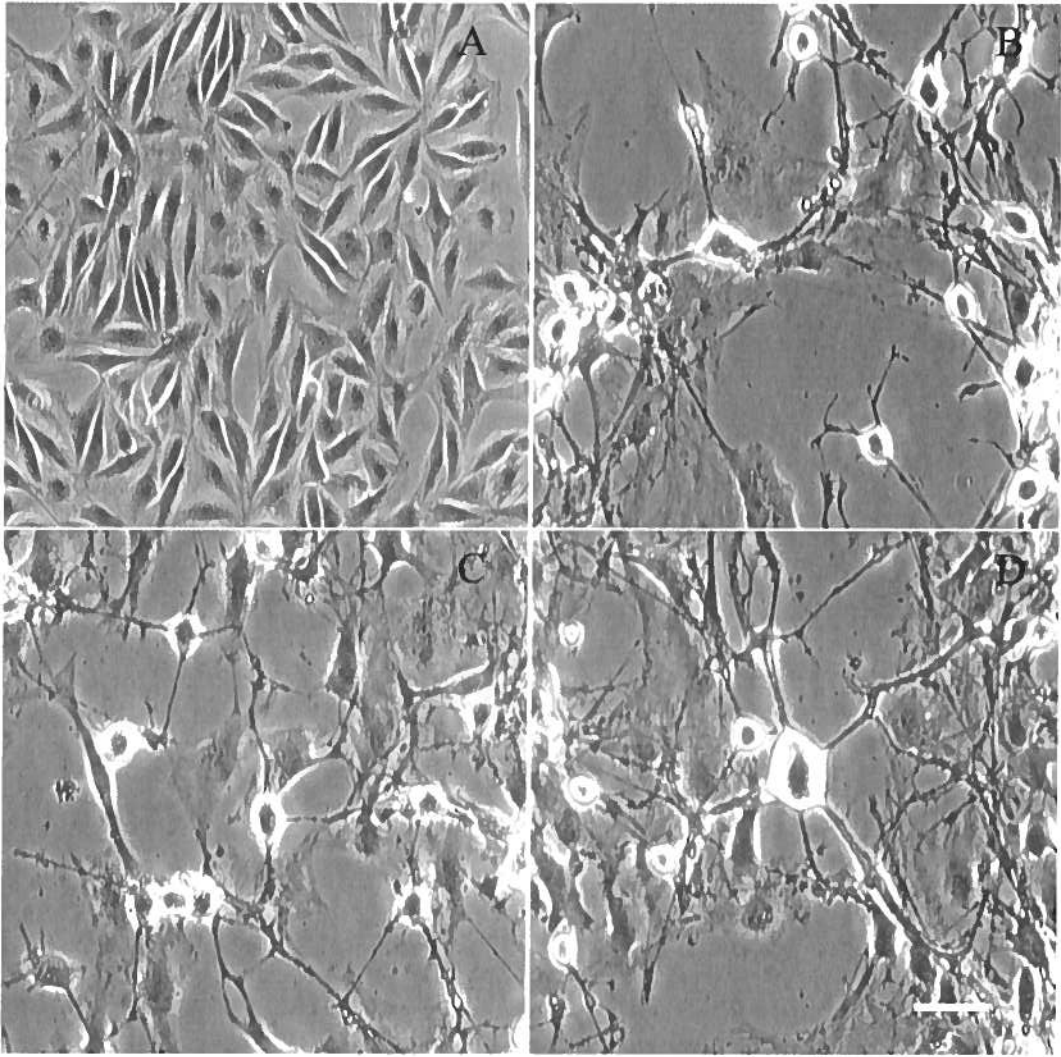
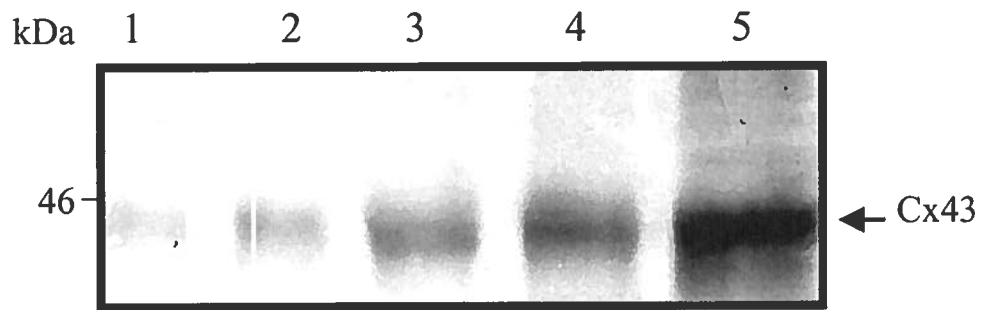


Figure 3.22 Évolution cinétique du profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout *trans* rétinolique

(A) Immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées par une combinaison de 8-Br-cAMP et de tRA. (B) profils densitométriques correspondants. Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées par une combinaison de 0.5 mM 8-Br-cAMP et de 1 μ M tRA pendant 5 jours (2), 10 jours (3), 15 jours (4) et 20 jours (5). Les cellules IMR-32 sont ensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M tRA et de 0.5 mM de 8-Br-cAMP tous les deux jours pendant vingt cinq jours. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

A



B

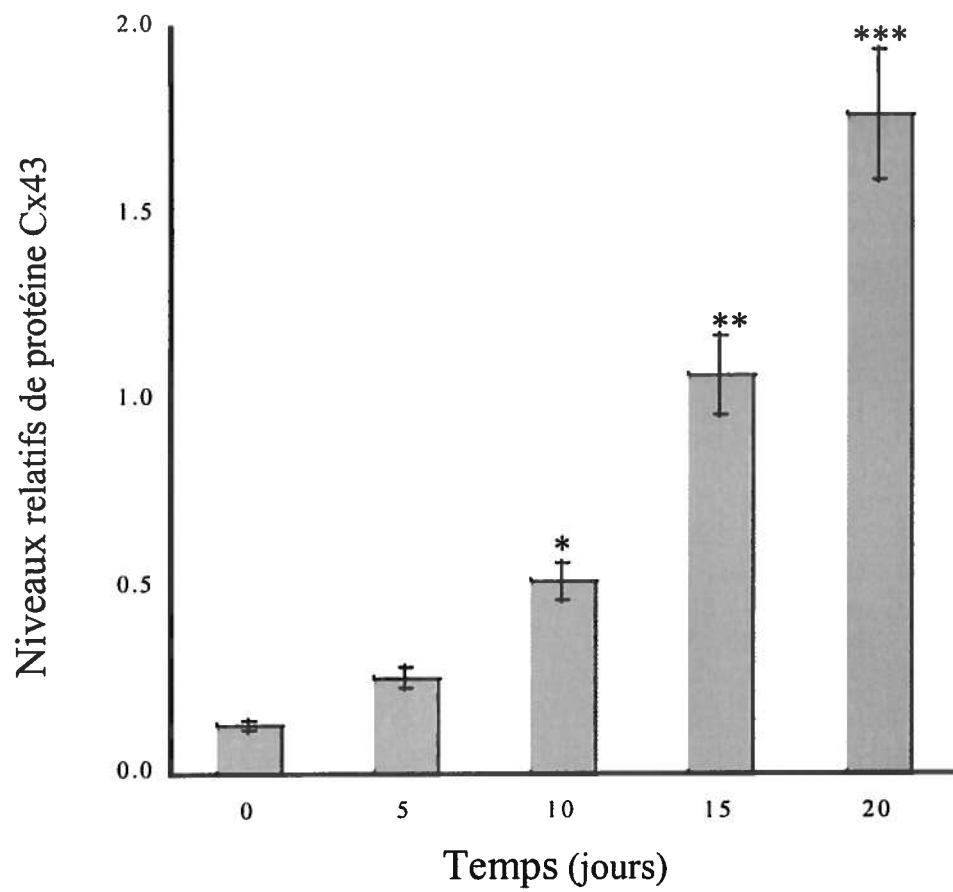


Figure 3.23 Évolution cinétique du profil de transcription de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de l'acide tout *trans* rétinolique

(A) Analyses de la transcription de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées par une combinaison de 8-Br-cAMP et de tRA. (B) profils densitométriques correspondants.

Détection de la transcription de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées avec une combinaison de 0.5 mM 8-Br-cAMP et de 1 μ M tRA pendant 5 jours (2), 10 jours (3), 15 jours (4) et 20 jours (5).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M tRA et de 0.5 mM de 8-Br-cAMP tous les deux jours pendant vingt cinq jours. Ensuite, l'ARN total est extrait des cellules différenciées et non différenciées en utilisant le kit de Qiagen. L'ARN total obtenue est utilisé pour préparer de l'ADN complémentaire en utilisant le kit de Pharmacia. Le gène de la Cx43 et celui de l'actin sont ensuite amplifié par une réaction de PCR en utilisant les amorces déduites du gène humain de la Cx43 selon les conditions expérimentales décrites matériels et méthodes (section 2.8). Un même volume du produit de PCR est soumis a une électrophorèse sur gel d'agarose a 1.5 % en présence de bromure d'éthidium sous un voltage de 100 V pendant 30 min. Ensuite le gel est visualisé sous UV et photographié en utilisant un film Polaroid Kodak 1700. Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$).

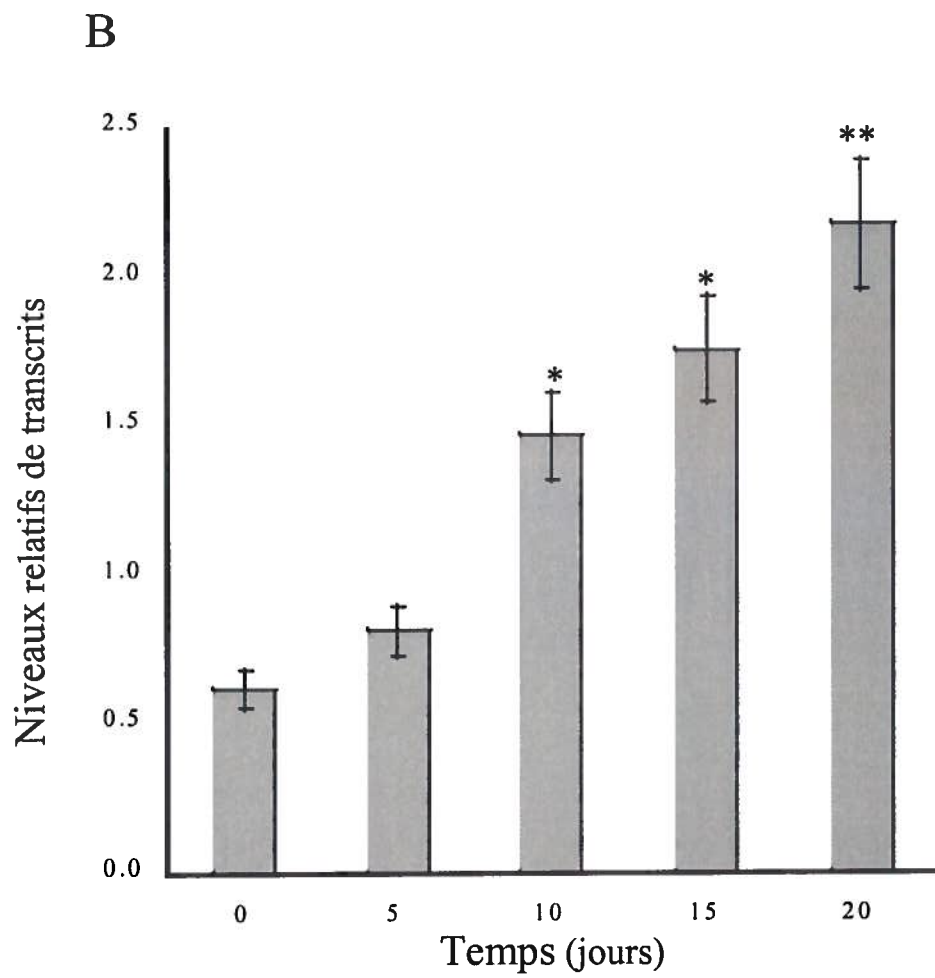
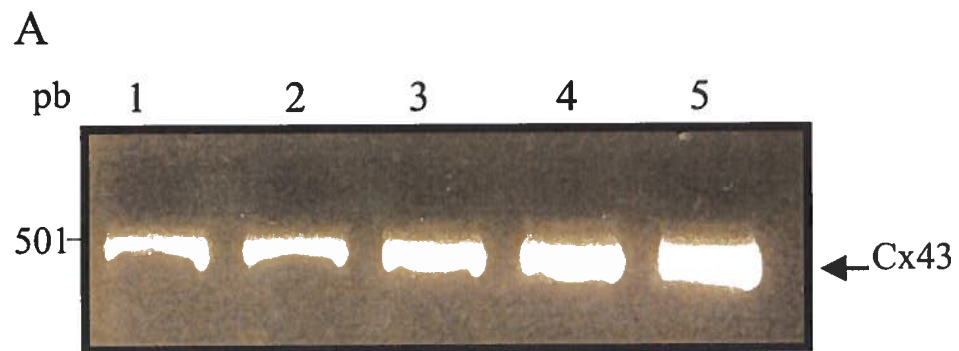


Figure 3.24 Évolution cinétique des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison du 8-Br-cAMP et de l'acide tout *trans* rétinolique

L'évaluation des communications intercellulaires dans les cellules IMR-32 non traitées (A) et traitées par une combinaison de 0.5 mM de 8-Br-cAMP et de 1 μ M tRA pendant 5 jours (B), 10 jours (C), 15 jours (D), 20 jours (E) et 25 jours (F).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M tRA et de 0.5 mM 8-Br-cAMP tous les deux jours pendant vingt cinq jours. Les cultures cellulaires sont lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavages au PBS, les cellules sont fixées dans une solution de 4 % paraphormaldéhyde dans du PBS pendant 20 min à la température de la pièce, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié en épi-fluorescence avec un film kodak ektachrome 400 tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.5). Barre: 50 μ m.

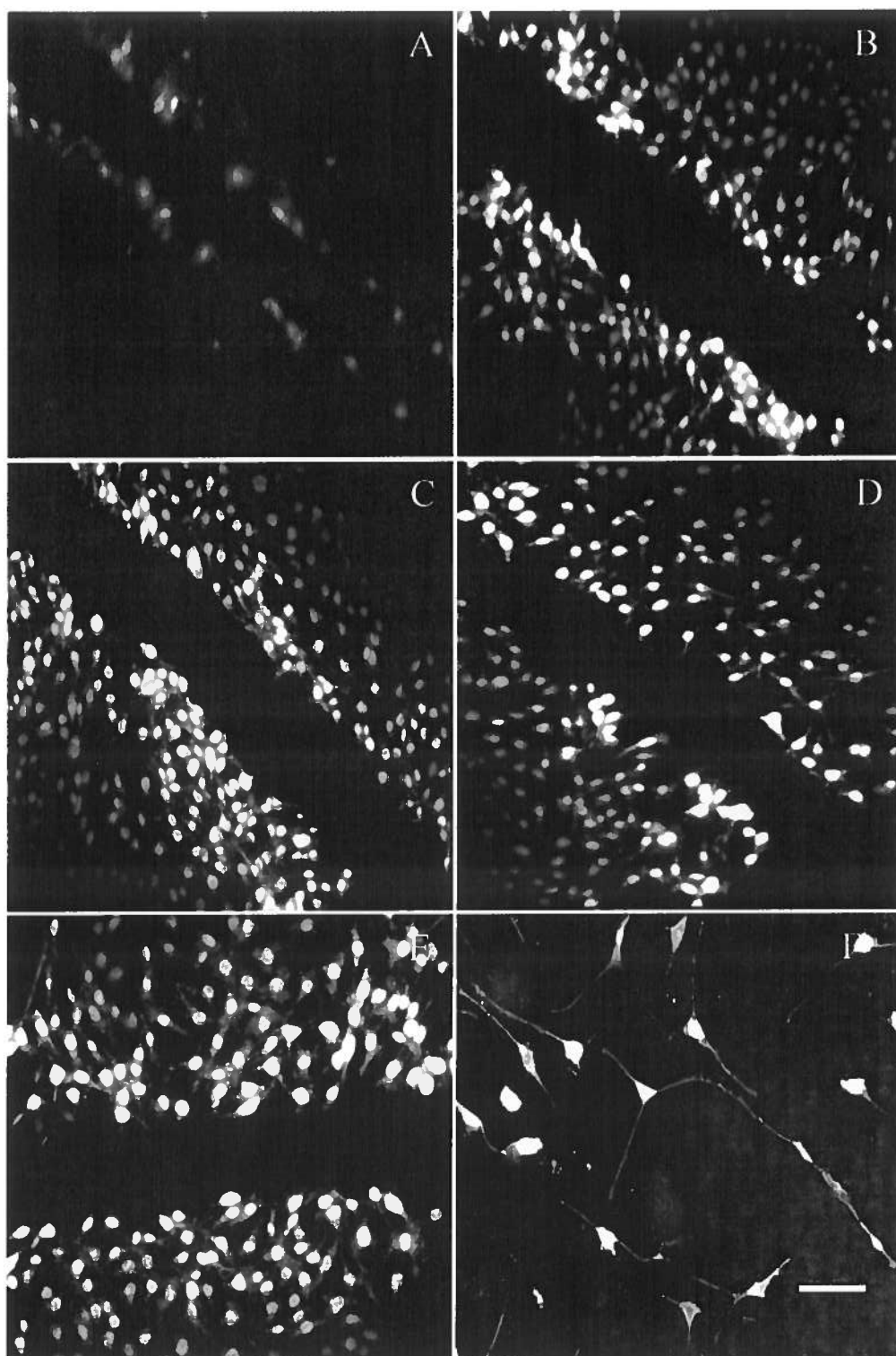
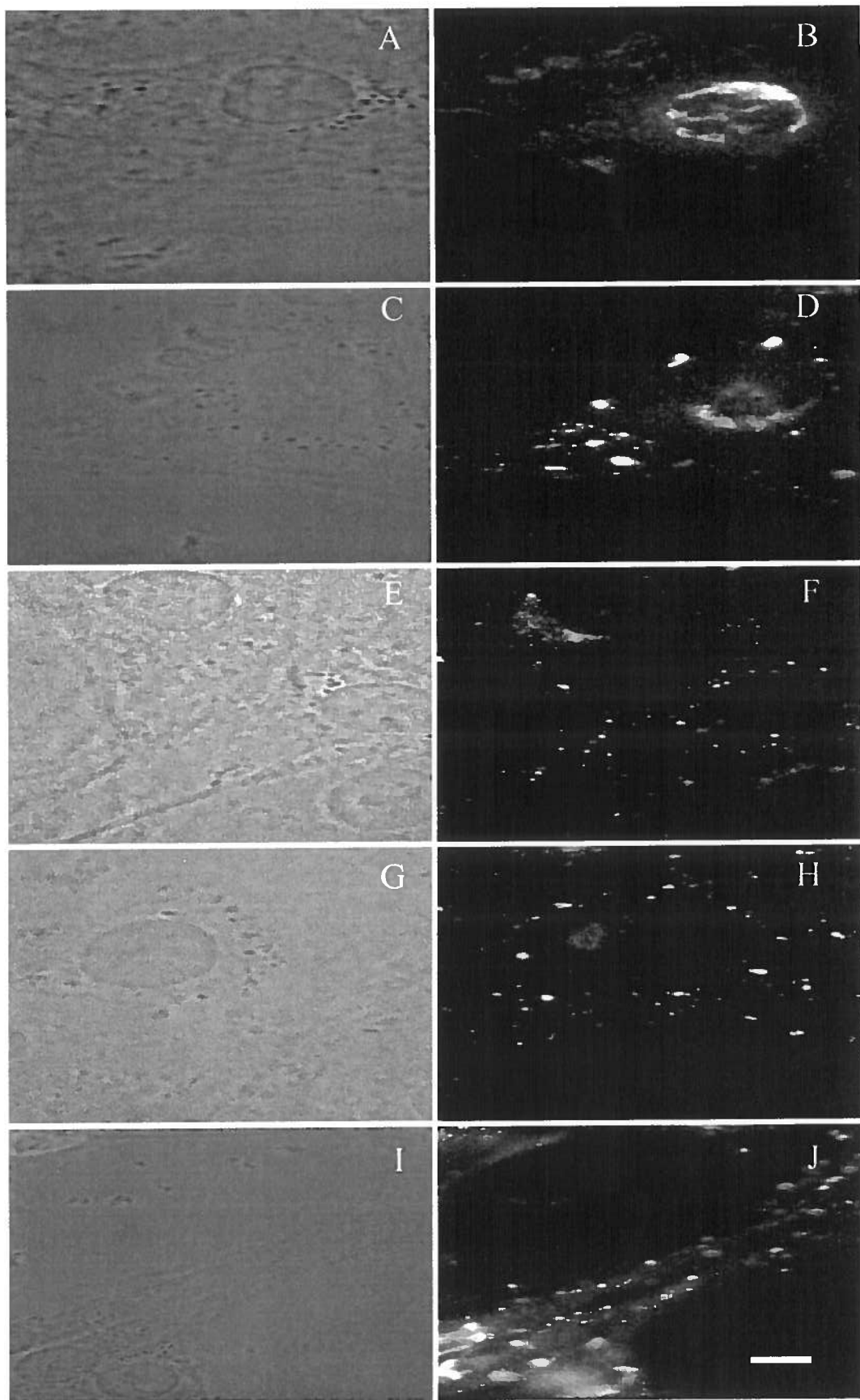


Figure 3.25 Évolution cinétique de la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées par la combinaison du 8-Br-cAMP et de l'acide tout *trans* rétinolique

Examen par microscopie à épi-fluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32 non traitées (A, B) et traitées par une combinaison de 0.5 mM 8-Br-cAMP et de 1 μ M tRA pendant 5 jours (C, D), 10 jours (E, F), 15 jours (G, H) et 20 jours (I, J).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 1 μ M tRA et de 0.5 mM 8-Br-cAMP tous les deux jours pendant vingt cinq jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont lavées, montées et examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées avec un film kodak ektachrome 400 en contraste de phase (A, C, E, G, I) et en épi-fluorescence (B, D, F, H, J). Barre: 8 μ m.



3.6 Protéine kinase C et jonctions intercellulaires de type gap

D'après la littérature, la Cx43 renferme plusieurs sites de phosphorylation au niveau de la partie C-terminale. Ces sites sont des consensus d'acides aminés particuliers qui conditionnent la phosphorylation par la PKA, la PKC, la MAPK ou la tyrosine kinase pp60src (Laird et al. 1995, 1996). Nous avons montré, que la PKA est impliquée dans la régulation de l'expression des JICGs dans la lignée de neuroblastome IMR-32. Dans la suite de nos travaux nous cherchions à cerner le rôle de la PKC dans cette régulation. Ainsi, nous avons utilisé des inhibiteurs de la PKC connu pour induire la différenciation dans les neuroblastomes. Parmi ces inhibiteurs non-spécifiques, la staurosporine et le H7 sont connus pour induire une différenciation morphologique suivi de l'apoptose chez différentes lignées de neuroblastomes (Bursztajn et al. 2001; Lopez et al. 2000). Le Go6976 quant à lui, est un inhibiteur spécifique des isoformes du groupe des PKCs conventionnelles (Rossner et al. 2001). La dose réponse de cet inhibiteur a été déterminée en mesurant son effet sur la prolifération des populations cellulaires. Ainsi, nos résultats indiquent que 140 nM de Go6976 est la dose la plus significative où l'effet est maximum sur la limitation de la prolifération cellulaire sans qu'il y ait de signes de toxicité ($p < 0.0001$; $n = 3$) (Figure 3.26).

Les cellules d'IMR-32 ont été traitées pendant 7 jours avec 140 nM de Go6976 et nous avons remarqué une réduction de la prolifération cellulaire de presque 60 % par rapport au contrôle après 5 jours de traitement (Figure 3.27). L'inhibition exercée par Go6976 est réversible, c'est pourquoi on note une augmentation de la population cellulaire avec le temps et que le pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle décroît. La microscopie de fluorescence en présence du réactif de Hoescht n'a montré aucune condensation de la chromatine au niveau du noyau (Figure 3.28). À cause de cette observation, il est plausible de penser que cette diminution de la prolifération induite par Go6976 n'est pas due à l'induction de l'apoptose mais plutôt à un délai dans la croissance cellulaire.

Figure 3.26 Effet d'une dose croissante de l'inhibiteur de PKC Go6976 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 0 à 200 nM de Go6976 plus tard une période de 48 heures. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre par la méthode d'exclusion du trypan bleu sous un microscope à contraste de phase. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 2 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

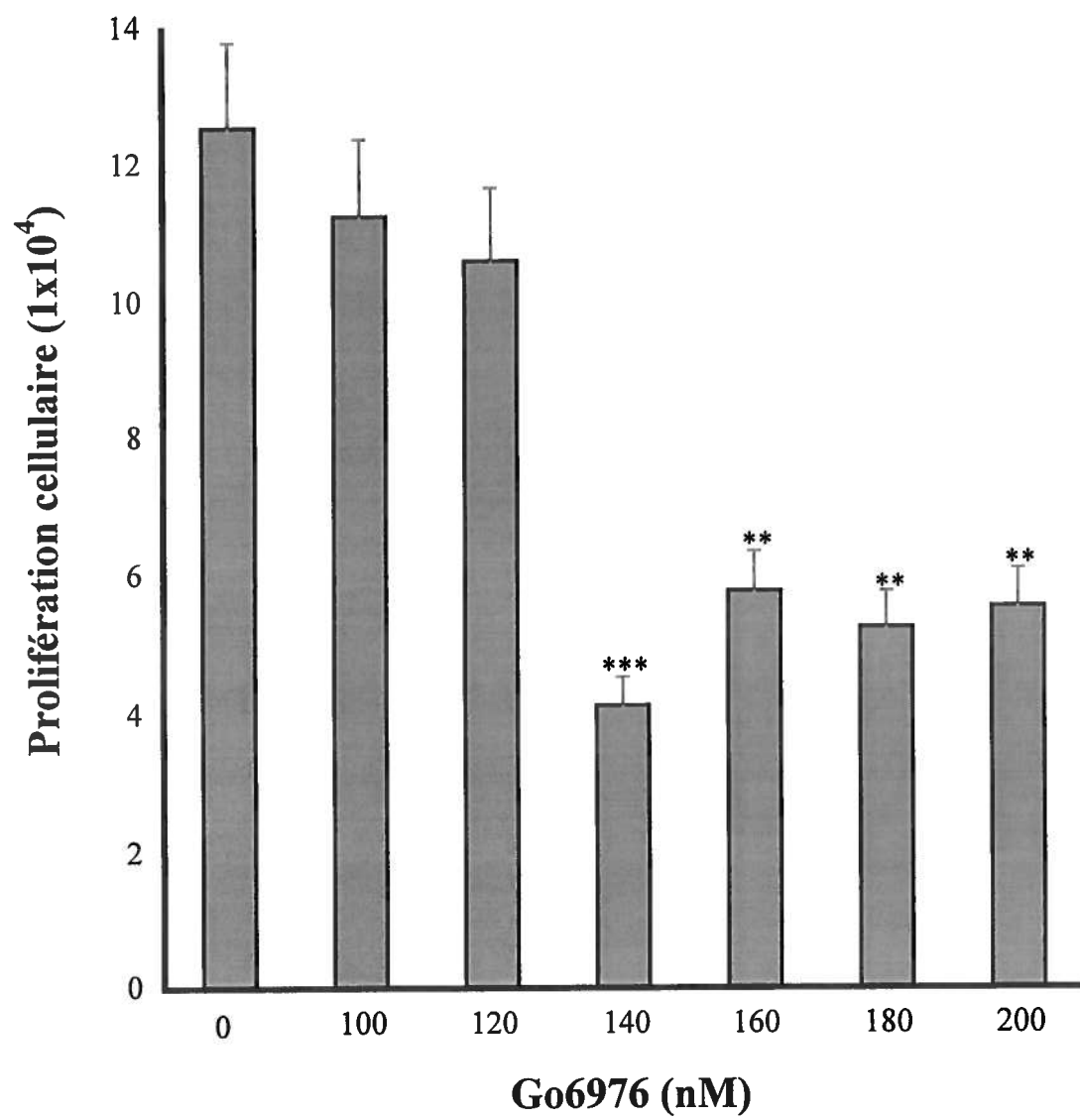


Figure 3.27 Effet d'une dose de 140 nM de Go6976 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 140 nM de Go6976 pendant 1 à 7 jours. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre par la méthode d'exclusion du trypan bleu sous un microscope à contraste de phase. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 2 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

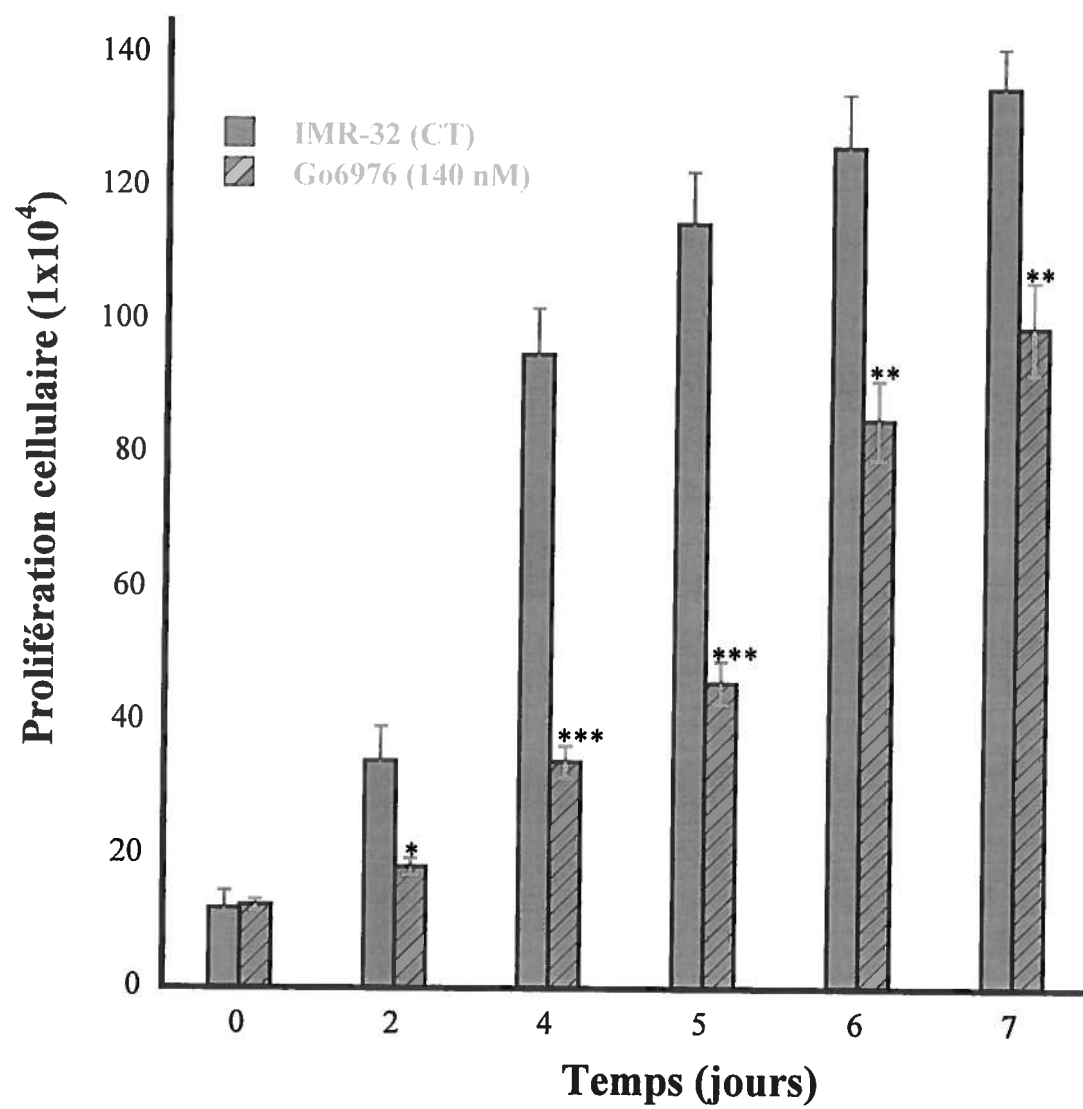
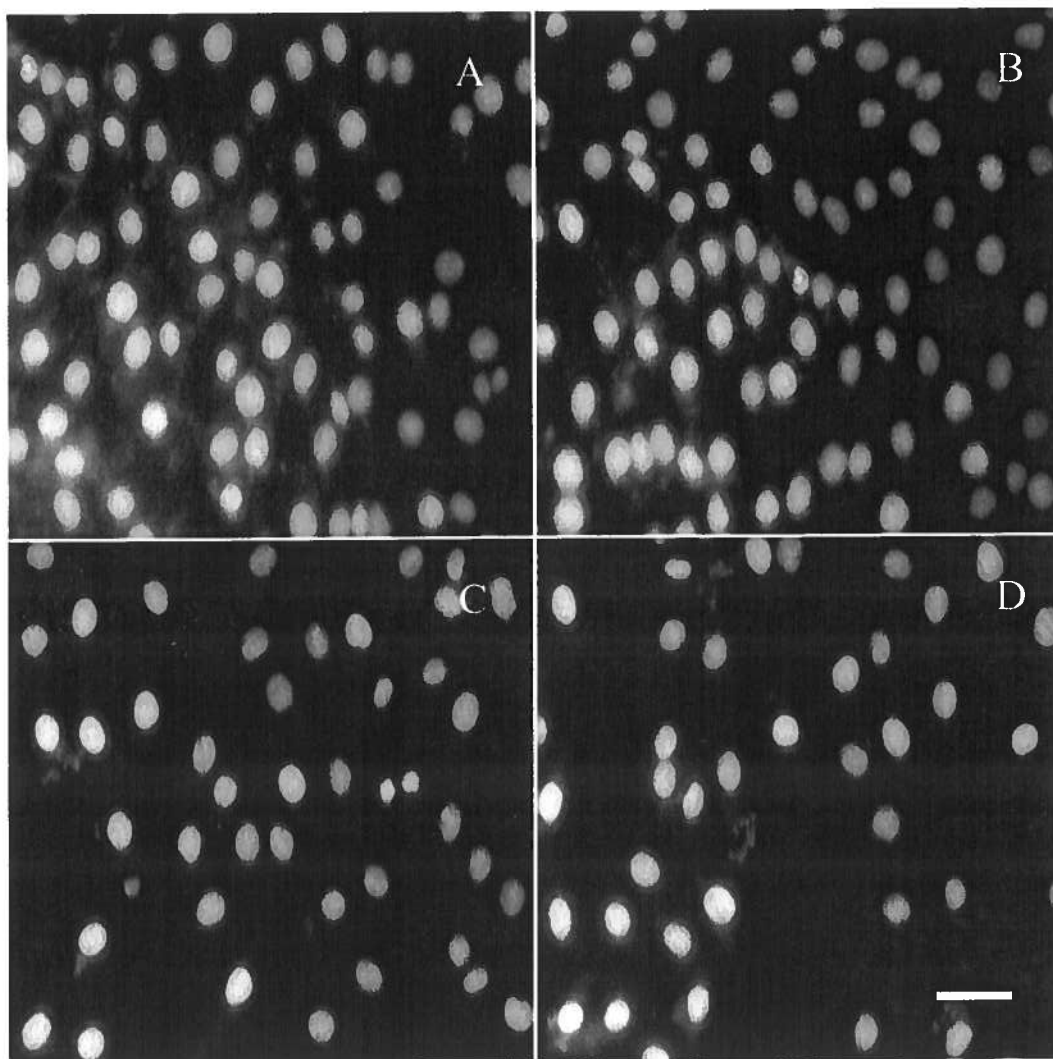


Figure 3.28 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur des cPKCs Go6976, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à épi-fluorescence de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées par 140 nM de Go6976 pendant 1 jours (B), 2 jours (C), 3 jours (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 140 nM de Go6976 pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, Les cellules fixées sont lavées et incubées dans une solution contenant $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min. Les cellules sont examinées et photographiées en épifluorescence avec un microscope Olympus équipé du filtre approprié. Barre: $25 \text{ }\mu\text{m}$.



Dans le cas des inhibiteurs non spécifiques, le H7 et la staurosporine induisent un arrêt de la prolifération et une réduction du nombre de cellules (Figure 3.29) dû à l'induction de l'apoptose après vingt quatre heures de traitement tel que montré par la condensation de la chromatine au niveau du noyau (Figure 3.30). Nous avons vérifié l'effet de ces inhibiteurs sur les JICGs. Au niveau de l'expression de la Cx43, ni la staurosporine, ni le H7 ni le Go6976 ne semblent avoir d'effet (Figure 3.31). Cependant, nos travaux montrent que l'inhibiteur Go6976 induit l'ouverture des pores des JICGs chez les IMR-32 après vingt quatre heures de traitement tel que montré par la technique de chargement par grattage en présence du colorant jaune de Lucifer (Figure 3.32D). La staurosporine et le H7 induisent par contre une ouverture moins prononcée des canaux jonctionnels (Figure 3.32B, C). Cette augmentation de la perméabilité jonctionnelle est accompagnée par une re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique (Figure 3.33).

3.7 La MAP kinase et la régulation des JICGs dans les cellules de neuroblastome IMR-32

La famille des MAPKs comprend entre autres les ERK1/2 et la p38 (Bennett et al. 1997; Burgen, 2000). En utilisant les inhibiteurs spécifiques pour chacune de ces deux MAP kinases, nous avons voulu déterminer si elles sont impliqués dans la régulation des JICGs dans la lignée de neuroblastome IMR32.

Les deux inhibiteurs spécifiques de ces MAPKs utilisés sont celui de ERK1/2, PD98059 (Tavarani et al. 2000) et celui de la p38, SB202190 (Tavarani et al. 2000). Les effets de ces inhibiteurs sur la prolifération, l'apoptose et les jonctions intercellulaires de type gap ont été étudiés. Ces processus constituent les points terminaux des voies métaboliques considérées dans ce projet. Les résultats obtenus présentés sur la Figure 3.34 montrent qu'à des concentrations de 25 à 50 μ M les deux inhibiteurs, soit le SB202190 et le PD98059, exercent une réduction de la prolifération cellulaire d'environ 50%. À 25 μ M le SB202190, induit une diminution de croissance qui se poursuit jusqu'à

Figure 3.29 Effet des inhibiteurs de PKCs, H7 et staurosporine sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 100 nM de staurosporine ou 100 μM de H7 pendant 0 à 36 heures. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre par la méthode d'exclusion du trypan bleu sous un microscope à contraste de phase. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 2 expériences faites en triplicate. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

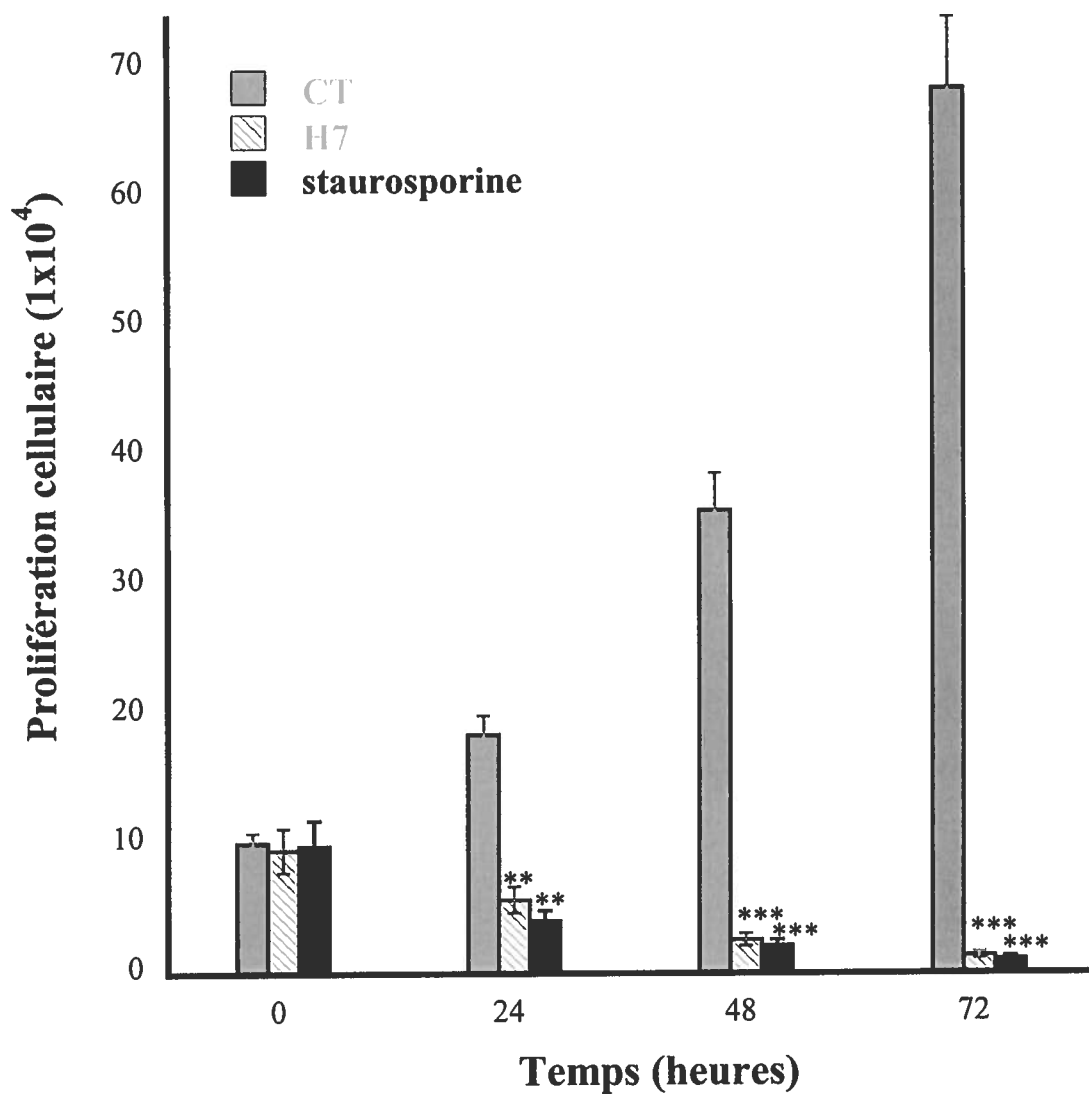


Figure 3.30 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec les inhibiteurs de PKC H7 et staurosporine, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à épi-fluorescence de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 24 heures avec 100 nM de staurosporine (B) ou 100 μ M de H7 (C).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 100 nM de staurosporine ou 100 μ M de H7 pendant 24 heures dans les conditions de culture standards. Ensuite, Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Les cellules fixées sont lavées, montées et incubées avec une solution de 1 μ g/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min. Les cellules sont examinées et photographiées en épifluorescence avec un microscope Olympus équipé du filtre approprié. Barre = 25 μ m.

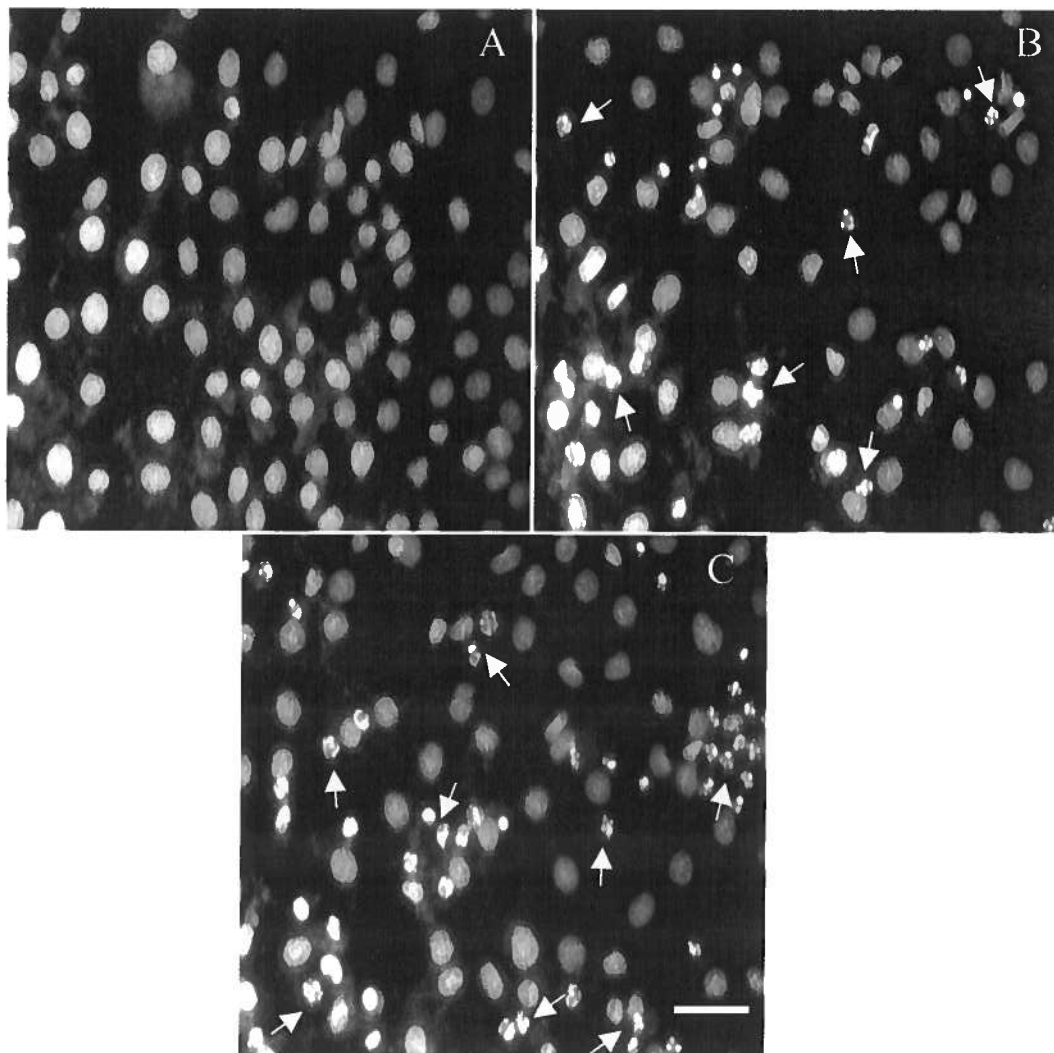


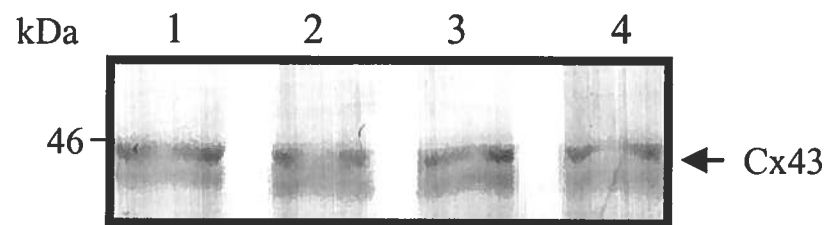
Figure 3.31 Effet des inhibiteurs de PKC sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec différents inhibiteurs de PKCs. (B) profils densitométriques correspondants.

Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant 24 heures avec 100 nM de staurosporine (2), 100 μ M de H7 (3) ou 140 nM de Go6976 (4).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm² dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 100 nM de staurosporine, 100 μ M de H7 ou 140 nM de Go6976. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro.

A



B

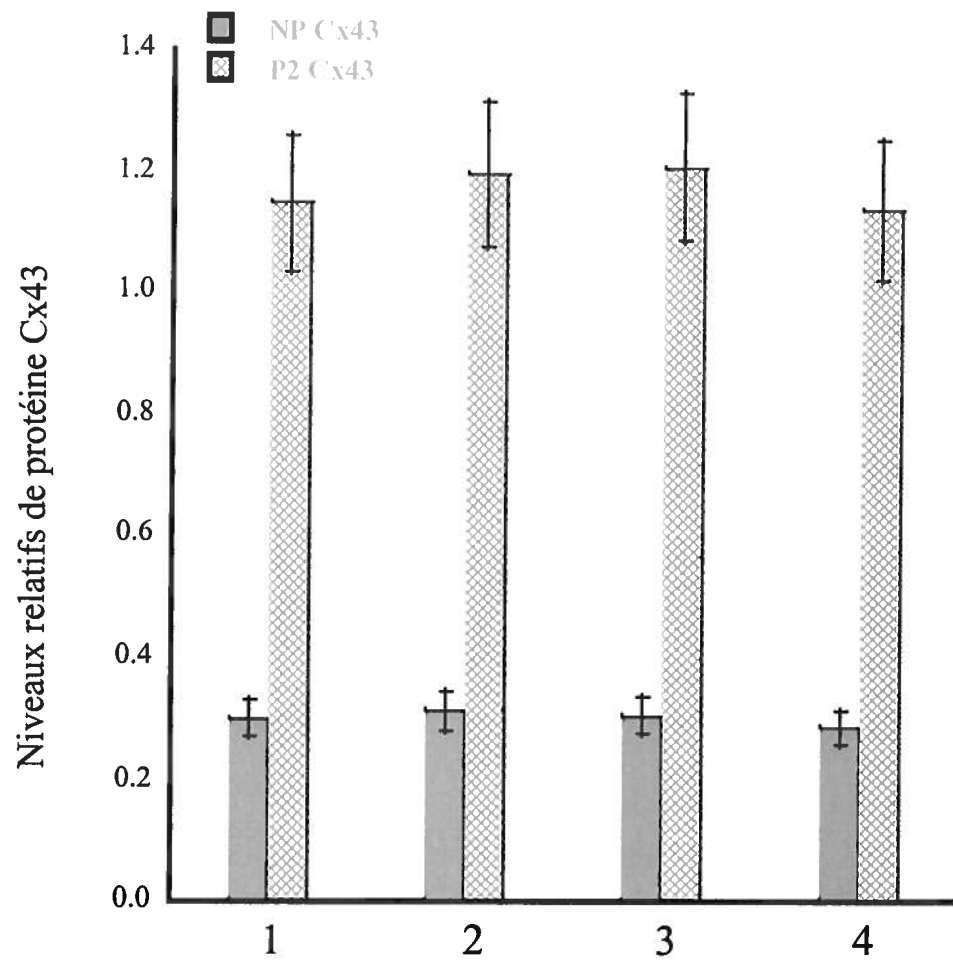


Figure 3.32 Effet des inhibiteurs de PKC sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32

L'évaluation de la communication intercellulaire des populations de cellules IMR-32 non traités (A) et traitées pendant 24 heures avec 100 nM de staurosporine (B), 100 μ M de H7 (C) ou 140 nM de Go6976 (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm² dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu culture additionné de 100 nM de staurosporine, 100 μ M de H7 ou 140 nM de Go6976. Les cultures cellulaires sont lavées et lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées avec une solution à 4 % paraformaldéhyde dans du PBS pendant 20 min, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié en épi-fluorescence avec un film kodak ektachrome 400 tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.5). Barre: 25 μ m.

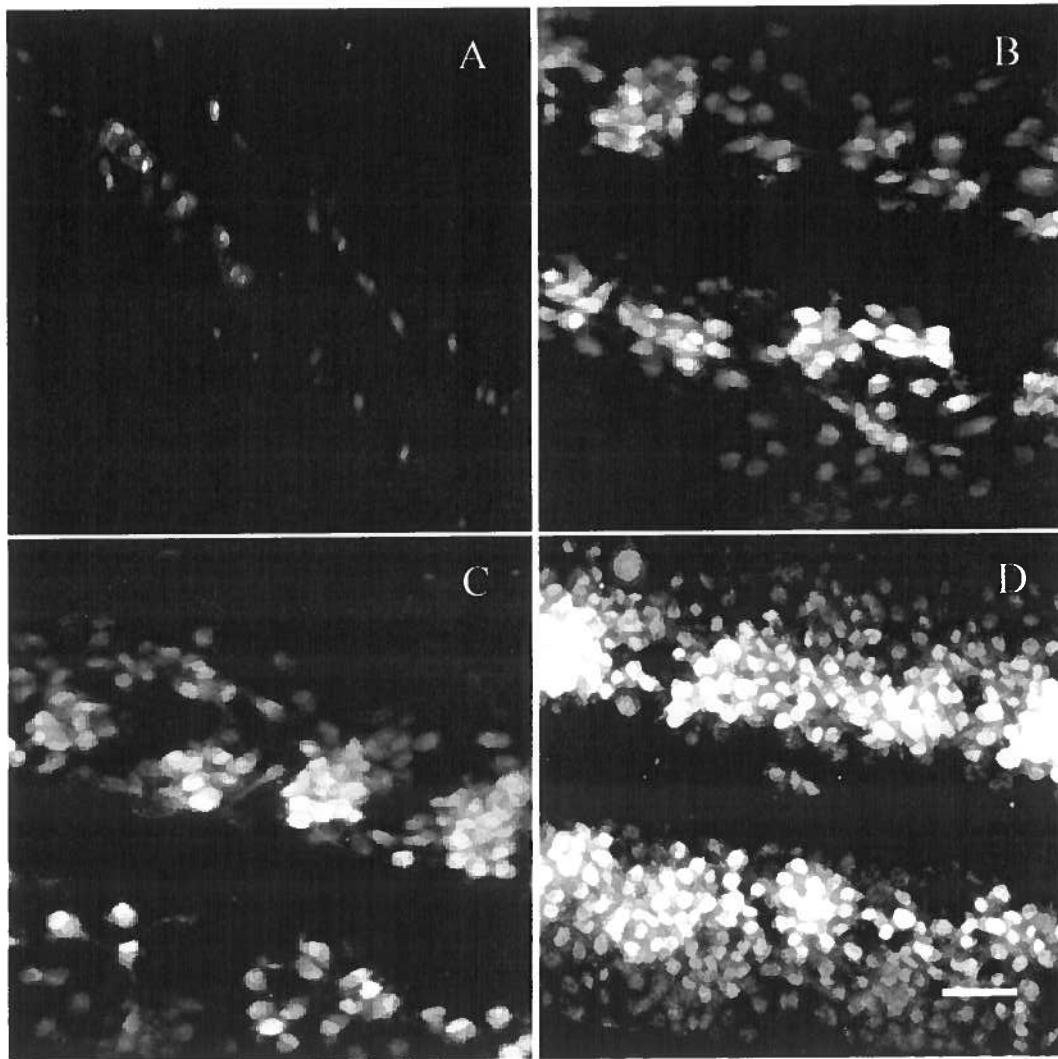


Figure 3.33 Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet de l'inhibiteur des cPKCs Go6976 sur la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie d'épi-fluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 24 heures avec 140 nM de Go6976 (B).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné par 140 nM de Go6976 pendant 24 heures. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont lavées et incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées en épi-fluorescence avec un film kodak ektachrome 400. Barre: 6 μm .

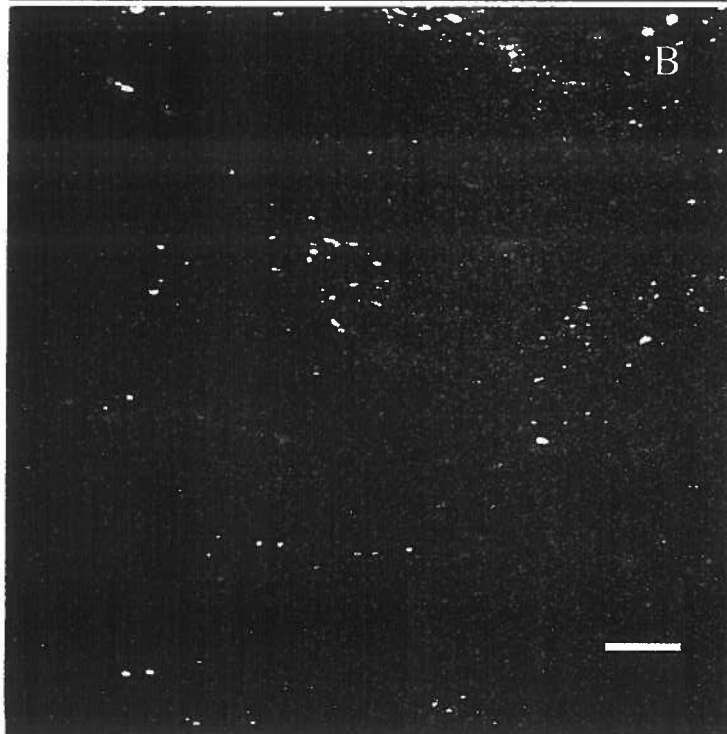
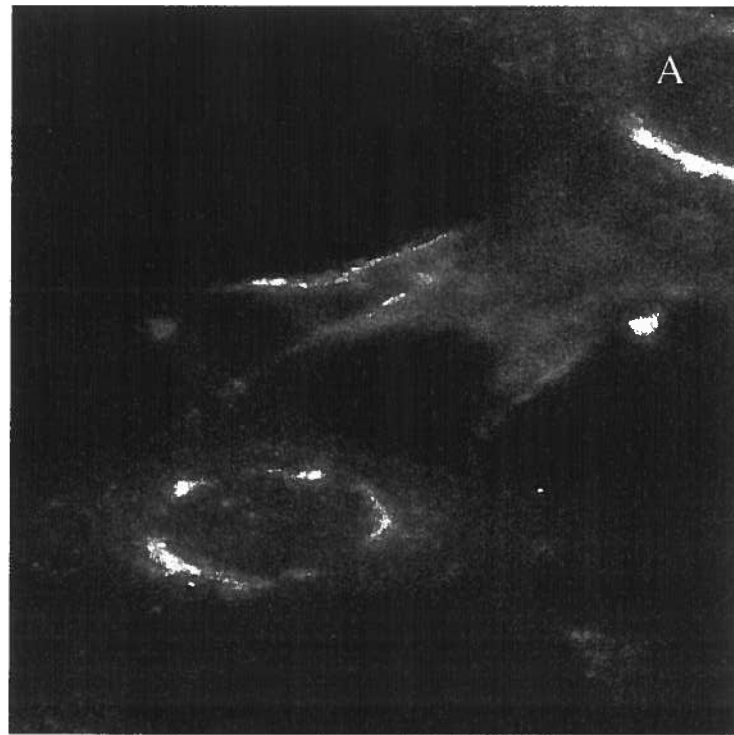
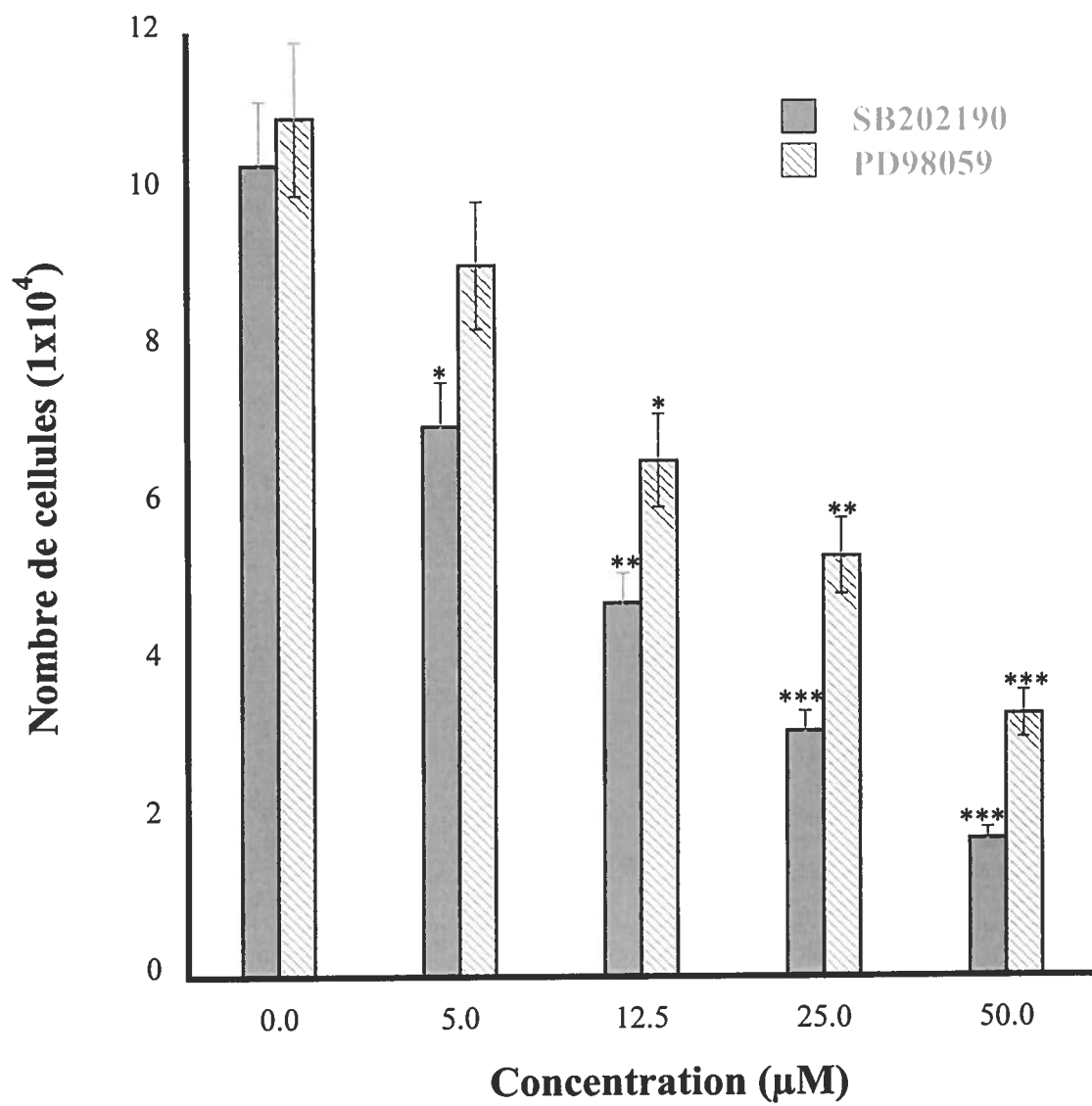


Figure 3.34 Effet d'une dose croissante des inhibiteurs de la MAP kinase PD98059 et SB202190 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 5 à 50 μM de PD98059 ou de 5 à 50 μM de SB202190 pendant une période de 48 heures dans les conditions standards de culture. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre sous un microscope à contraste de phase. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 2 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).



une chute importante du nombre de cellules. Par contre, l'inhibition de la ERK1/2 a un effet transitoire sur la réduction de la prolifération cellulaire parce que l'inhibition est réversible dans le temps (Figure 3.35). Puisque cette régulation de la croissance cellulaire peut être due soit à la modulation du cycle cellulaire ou encore à l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Nous avons répondu à cette question par le test du fluorochrome Hoescht. En effet, ce test permet d'observer la condensation de la chromatine caractéristique de l'apoptose.

Les cellules d'IMR-32 ne montrent pas de signes d'apoptose après 1, 2 et 3 jours d'incubation en présence de 25 μ M de PD98059 (Figure 3.36), alors qu'après une incubation de juste 24 heures avec 25 μ M SB202190, une condensation de la chromatine est observée et elle est à son maximum autour du troisième jour (Fig. 3.37C, D). L'effet de l'inhibition des MAP kinases sur l'expression de la Cx43 a été étudié et celle-ci n'est affectée ni par PD98059 ni par SB202190 (Figure 3.38). Seul l'inhibiteur SB202190 induit une augmentation de la perméabilité et une translocation de la Cx43 du cytoplasme vers la membrane (Figure 3.39C et Figure 3.40C) alors que l'inhibiteur PD98059 n'a pas d'effet ni sur le couplage cellulaire par les JICGs ni sur la re-localisation de la Cx43 (Figure 3.39B et Figure 3.40B).

3.8 Les céramides et la régulation des JICGs dans les cellules IMR-32

Comme les autres effecteurs et messagers secondaires de la signalisation, les céramides diffuses dans les tissus à travers les JICGs (Trosko et al. 2000a). Les céramides agissent comme molécule de signalisation pour activer plusieurs de cascades de signalisation incluant les kinases (MAPK et PKC) et les effecteurs du cycle cellulaire (Rb et c-myc) (Pahlavani et al. 2000; Levade et al. 1999). Les céramides sont connues pour leur participation active dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la mort cellulaire programmée (Ballou et al. 1996).

Figure 3.35 Effet de 25 μ M PD98059 et de 25 μ M SB202190 sur la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 20 mm^2 dans les conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu culture additionné de 25 μ M de PD98059 ou de 25 μ M de SB202190 pendant 1 à 3 jours. Le décompte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre par la méthode d'exclusion du trypan sous un microscope à contraste de phase. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 2 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significatif par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

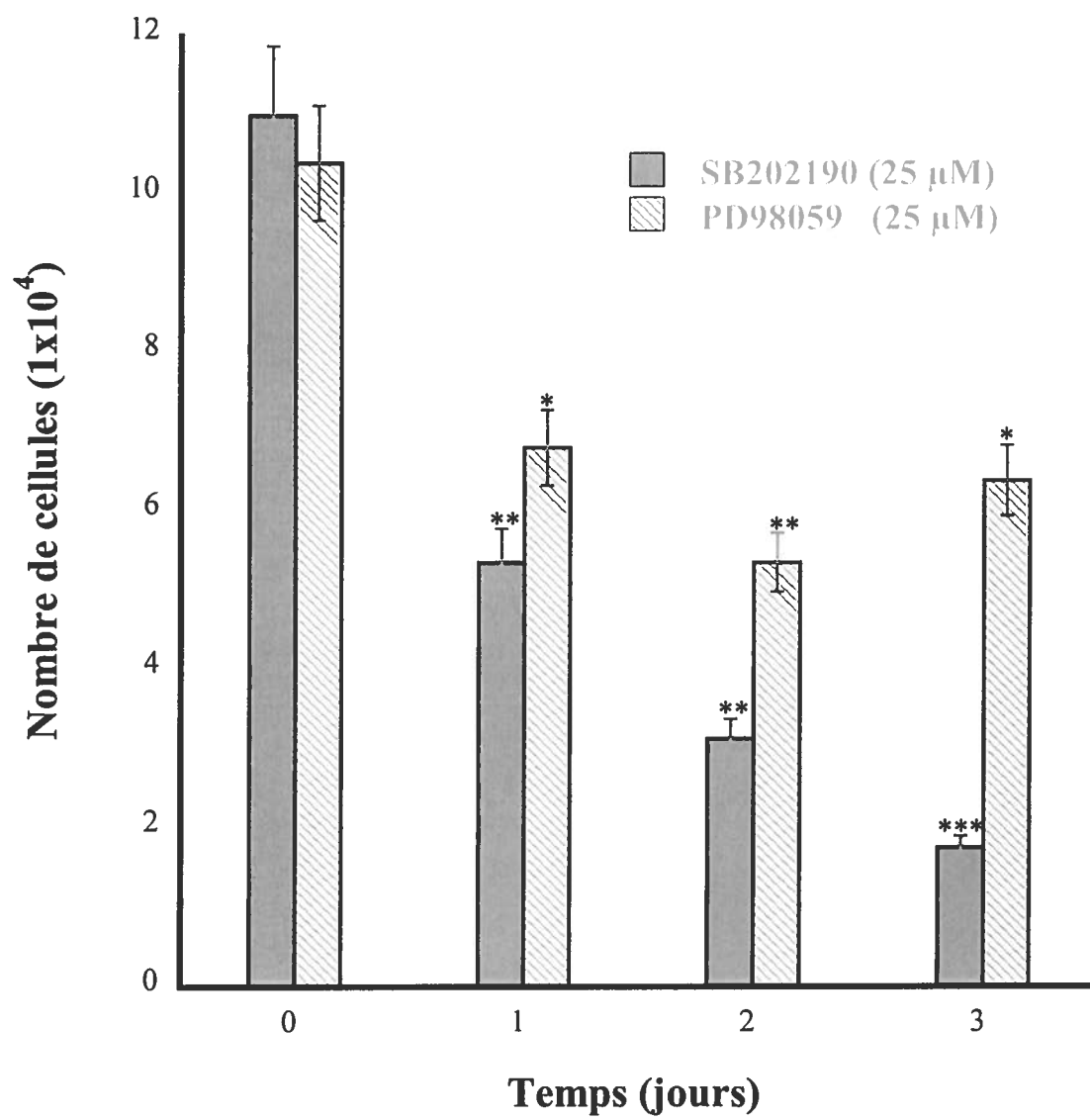


Figure 3.36 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur de MAP kinase PD98059, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à épi-fluorescence de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées avec 25 μ M de PD98059 pendant 1 jour (B), 2 jours (C), 3 jours (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu culture additionné de 25 μ M de PD98059 pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, les cellules fixées sont incubées dans une solution contenant 1 μ g/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min. Les cellules sont examinées avec un microscope Olympus équipé du filtre approprié et photographiées en épifluorescence. Barre: 25 μ m.

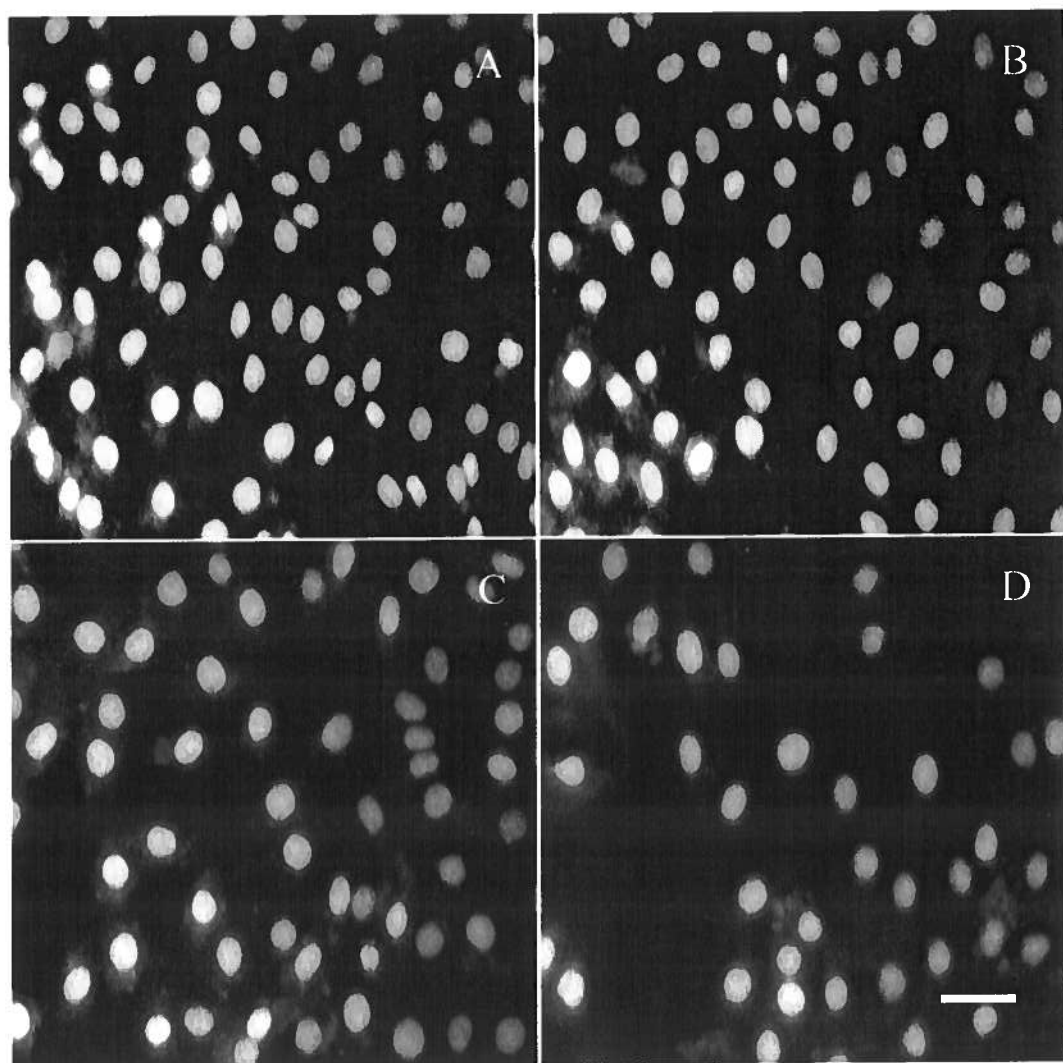


Figure 3.37 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec l'inhibiteur de MAP kinase SB202190, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à contraste de phase de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées avec 25 μ M de SB202190 pendant 1 jour (B), 2 jours (C), 3 jours (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionnée de 25 μ M SB202190 pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, les cellules fixées sont incubées avec une solution contenant 1 μ g/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min. Les cellules sont examinées et photographiées en épifluorescence avec un microscope Olympus équipé du filtre approprié. Barre: 25 μ m.

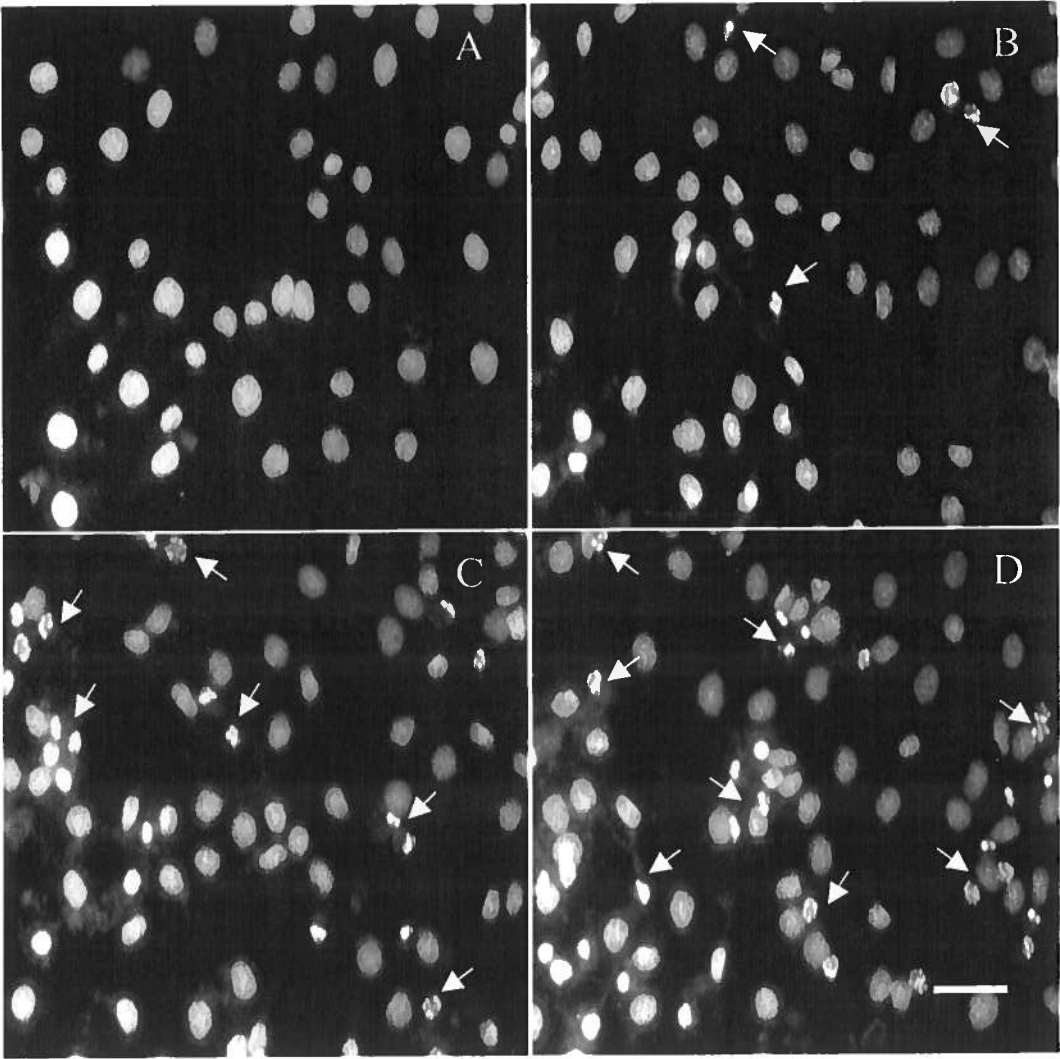
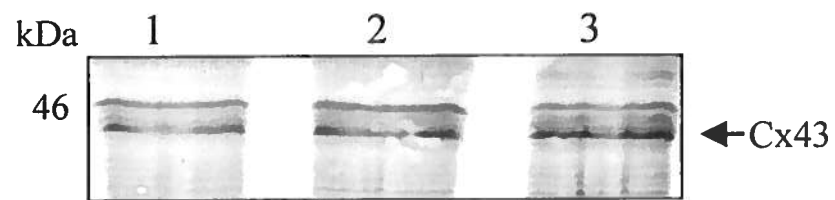


Figure 3.38 Effet de l'inhibition spécifique des MAPKs ERK1/2 et p38 sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées avec des inhibiteurs spécifiques des MAP kinases. (B) profils densitométriques correspondants. Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant 48 heures avec 25 μ M de PD98059 (2) ou 25 μ M de SB202190 (3). Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm² dans des conditions standards. 48 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 25 μ M PD98059 ou de 25 μ M SB202190. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μ g de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro.

A



B

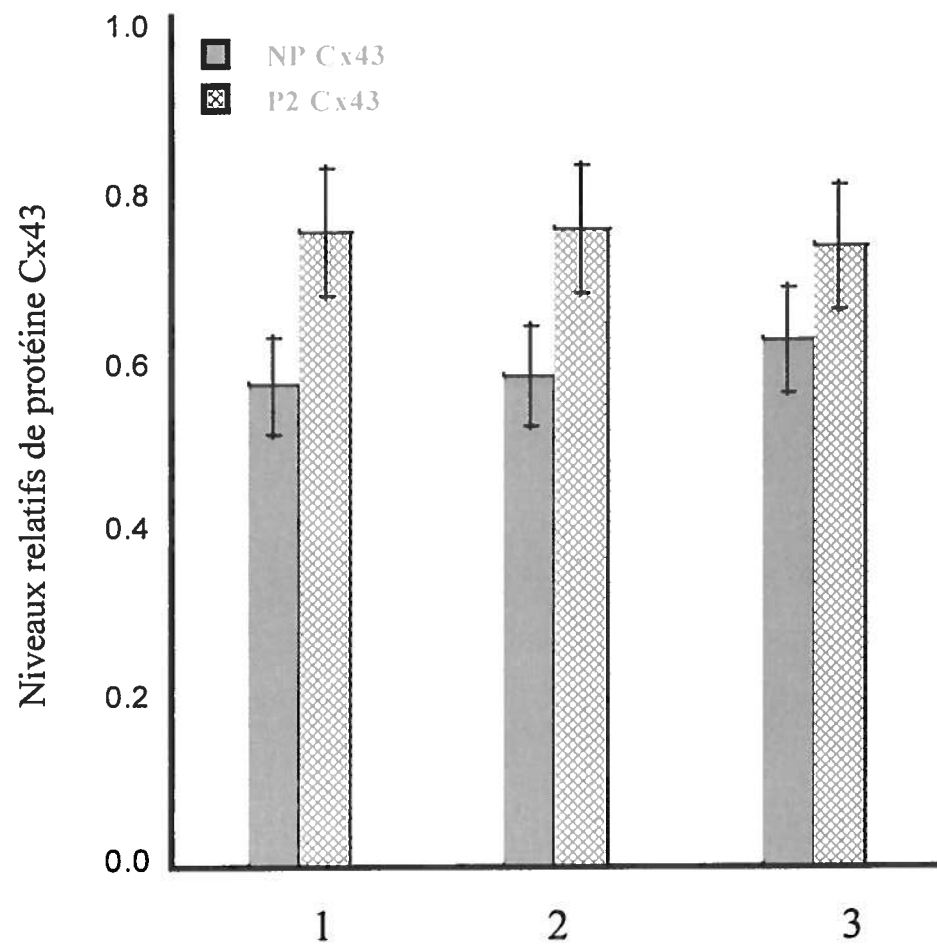


Figure 3.39 Effet de l'inhibition spécifique des MAPKs ERK1/2 et p38 sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32

L'évaluation de la communication intercellulaire des cellules IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 48 heures par 25 μ M de PD98059 (B) ou 25 μ M de SB202190 (C). Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm² dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu additionné de 25 μ M PD98059 ou de 25 μ M SB202190 pendant 48 heures. Les cultures cellulaires sont lavées et lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavages au PBS, les cellules sont fixées avec une solution à 4 % paraphormaldéhyde dans du PBS pendant 20 min, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié en épi-fluorescence avec un film kodak ektatachrome 400 tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.5). Barre: 25 μ m.

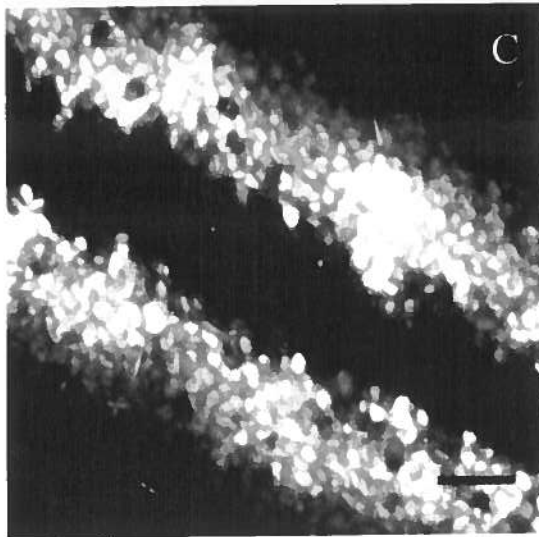
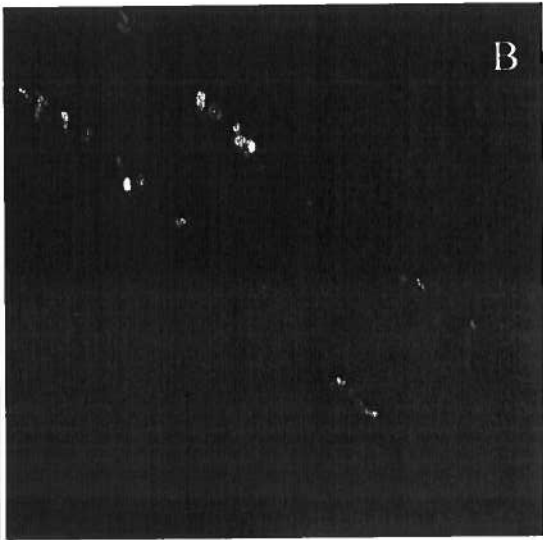
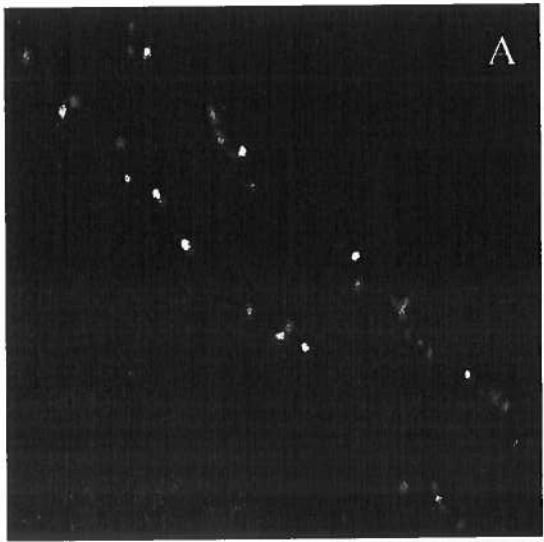
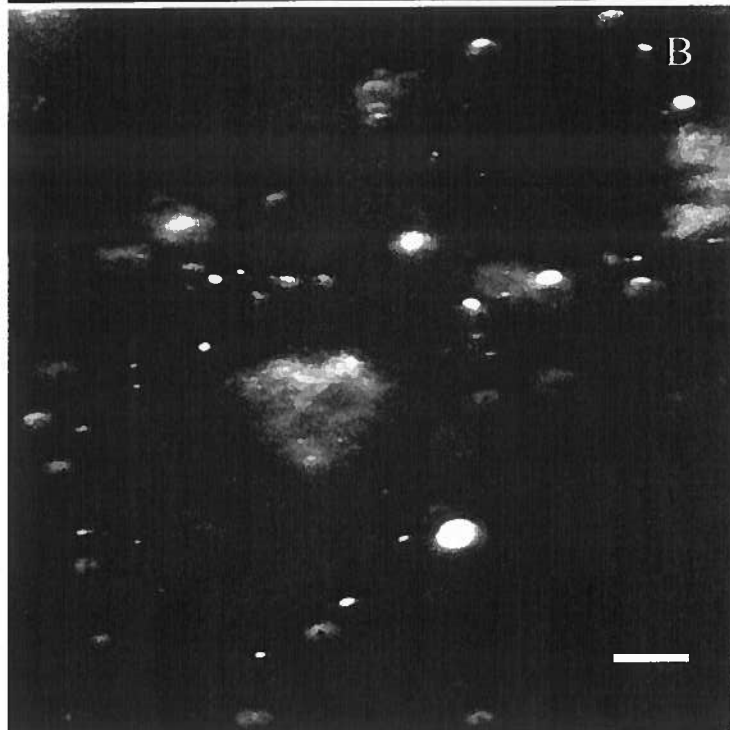
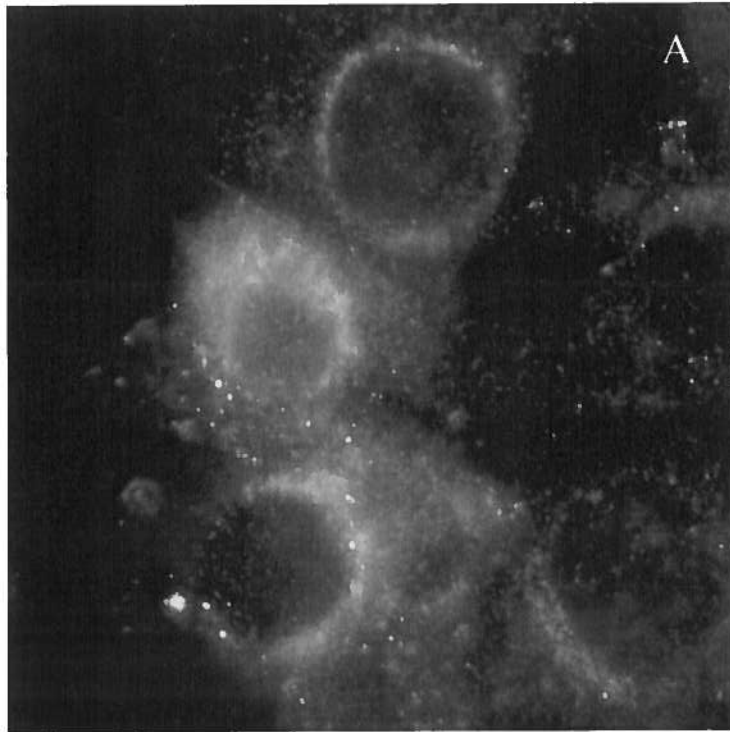


Figure 3.40 Effet de l'inhibition de la p38 MAP kinase sur la sous-localisation cellulaire de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

Examen par microscopie à contraste de phase de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 48 heures avec 25 μ M SB202190. (B).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec un milieu de culture additionné de 25 μ M SB202190 pendant 48 heures. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.3). Les cellules fixées sont lavées et incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa. Ensuite, les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées en épi-fluorescence avec un film kodak ektachrome 400. Barre: 8 μ m (A), 6 μ m (B).



3.8.1 Implication des céramides dans l'apoptose

Nous avons étudié l'effet des céramides sur la prolifération, la différenciation, l'apoptose ainsi que sur les jonctions intercellulaires de type gap dans la lignée de neuroblastomes IMR-32. Pour ce faire, afin de cerner le rôle des céramides, les analogues présentant des propriétés physico-chimiques similaires à celles des céramides naturelles ont été étudiés. Les analogues des céramides à courte chaîne aliphatique sont les plus actifs biologiquement (Tavarani et al. 2000). Nous avons utilisé dans cette étude la C2-cér ou la C6-cér à quatre concentrations finales soient, 12.5, 25, 50 et 100 μM . L'effet des céramides a été mesuré par l'estimation de la viabilité cellulaire par la technique de mesure de l'ADN total des populations tel que décrit dans matériel et méthodes (section 2.1.2).

Les cellules d'IMR-32 traitées par 12.5 μM de C6-cér ont montré une viabilité de $40 \pm 3.6\%$ après 24 heures, de $10 \pm 1.2\%$ après 48 heures alors qu'à des doses plus fortes soit à 25, 50 et 100 μM les cellules n'ont pas survécu au traitement dès les premières heures (Figure 3.41). Sur le plan morphologique, les cellules traitées avec C6-cér, même à des doses faibles, ont montré des signes de nécrose et de toxicité représentés par une augmentation rapide du volume cellulaire et la perte de l'intégrité membranaire (résultats non montrés). L'autre céramide utilisé est la C2-cér. A des faibles doses (12.5 - 50 μM) les cellules IMR-32 traitées par la C2-cér ne montrent aucun signe de toxicité dans nos conditions expérimentales. Les cellules incubées avec 12.5 μM de C2-cér montrent cependant une réduction de la croissance cellulaire de $5 \pm 0.3\%$ après 24 heures, $15 \pm 1.2\%$ après 48 heures et $20 \pm 2.2\%$ après 72 heures alors que des concentrations plus élevées 25, 50 et 100 μM inhibent la prolifération cellulaire d'au moins la moitié après 72 heures. Les cellules traitées avec des doses plus élevées, soient 50 à 100 μM montrent une très forte mortalité après 72 heures (Figure 3.42).

La diminution de la croissance cellulaire observée dans les cellules IMR-32 traitées avec la C2-cér pouvait résulter soit d'un arrêt du cycle cellulaire soit de l'activation de la voie de l'apoptose dans une partie de la population. Afin de vérifier

Figure 3.41 Effet d'une dose croissante de C6-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées dans un milieu de culture avec 10 % sérum additionné d'une dose croissante de C6-cér (12.5 à 100 μ M) pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont ensuite lavées et lysées et un volume de 100 μ l d'une solution contenant 4 μ g/ml du réactif de Hoechst 33258 dans du PBS est ajouté à chacun des puits et le tout est incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.2). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement au nombre de cellules. Le nombre des cellules est calculé à partir d'une courbe standard. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

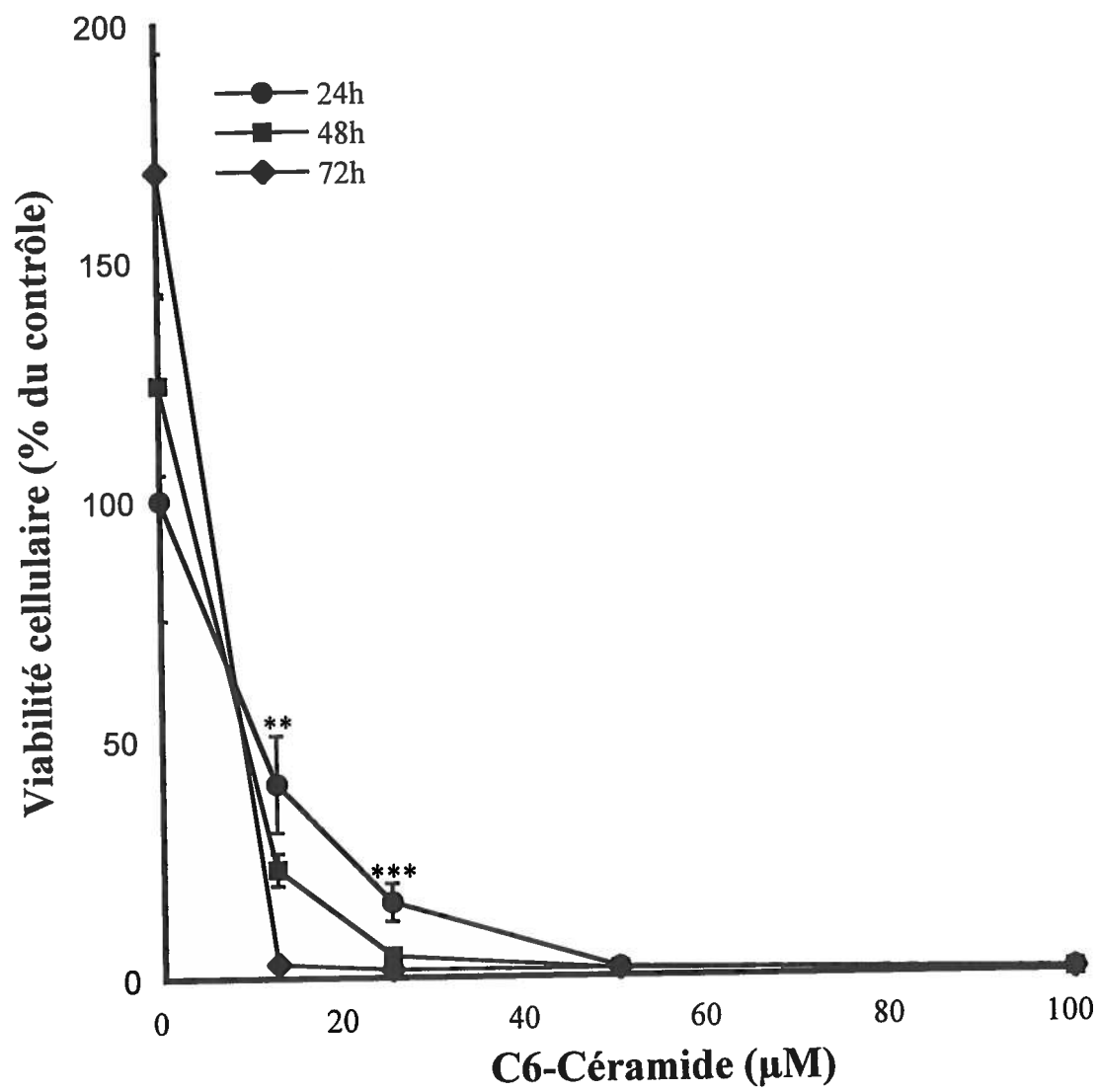
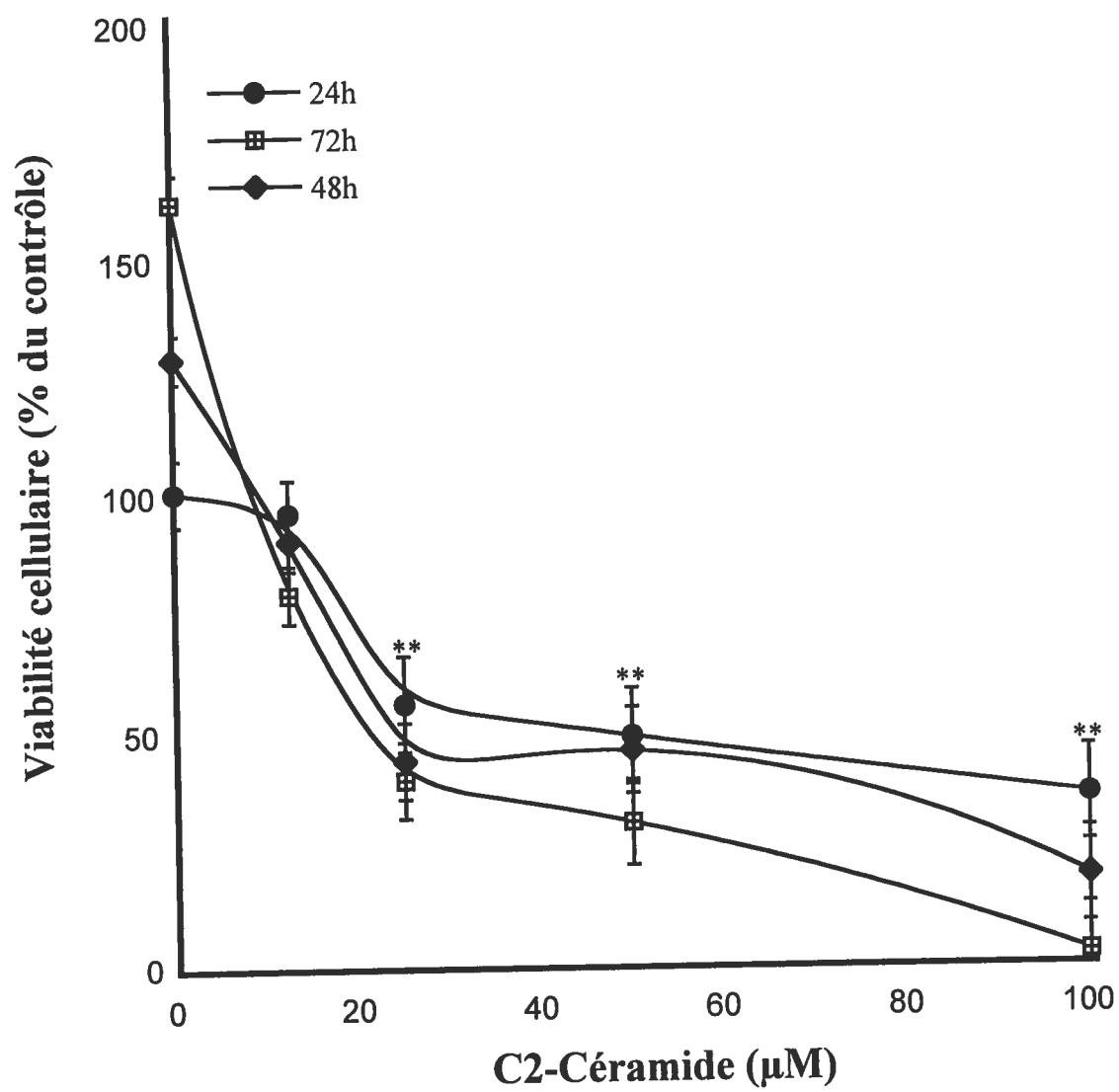


Figure 3.42 Effet d'une dose croissante de C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées dans un milieu de culture avec 10 % sérum additionné d'une dose croissante de C2-cér (10 à 100 μM) pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont ensuite lavées et lysées et un volume de 100 μl d'une solution contenant 4 $\mu\text{g/ml}$ du réactif de Hoechst 33258 dans du PBS est ajouté à chacun des puits et le tout est incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.2). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement au nombre de cellules. Le nombre des cellules est calculé à partir d'une courbe standard. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (** = $p < 0.001$).



cela, nous avons observé les cellules traitées par la C2-cér pour détecter les signes d'apoptose. Les résultats des Figures 3.43 et 3.44 montrent que les cellules traitées par 25 μ M de C2-cér ne montrent aucun signe d'apoptose même après 72 heures d'incubation, donc la réduction observée du nombre de cellules est probablement due à un arrêt de la prolifération cellulaire. Cependant, à des concentrations plus élevées de C2-cér (50 à 100 μ M) l'apoptose est induite après 24 heures et le nombre de cellules apoptotiques continue d'augmenter après 48 heures et 72 heures tel que cela a été démontré après exposition des cellules au réactif de Hoescht. Ainsi, la condensation de la chromatine caractéristique de la mort cellulaire programmée apparaît au bout d'une journée de traitement avec 100 μ M de C2-cér (Figure 3.45).

Les Figures 3.43, 3.44 et 3.45, montrent qu'une concentration de 100 μ M de C2-cér induit l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 tel que montré par la condensation de la chromatine après exposition des cellules au fluochrome Hoechst 33258.

3.8.2 Implication des céramides dans le ralentissement de l'activité mitotique

Les résultats antérieurs (section 3.7.1) ont montré que le ralentissement de la prolifération semble être influencé par la concentration de céramide présente dans le milieu de culture. En général, la réduction ou le ralentissement de la prolifération peut impliquer entre autre des protéines kinases qui contribuent à la régulation indirecte de la prolifération cellulaire tel que les MAPKs et la PKC (Blazquez et al. 2000; Willaime et al. 2001).

En vue d'identifier les voies de signalisation empruntées par les céramides, nous avons essayé d'identifier les protéines kinases clés impliquées dans la réduction de la prolifération des cellules de neuroblastome IMR-32 induite par une concentration de 25 μ M de C2-cér. En premier lieu, l'implication de la voie de la MAPK a été vérifiée en pré-incubant les cellules avec les inhibiteurs de ERK1/2 soit le PD98059 ou avec l'inhibiteur

Figure 3.43 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec des doses croissantes de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à épi-fluorescence de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées par des doses croissantes de C2-céramides 25 μM (B), 50 μM (C) ou 100 μM (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées par un milieu de culture avec 10 % sérum additionné de C2-cér (25 à 100 μM) pendant 24 heures. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, les cellules fixées sont lavées et incubées dans une solution contenant 1 $\mu\text{g/ml}$ du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min à 37 °C. Les cellules sont examinées et photographiées avec un microscope Olympus à épifluorescence équipé du filtre approprié. Barre: 25 μm .

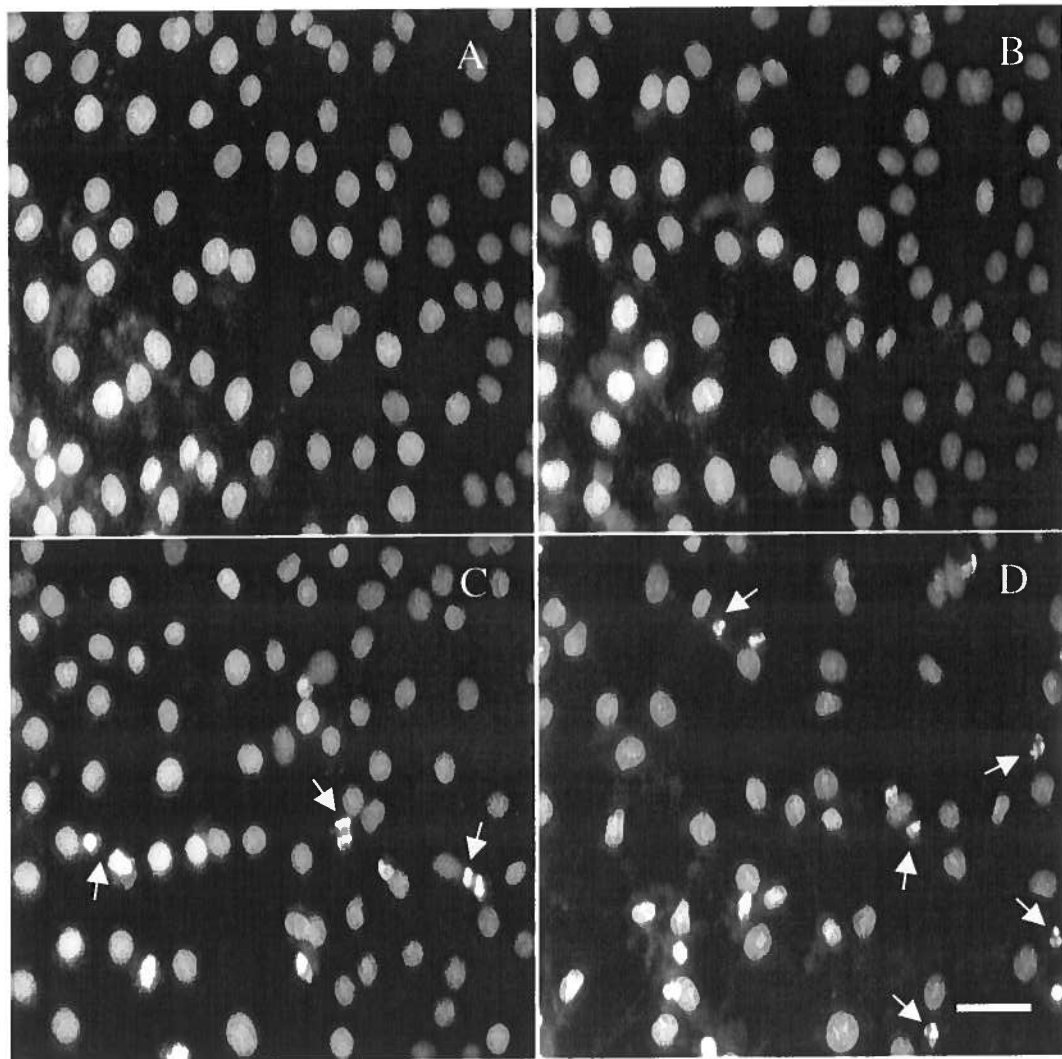


Figure 3.44 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec 25 μ M de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à contraste de phase de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées avec 25 μ M de C2-cér pendant 1 jours (B), 2 jours (C) et 3 jours (D).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées par un milieu de culture avec 10 % sérum additionné de 25 μ M de C2-cér pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, les cellules fixées sont lavées et incubées dans une solution contenant 1 μ g/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min à 37 °C. Les cellules sont examinées et photographiées avec un microscope Olympus à épifluorescence équipé du filtre approprié. Barre: 25 μ m.

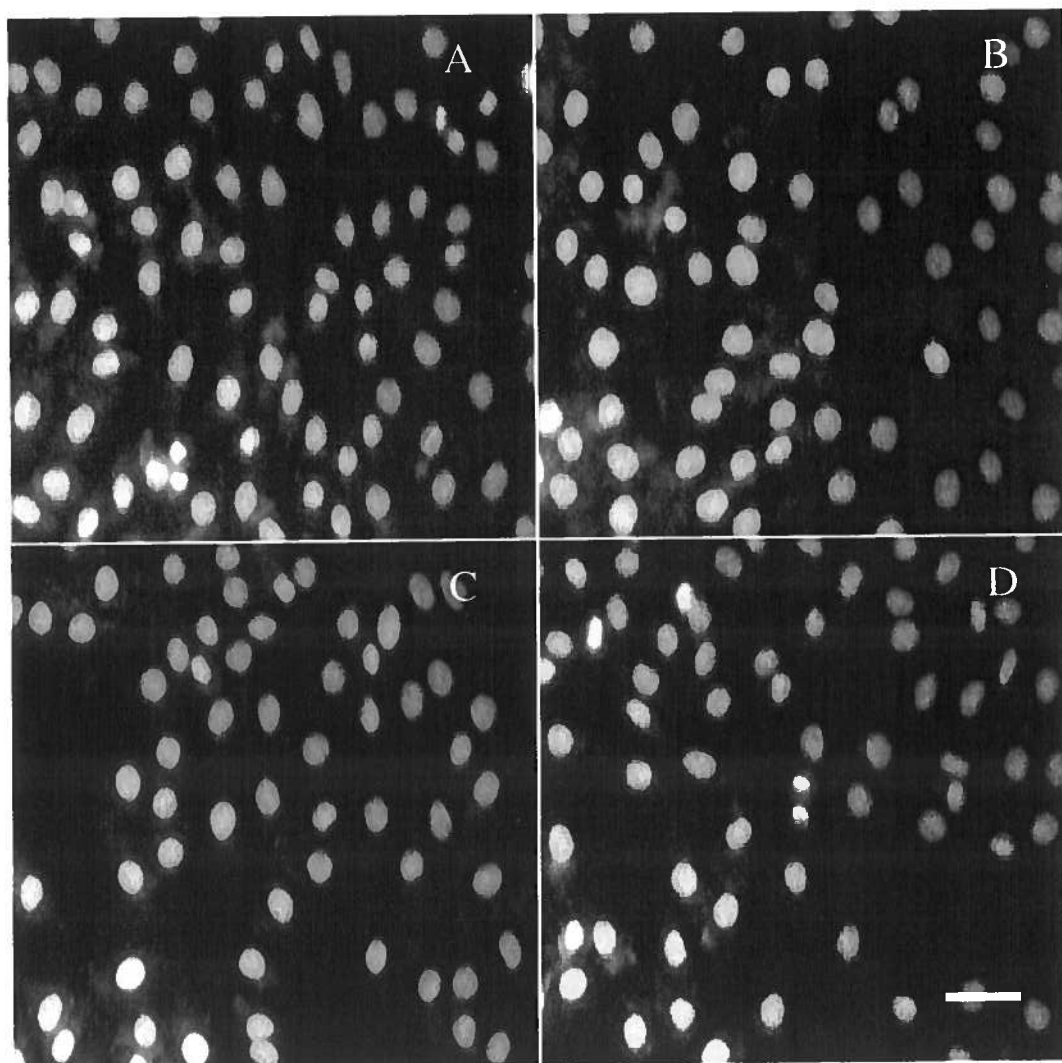
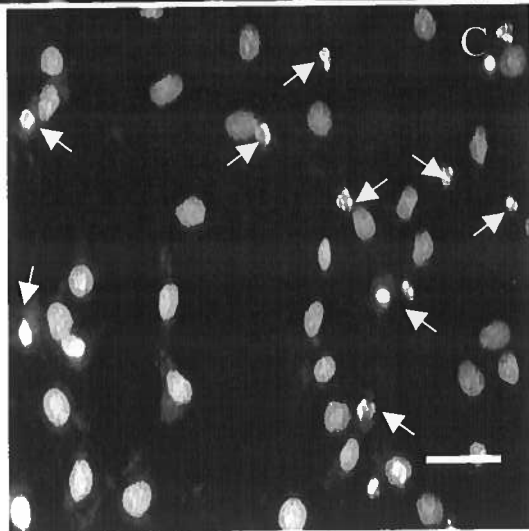
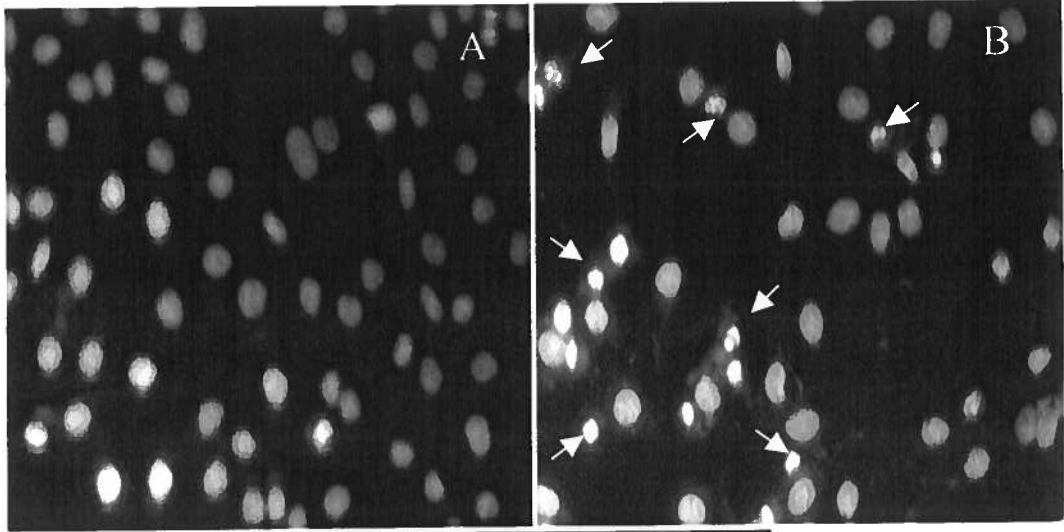


Figure 3.45 Détection de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec 100 μ M de C2-céramide, par exposition au réactif de Hoechst

Examen par microscopie à contraste de phase de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes IMR-32 non traitées (A) et traitées avec 100 μ M de C2-céramide pendant 1 jours (B) et 2 jours (C).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées par un milieu de culture avec 10 % sérum additionné de 100 μ M C2-céramide pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.4). Ensuite, les cellules fixées sont lavées et incubées dans une solution contenant 1 μ g/ml du fluorochrome de Hoechst 33258 dans du PBS pendant 10 min à 37 °C. Les cellules sont examinées et photographiées avec un microscope Olympus à épifluorescence équipé du filtre approprié. Barre: 25 μ m.



de la p38 soit le SB202190 pendant 24 heures afin d'inhiber la kinase correspondante. Ces cellules ont été ensuite traitées par la C2-cér à une concentration de 25 μ M pour 72 heures. La viabilité cellulaire a été mesurée afin de comparer les effets des divers traitements par rapport aux contrôles correspondants.

Ainsi tel qu'illustré dans la Figure 3.46, l'inhibition de ERK1/2 résulte en une diminution de la prolifération de $58 \pm 6.2\%$, celle causé par le C2-cér est de $53 \pm 4.9\%$ alors que la combinaison de Cer-C2 et PD98059 montre un effet additif qui atteint $90 \pm 9.7\%$. Ceci suggère que les céramides et ERK1/2 empruntent deux voies de signalisations différentes pour affecter la taille des populations traitées. Le même effet a été observé en présence du SB202190 (Figure 3.46). Ainsi, la C2-cér ne semble emprunter ni la voie de la ERK1/2 ni celle de la p38 pour induire l'effet observé. Dans le but de déterminer si la PKC est impliquée dans la régulation négative de la prolifération cellulaire induite par la C2-cér et d'identifier les isozymes de PKC responsables. Nous avons pré-incubé les cellules avec un inhibiteur non-spécifique de la PKC soit le Bisindolylmaleimide (Bis) qui inhibe toutes les PKCs mais aussi la PKA et des inhibiteurs plus spécifiques à des groupes d'isozymes des PKCs, soit le Go6983 qui inhibe presque toutes les PKCs (Alpha, Beta, Delta, Epsilon et Zeta) et le Go6976 qui inhibe seulement les PKCs (Alpha, Beta et Mu). Les cellules d'IMR-32 ont été incubées pendant 3 jours avec l'inhibiteur de PKC correspondant ou avec la C2-cér individuellement ou en combinaison et l'effet de ces traitements sur la taille des populations cellulaires est mesuré. Les résultats de la Figure 3.47 montrent que la viabilité des cellules traitées pendant 72 heures avec 25 μ M C2-cér est de $45 \pm 6.4\%$, celles qui sont traitées avec l'inhibiteur non-spécifique Bis présentent une viabilité de $48 \pm 5.2\%$ alors que le traitement combiné de Bis et de C2-cér induit une viabilité presque similaire à celle résultant de l'exposition au Bis seul. Ceci suggère que les voies de signalisations empruntées par la C2-cér et celles inhibées par Bis pourraient avoir un élément commun.

Afin de confirmer si la PKC est associée à l'effet observé, nous avons utilisé des inhibiteurs plus spécifiques des PKCs soit le Go6983 et le Go6976 individuellement ou en combinaison avec la C2-cér. Leur effet sur l'accroissement de la population de cellules

Figure 3.46 Effet d'inhibiteurs des MAP kinases seuls ou en combinaison avec la C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées dans un milieu de culture additionné de 25 μM SB202190 ou de 25 μM PD98059 pendant 24 heures. Un traitement supplémentaire de 25 μM de la C2-cér est ajoutée et le tout est incubé pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite lavées et lysées et un volume de 100 μl d'une solution contenant 4 $\mu\text{g/ml}$ du réactif de Hoechst 33258 dans du PBS est ajouté à chacun des puits et incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.2). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement proportionnelle au nombre de cellules. Le nombre de cellules est calculé à partir de courbes standards. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative entre le traitement individuel et le traitement combiné (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).

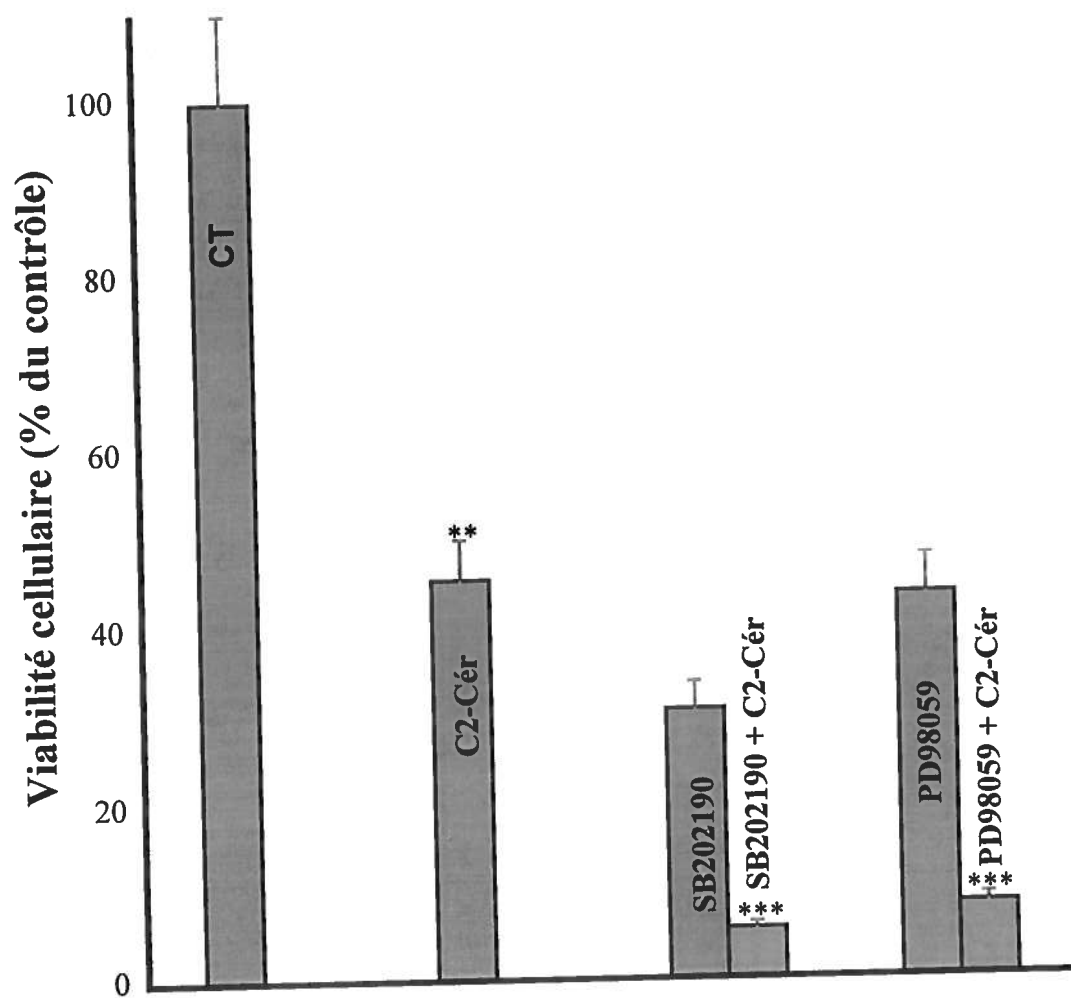
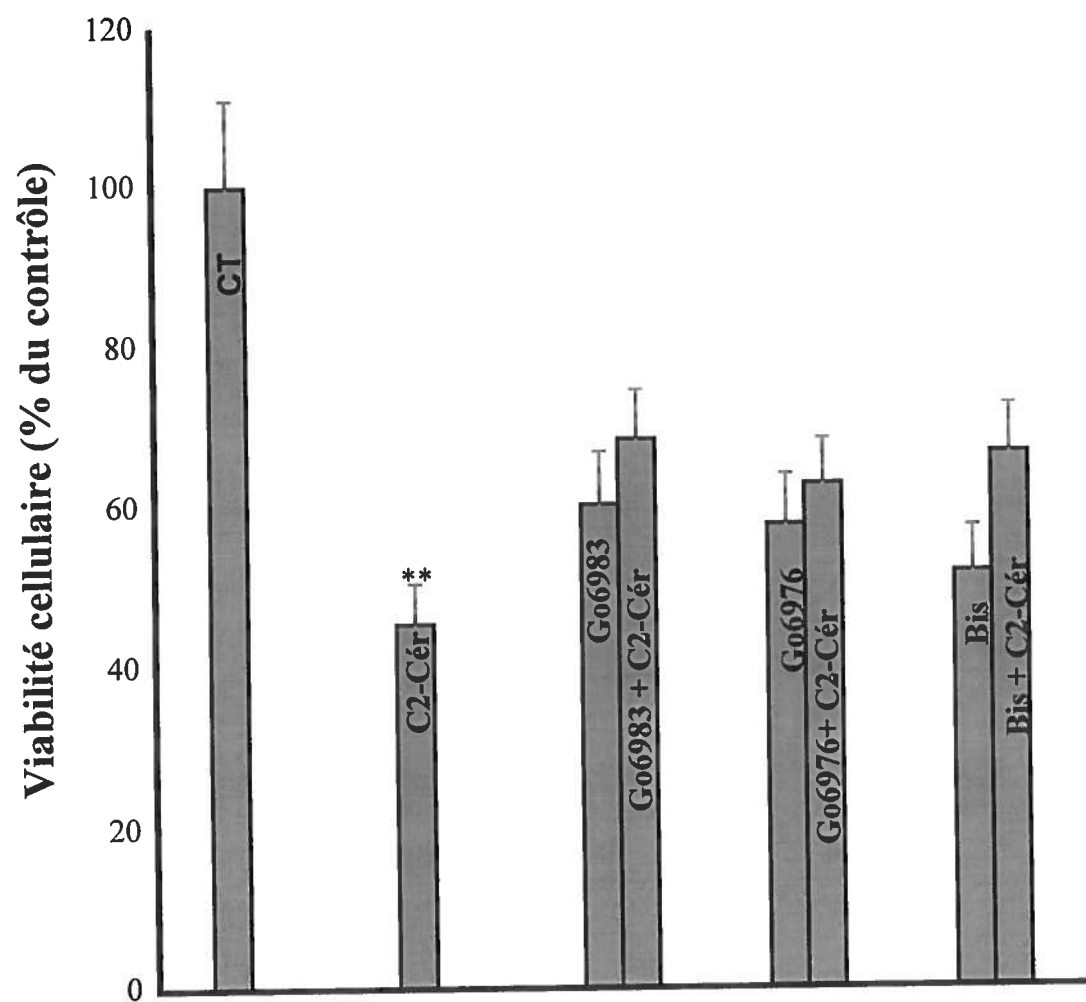


Figure 3.47 Effet des inhibiteurs des PKCs seuls ou en combinaison avec la C2-céramide sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits. 24 heures après, les cellules sont traitées dans un milieu de culture additionné de 1 μM de Go6983; de 140 nM de Go6976 ou de 4 μM de Bis pendant 24 heures. Un traitement supplémentaire de 25 μM de C2-céramide est ajouté et le tout est incubé pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite lavées et lysées et un volume de 100 μl d'une solution contenant 4 $\mu\text{g/ml}$ du réactif de Hoechst 33258 dans du PBS est ajouté à chacun des puits et incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.1.2). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement proportionnelle au nombre de cellules. Le nombre des cellules est calculé à partir de courbe standard. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).



IMR-32 a été mesuré. L'analyse des résultats de la Figure 3.47 a permis de montrer que les effets de la combinaison de ces inhibiteurs avec la C2-cér ne sont pas additifs. Ceci suggère de façon indirecte que la voie de signalisation de la PKC est probablement impliquée dans la régulation négative de la prolifération induite par la C2-Cér et probablement qu'un ou des membre (s) de la classe d'enzymes des cPKCs inhibé (es) par le Go6976 contribue à la modulation de la croissance.

3.8.2.1 Implication de la PKC dans la régulation de la prolifération induite par la céramide

La famille des PKCs est impliquée dans plusieurs processus biologique incluant la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Willaime et al. 2001). L'action des PKCs dépend du type cellulaire, ce qui explique la diversité des isoformes de PKCs (Toker, 1998; Zeidman et al. 1999a).

L'étape suivante a été de rechercher l'implication des isoformes de PKC dans la voie apoptotique déclenchée par la C2-Cér. Afin de déterminer exactement les types d'isoenzymes de PKC impliqués dans la modulation de la croissance induite par C2-cér, nous les avons inhibées individuellement en introduisant dans les cellules un anticorps spécifique de chacune des isoenzymes par la technique de pinocytose tel que décrit dans la partie matériels et méthodes (section 2.6). Nous avons d'abord démontré que l'anticorps anti-PKC Alpha était bien introduit dans les cellules. Pour ce faire, une immunohistochimie montrant la localisation de l'anticorps Anti-PKC Alpha dans le cytoplasme des cellules IMR-32 est présentée dans la Figure 3.48D.

L'effet de l'inhibition de chaque type d'isoenzyme de PKC sur la prolifération cellulaire des IMR-32 a été évalué en parallèle. La Figure 3.49 illustre l'effet de l'inhibition des isoformes de PKC sur la croissance des populations de cellules de neuroblastome IMR-32. Les anticorps de différentes isozymes de PKC soit, les anticorps contre les PKC Alpha, BetaI, BetaII, Epsilon, Mu et Zeta sont introduits individuellement dans les cellules par pinocytose et la viabilité des cellules est mesurée. Les PKC alpha et BetaII semblent avoir un effet de régulation négative sur la prolifération puisque

Figure 3.48 Mise en évidence par immunofluorescence de l'incorporation de l'anticorps anti-PKC Alpha dans les cellules de neuroblastome IMR-32 par la technique d'endocytose

Examen par microscopie à épi-fluorescence des cellules IMR-32 traitées par la technique d'endocytose en absence (A, B) et en présence de l'anticorps anti-PKC Alpha (C, D).

Les cellules sont trypsinisées, comptées et 1×10^6 cellules sont resuspendues dans 30 μl du milieu MEM sans sérum contenant 10 μl d'anticorps anti-PKC Alpha et/ou 20 μl de solution hypertonique composée d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de sucrose, le tout est incubé pendant 12 min à la température de la pièce. Ensuite, les cellules sontensemencées à une densité de 1×10^4 dans du milieu standards. 24 heures après, les cellules sont fixées et exposées à un anticorps secondaire conjugué à la rhodamine tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.6). Les cellules sont montées, examinées avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographiées avec un film kodak ektachrome 400 en contraste de phase (A, C) et en épi-fluorescence (B, D). Barre: 50 μm .

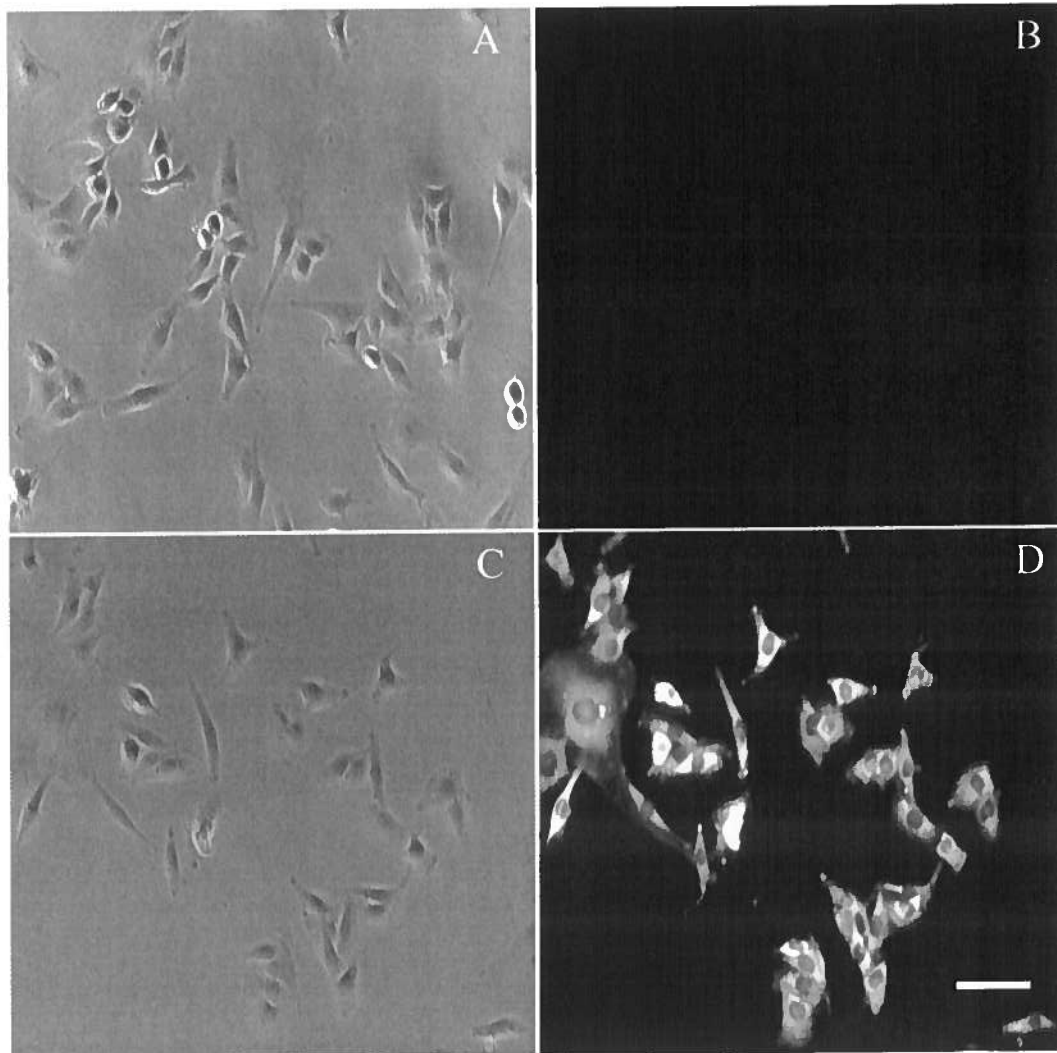
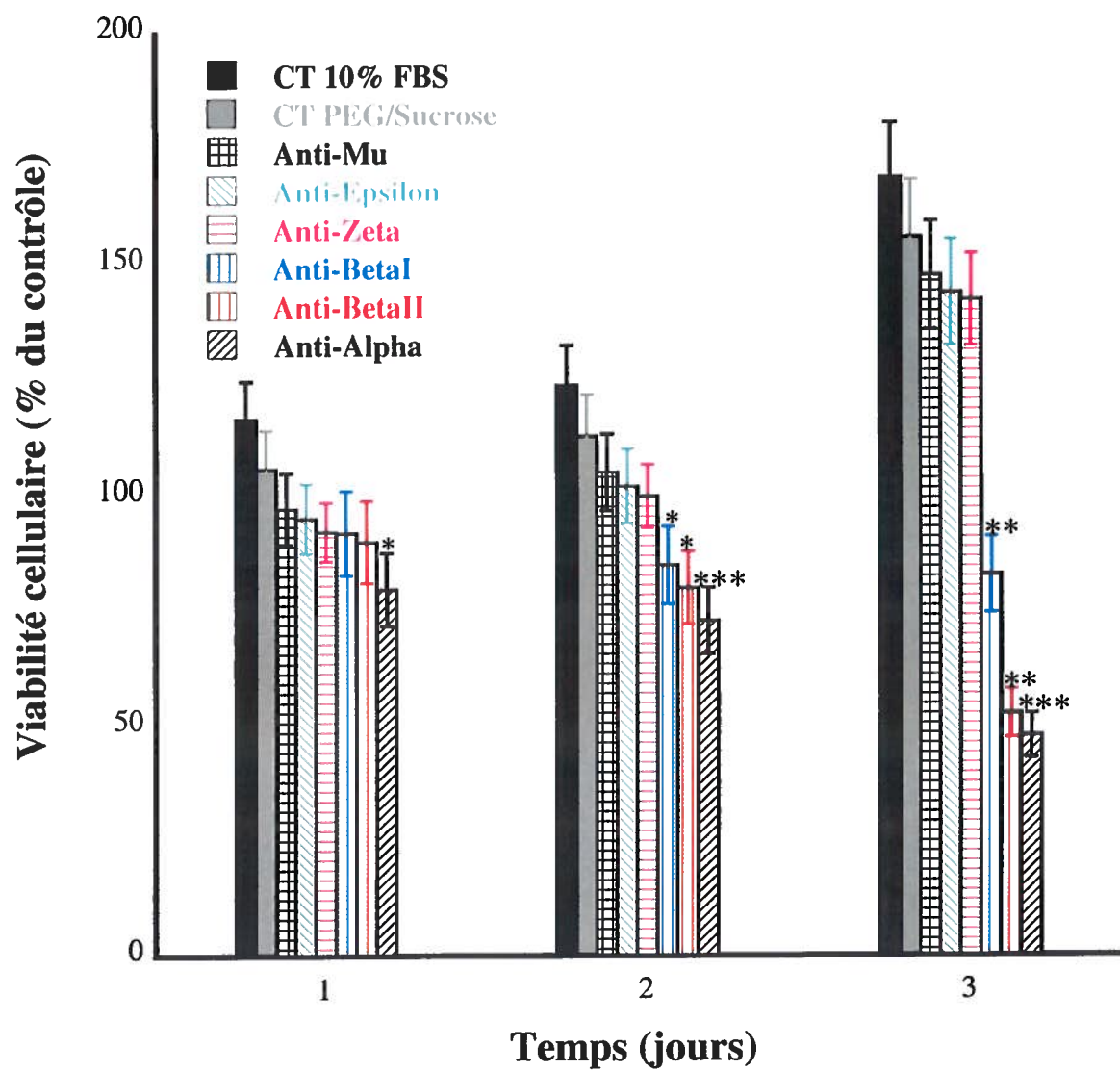


Figure 3.49 Effet de l'inhibition spécifique des isoformes de PKCs sur la viabilité des cellules de neuroblastome IMR-32

Les cellules sont trypsinisées, comptées et 1×10^6 cellules sont remises en suspension dans 30 μ l du milieu MEM sans sérum contenant 10 μ l d'anticorps anti-PKC Alpha et 20 μ l de solution hypertonique composée d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de sucrose, le tout est incubé pendant 12 min à la température de la pièce selon les instructions du vendeur. Les cellules sontensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits et incubées dans du milieu standard pendant 1 à 3 jours. Les cellules sont ensuite lavées et lysées et un volume de 100 μ l d'une solution contenant 4 μ g/ml du réactif de Hoechst 33258 dans du PBS est ajouté à chacun des puits et incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.2.1). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement au nombre de cellules. Le nombre des cellules est calculé à partir d'une courbe standard. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative par rapport au contrôle (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$).



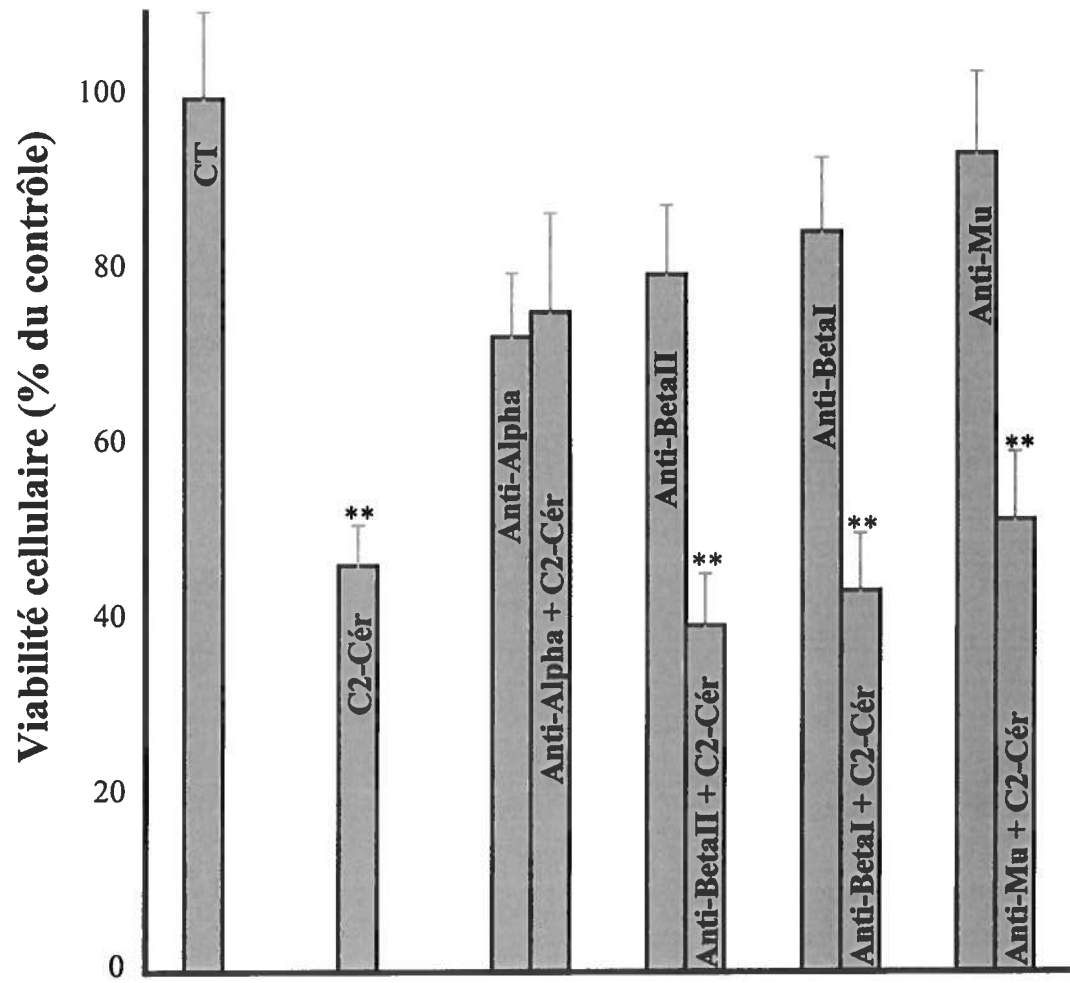
l'inhibition de la PKC Alpha ou de la PKC BetaII réduit la prolifération cellulaire de $28 \pm 6.2\%$ après deux jours et de $50 \pm 5.3\%$ après 3 jours de culture par comparaison avec les cellules contrôles soumises à la pinocytose sans introduction d'anticorps ($p < 0.001$; $n=3$) (Figure 3.49). Par contre, l'inhibition de la PKC BetaI a un effet moindre sur la régulation négative de la prolifération cellulaire. En effet, l'inhibition de la PKC BetaI induit une réduction de la prolifération cellulaire de l'ordre de $10 \pm 1.5\%$ seulement après 2 jours et de $15 \pm 2.3\%$ après 3 jours de culture cellulaire. L'introduction des anticorps de PKC Mu, Zêta ou Epsilon ne semble pas affecter la prolifération cellulaire des IMR-32 puisque la croissance des cellules contenant ces anticorps est comparable à celle du contrôle (Figure 3.49).

3.8.2.1.1 Implication de la PKC Alpha dans la régulation de la prolifération induite par la céramide

Une pré-incubation de 24 heures des cellules IMR-32 en présence de Go6976 qui inhibe les PKC Alpha, Beta et Mu (Figure 3.47) semblent limiter la croissance cellulaire causée par le traitement avec le C2-cér. Nous avons vérifié si ces cellules répondent de la même façon à une pré-inhibition individuelle de 24 heures de chaque isoforme de PKC avant l'addition au milieu de culture de $25 \mu\text{M}$ de C2-cér. Pour cette étude, les cellules dans lesquels des anticorps anti-PKC sont introduite individuellement, sont incubées en présence de $25 \mu\text{M}$ de C2-Cér durant 2 jours et leur viabilité est mesurée. Les résultats de la Figure 3.50 montrent que les cellules d'IMR-32 où l'isoforme de PKC Alpha est inactivée, ne répondent plus au C2-cér par une régulation négative supplémentaire de la croissance cellulaire. Par contre, l'inactivation de la PKC BetaII qui montre un effet négatif sur la prolifération cellulaire ne paraît pas impliquée dans la voie des céramides puisque le traitement par le C2-cér après inactivation de BetaII a un effet additif ($p < 0.001$; $n=3$) sur la viabilité des cellules d'IMR-32 suggérant l'indépendance des deux voies. De plus, les isoformes de PKC BetaI, Epsilon, Mu et Zeta, ne semblent jouer aucun rôle dans l'arrêt de prolifération induit par la C2-cér. En effet, le traitement par le C2-cér après inactivation de chacune de ces isoformes de PKCs (BetaI, Epsilon, Mu et Zeta) à un effet additif sur le contrôle de la prolifération cellulaire (Figure 3.50).

Figure 3.50 Identification des isoformes de PKCs impliquées dans la modulation de la croissance induite par l'exposition des cellules de neuroblastome IMR-32 à la C-2-céramide

Les cellules sont trypsinisées, comptées et 1×10^6 cellules sont remises en suspension dans 30 μ l du milieu MEM sans sérum contenant 10 μ l d'anticorps anti-PKC Alpha, BetaI, BetaII, Mu et 20 μ l de solution hypertonique composée d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de sucrose, le tout est incubé pendant 12 min à la température de la pièce. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans du milieu standard etensemencées à une densité de 2×10^3 dans des plaques de 96 puits. 24 heures après, les cellules sont traitées avec un milieu contenant 25 μ M de C2-céramide. Après 48 heures d'incubation à 37 °C, les cellules sont lysées et un volume de 100 μ l d'une solution de 4 μ g/ml du réactif de Hoechst 33258 est ajoutée à chacun des puits de la plaque et le tout est incubé pendant 5 min à 37 °C tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.6). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde suivantes: excitation 355 nm et émission 460 nm. L'intensité de fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN et donc indirectement au nombre de cellules. Le nombre des cellules est calculé à partir d'une courbe standard. Les données représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences faites en triplicata. Astérisque: différence significative entre le traitement individuel et le traitement combiné (** = $p < 0.001$).



3.9 Les céramides et les jonctions intercellulaires de type gap

Pour examiner le rôle des céramides sur les JICGs dans les cellules IMR-32, les cellules sont incubées en présence de l'analogue synthétique perméable de la céramide (C2-cér). Le C2-cér mimique l'élévation de la céramide endogène (Tavarani et al. 2000). L'effet de C2-cér sur les JICGs a été vérifié au niveau de l'expression de la Cx43, au niveau de sa phosphorylation et finalement, au niveau de la perméabilité des canaux de type gap.

La Figure 3.51, montre le profil d'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées et traitées par une concentration finale de 25 μ M et 100 μ M de C2-céramide respectivement. Nous avons observé que le niveau d'expression et de phosphorylation de la Cx43 est indépendant de la concentration de C2-Cér utilisée. En effet, ni la concentration de C2-Cér qui induit l'arrêt de la prolifération (25 μ M) ni celle qui induit l'apoptose (100 μ M) n'affecte le niveau d'expression et de phosphorylation de la Cx43 après 24 heures de traitement (Figure 3.51). L'analyse des densitogrammes correspondants montre des profils d'expression presque similaires (Figure 3.51B). Afin de distinguer, si l'induction de l'apoptose ou la diminution de la prolifération par la C2-céramide est associée à une modulation de la perméabilité des jonctions intercellulaires de type gap, nous avons utilisé la technique du chargement par grattage : "Scrape Loading". Le chargement du colorant jaune de Lucifer par incision des cellules non traitées (CT) et traitées avec 25 μ M et 100 μ M de C2-Cér, a montré un effet proportionnel. En effet, la distribution de colorant se fait de la même manière dans les cellules témoins que dans les cellules traitées et cela quelle que soit la concentration utilisée (Figure 3.52A, B, C).

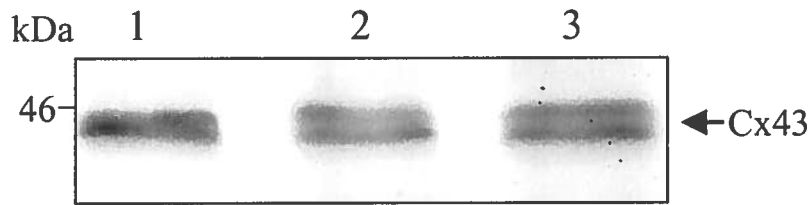
Figure 3.51 Effet de doses croissantes de C2-céramide sur le profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome IMR-32

(A) Immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules IMR-32 traitées par des doses croissantes de C2-cér, (B) profils densitométriques correspondants.

Détection de l'expression de la Cx43 dans les cellules IMR-32 non traitées (1) et traitées pendant 24 heures avec 25 μM en (2) et 100 μM de C2-cér en (3).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^5 par 100 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées dans un milieu de culture additionné de 25 μM ou de 100 μM de C2-cér. Ensuite, les cellules sont lysées et 25 μg de protéines totales obtenues sont séparées par électrophorèse dénaturante puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Cx43 et détectées par un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.7). Les profils densitométriques sont réalisés en utilisant le software Image Pro.

A



B

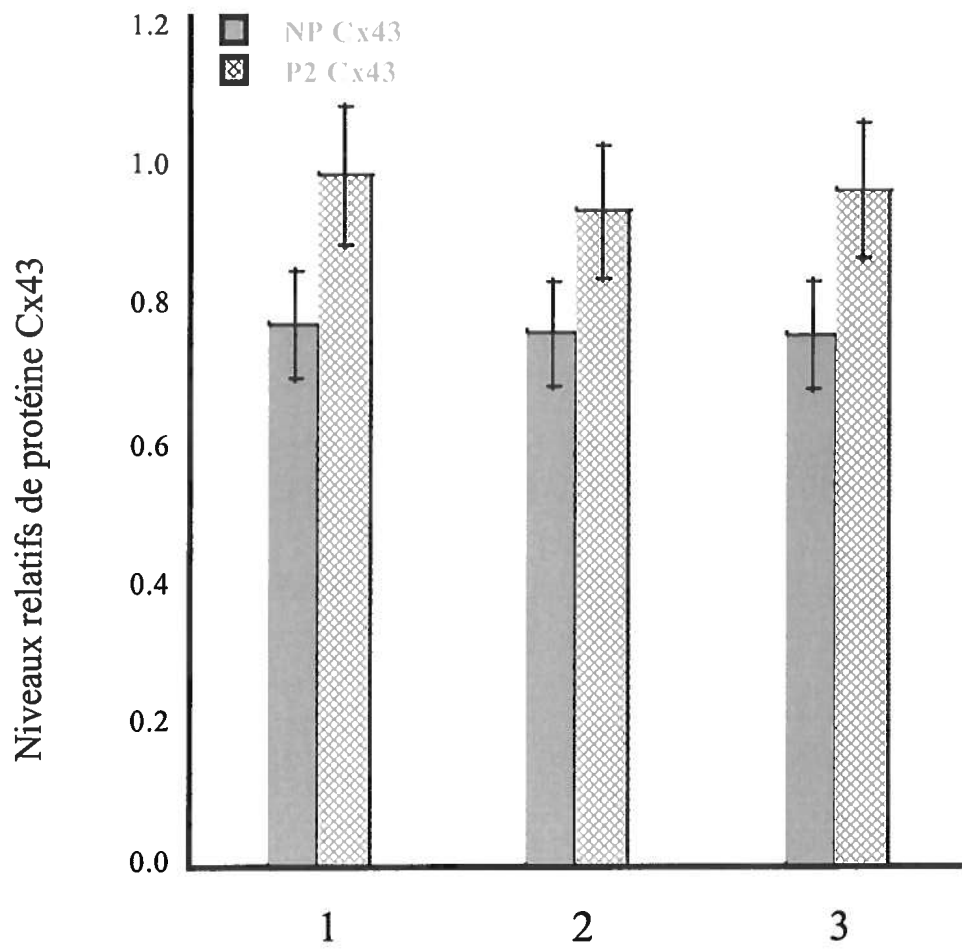
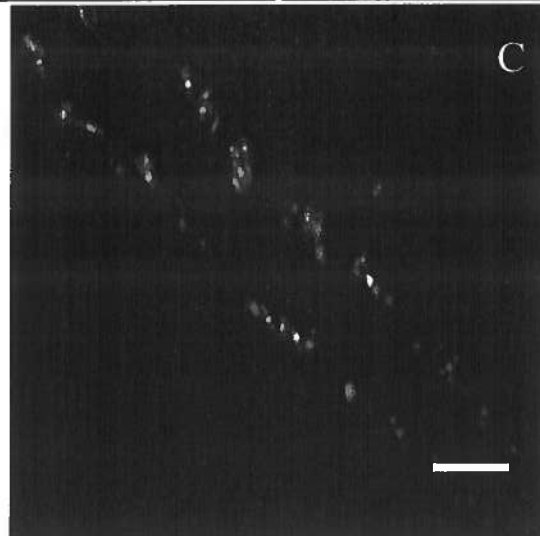
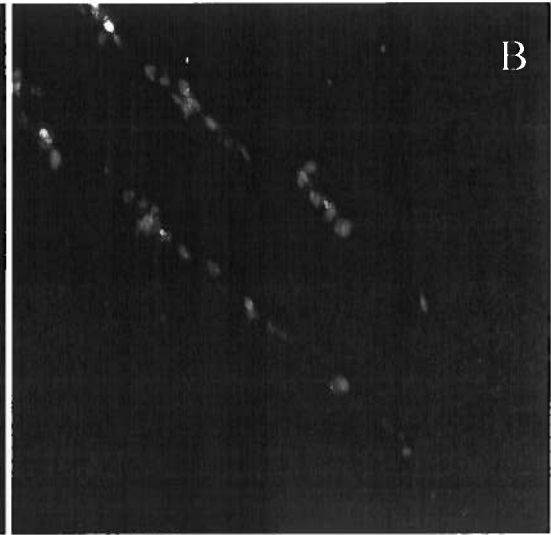
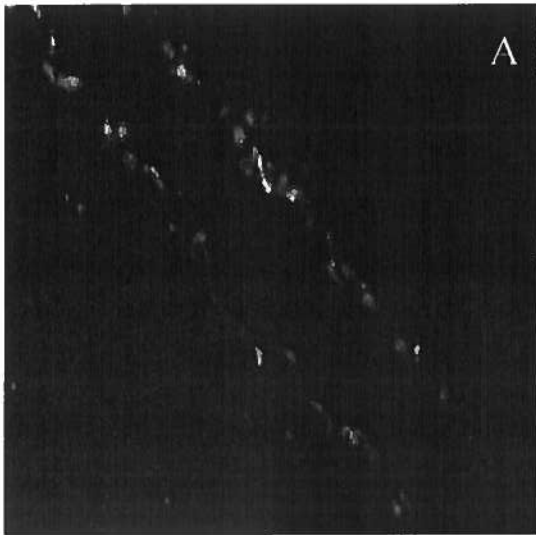


Figure 3.52 Effet de doses croissantes de C2-céramide sur la communication intercellulaire dans les cellules de neuroblastome IMR-32

L'évaluation de la communication intercellulaire des cellules IMR-32 non traitées (A) et traitées pendant 24 heures avec 25 μ M (B) et 100 μ M de C2-cér (C).

Les cellules IMR-32 sontensemencées à une densité de 1×10^4 par 20 mm^2 dans des conditions standards. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées dans un milieu de culture additionné de 25 μ M ou de 100 μ M C2-cér pendant 24 heures. Les cultures cellulaires sont lavées et lésées par une entaille et exposées pendant 10 min à une solution de 0.5 % de jaune de Lucifer dans du PBS. Après lavages au PBS, les cellules sont fixées avec une solution à 4 % paraphormaldéhyde dans du PBS pendant 20 min, lavées et montées dans un milieu de montage. L'ensemble est examiné avec un microscope Nikon équipé du filtre approprié et photographié en épi-fluorescence avec un film kodak ektatachrome 400 tel que décrit dans matériels et méthodes (section 2.5). Barre: 25 μ m.



4. DISCUSSION

4.1 Les JICGs dans les neuroblastomes

Les cellules de neuroblastome humain IMR-32 présentent non seulement une déficience des jonctions intercellulaires de type gap, mais expriment en outre une connexine, la Cx43 caractéristique de l'état embryonnaire des neurones (Figures 3.1 et 3.2). La Cx43 se trouve dans toutes les souches embryonnaires dérivées de la crête neurale (Makarenkova et al. 1999; Lo et al. 1997) tel que démontré dans les neuroblastes, cellules souches, d'où dérivent les neuroblastomes (Lo et al. 1997; LoTurco et al. 1991). Cependant, la Cx43 est absente dans les cellules neuronales adultes du système nerveux périphérique (Bruzzone et al. 1997). Le patron d'expression de la Cx43 varie durant le développement normal du système nerveux périphérique (Bruzzone et al. 1997), elle est exprimée au début du développement embryonnaire où elle permet la communication cellulaire à travers les JICGs avant la formation des synapses (Nadarajah et al. 1997; 1999). La Cx26 est aussi présente durant les premiers stades embryonnaires et continue d'assurer la communication cellulaire entre les cellules neurales et les cellules de soutien telles que les cellules de Schwann et les cellules gliales (Rozental et al. 1998). La Cx43 disparaît à la naissance et elle est remplacé par la Cx32 dans les neurones de souris (Bruzzone et al. 1997). Dans nos expériences, le fait que les cellules IMR-32 expriment seulement la Cx43, tend à démontrer que ces cellules sont probablement bloquées au cours de leurs développement embryonnaires et n'ont pas pu progresser dans leur différenciation.

D'après la littérature, les JICGs sont fonctionnelles chez les neuroblastes durant les premiers stades embryonnaires (LoTurco et al. 1991). Les cellules de neuroblastome IMR-32 par contre, présentent une perméabilité cellulaire très réduite tel que démontré par la technique du chargement par grattage du colorant jaune de Lucifer (Figure 3.2). Par contre, la perte du couplage cellulaire à travers les JICGs est une caractéristique commune des cellules transformées qui ont perdu le contrôle de la prolifération et les mécanismes du maintien de la différenciation cellulaire tel est le cas dans les cellules rénales et ovariennes tumorales où les JICGs sont déficientes (Hanna et al. 1999; Noguchi et al. 1999).

La communication cellulaire est régulée à plusieurs niveaux: la transcription du gène de la Cx, l'assemblage des Cxs en connexons, le transfert des Cxs du cytoplasme à la membrane plasmique, l'assemblage de connexons en canaux jonctionnels, la perméabilité du canal jonctionnel, le désassemblage des JICGs et la dégradation des connexines par voie protéosomique ou lysosomique (Laird et al. 1996; Laird et al. 1995, Lampe et al. 2000). Les études d'immunolocalisation nous ont montré une localisation aberrante de la Cx43 au niveau cytoplasmique (Figure 3.3). En effet, la Cx43 est présente non pas au niveau de la membrane plasmique, comme c'est le cas dans les cellules normales, mais au niveau du cytoplasme plus particulièrement au niveau péri-nucléaire séquestrée dans le réticulum endoplasmique ou encore dans l'appareil de Golgi. Cette même localisation aberrante des Cxs et l'altération des JICGs à été confirmée dans une autre lignée de neuroblastme humain SH-SY5Y (Belbaraka, 2002). Plusieurs autres phénotypes de cellules transformées ont montré une localisation aberrante des Cxs, citons l'exemple des cellules ovariennes et rénales (Hanna et al. 1999; Noguchi et al. 1999; Hossein et al. 1999).

Dans ce travail, nous avons démontré que la Cx43 est présente sous ses formes phosphorylées P1 et P2 (Figure 3.1A). Cependant, les kinases responsables de ces phosphorylations restent inconnues. La phosphorylation est le principal mécanisme post-traductionnel de régulation des communications cellulaires (Musil et al. 2000; Lampe et al. 2000). Toutes les connexines peuvent être phosphorylées exceptée la Cx26 (Saez et al. 1990). La phosphorylation contrôle différentes étapes de la formation et de la fonction des canaux tel que la translocation de la Cx de l'appareil de Golgi à la membrane. Laird et al. (1995) ont trouvé que la Cx43 traverse l'appareil de Golgi et ont suggéré que la première phosphorylation conditionne l'assemblage des connexines en connexons dans l'appareil de Golgi. En utilisant certains inhibiteurs du trafic protéique Musil et al. (1993) concluent que l'oligomérisation de la Cx43 en connexons se produit après son départ du réticulum endoplasmique. Le mécanisme par lequel les connexons sont délivrés à la membrane plasmique reste inconnu (Guerrier et al. 1995; Laird et al. 1996). Pour la Cx43, plusieurs étapes impliquant la phosphorylation sont connues: l'assemblage des

connexines en connexons, le transfert des Cxs du cytoplasme vers la membrane plasmique, le contrôle de la perméabilité du canal après la localisation des connexons à la surface cellulaire et finalement la dégradation des connexines par protéosome ou lysosome (Laird et al. 1996; Musil et al. 1991; Musil et al. 2000; Warn-Cramer et al. 1998; 2001).

4.2 Les jonctions intercellulaires de type gap et la différenciation cellulaire

Les JICGs jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'équilibre entre la prolifération et de la différenciation cellulaire d'un tissu ou d'un organe. Cet équilibre est rompu dans les cellules tumorales, la prolifération cellulaire aboutit à la formation d'une tumeur et ne s'accompagne pas d'un processus de différenciation compatible avec la fonction du tissu d'origine (Omori et al. 2001; Lampe et al. 2000). La progression et le maintien de l'état de différenciation cellulaire et la fonction des communications cellulaires sont des processus interdépendants (Phipps et al. 1997). Les neuroblastomes qui conservent intacts leurs systèmes inducteurs de différenciation constituent un modèle de choix. Comme les connexines sont des éléments importants de ce processus, nous avons étudié leur comportement au cours de la différenciation des cellules IMR-32.

4.2.1 Induction et caractérisation de la différenciation chez la lignée de neuroblastome IMR-32

Le NB dérive de cellules de la crête neurale immature (Chambery et al. 2000). Ces cellules peuvent être induites à se différencier *in vitro* (Cooper et al. 1991) et *in vivo* (Castleberry et al. 1997; Black et al. 1999). La différenciation neuronale est mesurée en se basant sur quatre critères principaux. 1) le critère de la différenciation morphologique, évalué par l'extension des neurites, 2) la régulation négative de la prolifération cellulaire, 3) le critère de la différenciation moléculaire caractérisée par l'expression des marqueurs de différenciation neuronaux et finalement 4) la sortie finale du cycle cellulaire, un critère qui n'est pas souvent utilisé lors des études de la différenciation cellulaire (Chambery et al. 2000).

Plusieurs modèles ont été utilisés pour étudier la différenciation neuronale dans le PNS, ceux-ci incluent des cellules moins agressives, comme celles de la lignée SH-SY5Y issue d'un neuroblastome humain, les cellules de rat PC-12, un modèle de neurone sympathique adrénergique (Farooqui, 1994; Boglari et al. 2001; Castillo et al. 2001) et les cellules murines P19, des cellules de carcinomes embryonnaires qui lorsque traitées avec l'acide rétinoïque donne naissance à des neurones et des cellules gliales (McBurney et al. 1993a; Armour et al. 1999). Les cellules d'IMR-32 représentent un autre type de neuroblastomes humain, plus agressif puisqu'elles ont 25 copies de l'oncogène N-myc et le récepteur de facteur de croissance NGF défectueux (O'Neill et al. 2001, Brodeur et al. 1997a). Elles présentent donc un autre modèle de différenciation cellulaire. L'induction de la différenciation dans cette lignée est basée sur le traitement avec le tRA et le 8-Br-cAMP. Contrairement aux cellules SH-SY5Y et PC-12 dont la différenciation est basée sur l'activation du récepteur du facteur de croissance neuronale (Castillo et al. 2001; Macleod et al. 2001).

4.2.1.1 Effet de la différenciation cellulaire sur la croissance cellulaire

Les cellules d'IMR-32 ont été induites à se différencier en utilisant soit un analogue de la cyclique AMP (8-Br-cAMP), soit l'acide tout *trans* rétinoïque (tRA) soit les deux en combinaison (8-Br-cAMP et tRA) (Figure 3.4). Le tRA est un produit naturel dérivé de la vitamine A qui joue un rôle primordial durant le développement embryonnaire (Morris-Kay et al. 1999). Il a été utilisé en clinique dans le traitement des neuroblastomes et d'autres cancers tel que la leucémie (Reynold, 2000).

Les résultats des Figures 3.4 et 3.5 montrent que le traitement des cellules IMR-32 par le tRA pendant 7 jours a pour effet de ralentir la prolifération cellulaire avec émission de quelques neurites. Cette observation est confirmée par les résultats de la Figure 3.11 qui montrent une diminution de l'expression du PCNA, donc de la prolifération cellulaire. Il a été rapporté que le tRA agit sur les neuroblastomes soit en induisant l'arrêt de la prolifération accompagné d'une émission de neurites *in vitro* ou encore en induisant l'apoptose et la mort cellulaire (Giannini et al. 1997a). L'acide

rétinoïque dans ces formes *trans* et *cis* induit aussi la différenciation cellulaire des cellules P19 (McBurney et al. 1993b; Armour et al. 1999) ainsi que dans d'autres types de neuroblastomes humain incluant les cellules SH-SY5Y et LAN-5 (Lovat et al. 1994; Grummer et al. 2000a; Seidenfaden et al. 2001). De plus, l'isomère *cis* a plus d'effet sur la régulation négative de la prolifération que son isomère *trans* dans ces cellules (Redfern et al. 1994; 1995). Cependant, cet isomère se montre plus toxique dans le traitement des neuroblastomes (Lovat et al. 2001).

L'acide rétinoïque exerce en général son effet en se liant à ses récepteurs nucléaires et en modulant ainsi l'expression génique des molécules clés du cycle cellulaire (Grummer et al. 2000a; Seidenfaden et al. 2001). En effet, les récepteurs de l'acide rétinoïque fonctionnent en dimères et modulent l'activité transcriptionnelle en interagissant avec la séquence d'ADN qui contient les éléments de réponse de l'acide rétinoïque (Niles, 2000). Les différents isomères ont des affinités différentes avec leur récepteurs, alors que le RAR se lie spécifiquement avec le tRA et le cRA, RXR a de l'affinité juste avec le cRA (Redfern, 1995). Dans les cellules LAN-5, le cRA peut induire la différenciation et l'apoptose (Han et al. 1995). La réponse des cellules au tRA dépend du type de cellules et des conditions de traitement (Armour et al. 1999; Lovat et al. 2001). Cependant, dans la plupart des cellules, le tRA agit en bloquant la progression du cycle cellulaire dans la phase G1 en modulant l'expression des protéines régulant le cycle cellulaire (Armour et al. 1999). Dans les cellules de neuroblastome humaine SH-SY5Y, le traitement avec l'acide rétinoïque induit une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline (CDK) p27 sans affecter la p21 (Matsuo et al. 1998). Dans un autre type de cellules, les cellules épithéliales, l'acide rétinoïque induit un arrêt de la croissance cellulaire en réduisant le niveau de la cycline D1 au niveau protéique et non pas au niveau messager. Ce phénomène est dû à une induction de la dégradation de la cycline D1 par un système protéomique (Lagenfeld et al. 1997).

Le traitement des cellules de neuroblastome IMR-32 avec le 8-Br-cAMP entraîne aussi une extension des neurites, une diminution de la prolifération et une expression de marqueurs neuronaux de différenciation (Figures 3.4, 3.5 et 3.11). Le 8-Br-cAMP est un

analogue de cAMP qui est perméable à la membrane. Le 8-Br-cAMP active la PKA dont l'unité régulatrice à son tour active la transcription de gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et dans la différenciation (Thorin-Trescases et al. 2001). Les cellules traitées avec le 8-Br-cAMP montrent une diminution de la prolifération de presque 50 % lorsque comparée au contrôle et une diminution d'environ 75 % de l'expression de PCNA (Figures 3.5 et 3.11).

Il est connu que le 8-Br-cAMP active la PKA en induisant l'expression différentielle des isoformes de PKA qui régulent la prolifération cellulaire (Cho-Chung et al. 2000; Thorin-Trescases et al. 2001). Une augmentation de l'expression de l'unité régulatrice RI de la PKA est associée à la transformation cellulaire et à l'activation de la prolifération alors que la stimulation de l'expression de l'unité régulatrice RII est associée à l'inhibition de la croissance cellulaire et à la différenciation (Kim et al. 2000a; 2000b). Le 8-Br-cAMP et le dibutyryl-cAMP se sont montrés responsables de l'arrêt de la prolifération et l'activation de la différenciation dans plusieurs cellules de neuroblastomes (Prasad et al. 1994; Yokozaki et al. 1992). En général, le 8-Br-cAMP arrête la croissance de plusieurs autres lignées selon au moins deux mécanismes. Premièrement, le 8-Br-cAMP induit une diminution de l'expression de la cycline D1 qui est associée normalement avec la kinase dépendante de la cycline 4/6 (CDK4, CDK6) (Trosko et al. 1998a). Deuxièmement, le 8-Br-cAMP augmente l'expression de l'inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines, p27 (Kato, 1999) ainsi que son accumulation intracellulaire (Shen et al. 2000). De plus, l'augmentation de la cAMP intracellulaire dans les cellules néoplasiques induit l'arrêt de la croissance cellulaire à travers une activation de la p27 ou encore une diminution de la cycline D1 (Trosko et al. 1998b). Le 8-Br-cAMP peut aussi induire une accumulation de la cycline B1 (Kurokawa et al. 1998).

L'étude de la combinaison du 8-Br-cAMP et du tRA sur l'induction de la différenciation des cellules de neuroblastomes IMR32 a montré un effet synergique sur la régulation négative de la croissance cellulaire (Figures 3.5 et 3.11). Ce phénomène peut être expliqué par une activation de deux mécanismes impliquant un effet additif du 8-Br-cAMP et du tRA sur l'arrêt de la prolifération. En effet, le tRA et le 8-Br-cAMP ont tous

les deux étés reconnus comme modulateurs des protéines clés du cycle cellulaire à travers la régulation de l'expression des cyclines et des kinases CDKs (Niles et al. 2000; Kato, 1999).

4.2.1.2 Effet de la différenciation cellulaire sur la morphologie cellulaire et moléculaire

Après avoir démontré que le traitement des cellules IMR-32 par le tRA, le 8-Br-cAMP et surtout la combinaison des deux induit une diminution de la prolifération cellulaire, nous avons vérifié si cette limitation de division cellulaire s'accompagne de la différenciation morphologique.

Les cellules traitées avec une combinaison de tRA et de 8-Br-cAMP montrent une différenciation morphologique plus avancée avec formation de neurites et une apparition d'un phénotype neuronale lorsque comparées avec celles traitées pendant 7 jours avec le 8-Br-cAMP ou le tRA seul (Figure 3.4). En effet, la morphologie étoilée et la présence de neurites assurant la connexion des cellules apporte une preuve de la différenciation morphologique des cellules de neuroblastomes IMR-32 en neurones (Figure 3.4). La formation des neurites est un phénomène réversible tant que les cellules n'ont pas définitivement quitté le cycle de division cellulaire (Gomez et al. 1998).

Des études ont montré que le 8-Br-cAMP provoque une réorganisation du cytosquelette dans plusieurs lignées cellulaires tel que les fibroblastes de souris, les cellules leucémiques humaines et les cellules issues des lignées de neuroblastome humain SH-SY5Y et SK-NSH (Mena et al. 1995; Galderisi et al. 1999c; Girgert et al. 2000). Dans les cellules neurales, la 8-Br-cAMP exerce un contrôle sur l'initiation de neurites (Mena et al. 1995). En effet, dans les cellules PC-12, le traitement par la cAMP induit l'initiation de la formation des neurites, impliquant une réorganisation du cytosquelette qui est indépendant de la synthèse de l'ARN et de la synthèse de nouvelles protéines (Weisenhorn et al. 1999; Boss et al. 2001; Waltereit et al. 2001).

L'acide rétinoïque induit la formation des neurites chez certains types de cellules de neuroblastomes. Le mécanisme est encore mal élucidé (Reynolds, 2000a). Morphologiquement, le tRA a des effets différents sur les cellules de neuroblastomes selon leurs types. En général, le traitement des cellules de type N avec le tRA induit l'élongation des processus neuronaux incluant les axons et les dendrites (Gudas et al. 1994) alors que les cellules de type S perdent leur adhérence et deviennent apoptotiques (Rozzo et al. 1997). Les cellules d'IMR-32 sont de types I (intermédiaire) qui est un mélange des cellules de type S et de type N.

Nous avons aussi noté (Figure 3.4) que la combinaison du 8-Br-cAMP avec le tRA a un effet additif sur l'émission des neurites et l'expression des marqueurs de différenciation lorsque comparée avec les traitements individuels. Ceci est probablement dû à l'effet synergique exercé par ces deux composés sur l'induction de la différenciation. La combinaison de 8-Br-cAMP et du tRA a un effet sur la diminution de la résistance au tRA observée dans les cellules d'IMR-32 (Carystinos et al. 2001).

4.2.1.3 Effet de l'induction de la différenciation sur l'expression des marqueurs neuronaux

L'élongation des neurites et la diminution de la croissance cellulaire observées lors du traitement des cellules de neuroblastomes IMR-32 par une combinaison de 8-Br-cAMP et de tRA peuvent être considérées comme des preuves de la différenciation morphologique de ces cellules (Figure 3.4). Toutefois, il était nécessaire de confirmer le progrès dans le programme de différenciation par la mesure de l'expression des marqueurs neuronaux spécifiques comme: les neurofilaments, l'énolase spécifique des neurones, l'acétylcholinestérase, la toxine tétanique et la tyrosine hydroxylase.

D'après les résultats obtenus par cytométrie de flux et immunobuvardage (Figures 3.6 et 3.7), l'expression des neurofilaments 200 et 68 est optimale lorsque les cellules IMR-32 sont traitées avec la combinaison de 8-Br-cAMP et tRA. Les neurofilaments sont des protéines du cytosquelette exprimées dans les cellules neurales. Il y a trois différents types de neurofilaments qui diffèrent par leurs poids moléculaires et leur expression au

cours de la différenciation, les NF 200, les NF 145 et les NF 68. Contrairement aux cellules de neuroblastomes IMR-32 qui expriment les neurofilaments en petite quantité, à cause de leur origine maligne à caractère embryonnaire, les neurones normaux expriment davantage de protéines de neurofilaments. L'augmentation du profil d'expression du neurofilament 200 dans les cellules IMR-32 différenciées par la combinaison de 8-Br-cAMP et de tRA est caractéristique de l'évolution des neurites en axones (Galdersi et al. 1999; Girgert et al. 2000). Il est connu que le traitement par le tRA induit l'expression des molécules N-CAM (Shapiro et al. 1997; Gubkina et al. 2001). Des molécules d'adhésion présentes dans le cytosquelette des cellules d'origines neuronales. Ces protéines jouent un rôle clé dans la différenciation neuronale (Shapiro et al. 1997; Gubkina et al. 2001).

La différenciation des cellules humaines IMR-32 par le tRA et le 8-Br-cAMP permet donc une augmentation des marqueurs neuronaux du cytosquelette. Il est intéressant de vérifier si les cellules IMR-32 traitées avec le 8-Br-cAMP et le tRA seul ou en combinaison expriment d'autres marqueurs caractéristiques des neurones. Nous avons montré que le profil d'expression ainsi que l'expression de l'énolase spécifique des neurones (NSE) augmente nettement dans les cellules traitées avec le 8-Br-cAMP et le tRA et surtout dans les cellules traitées avec la combinaison du 8-Br-cAMP et du tRA lorsque comparé aux contrôles non traités (Figures 3.8 et 3.9). La NSE est une enzyme intracytoplasmique importante dans le maintien de la fonction des neurones (Abdennebi et al. 2000). Les cellules de neuroblastome expriment aussi la NSE mais à un niveau plus bas que les neurones normaux (Abdennebi et al. 2000). La NSE est utilisée en clinique comme un marqueur de diagnostic des neuroblastomes. En effet, les neuroblastes de la tumeur ayant un taux de renouvellement rapide, les morts cellulaires sont nombreuses et ces cellules lysées larguent dans le sang circulant la NSE (Grosfeld, 1999; Castel et al. 1999). L'augmentation de la NSE est évocatrice, mais non spécifique, de la présence de neuroblastome, certains néphroblastomes peuvent également s'accompagner d'une teneur élevée en NSE (Bossart et al. 1989; Abdennebi et al. 2000).

Les résultats obtenus après traitement des cellules de neuroblastome IMR-32 avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA montrent une augmentation de

l'expression de l'acétylcholinestérase (Figure 3.10). De part leur origine, les cellules d'IMR-32 ont la possibilité d'exprimer des propriétés adrénergiques et cholinergiques. L'acétylcholinestérase est une enzyme clé qui se trouve dans les terminaisons nerveuses et qui permet la dégradation de l'acétylcholine en choline et en acétate lors de la transmission de l'influx nerveux (Wan et al. 2000; Choi et al. 2001). Il est donc évident que l'expression de l'acétylcholinestérase augmente durant la différenciation neuronale. Cette augmentation a été attribuée à une augmentation de la stabilisation de son ARNm dans les cellules murines P19 (Coleman et al. 1996). L'induction de la différenciation des neurones de souris par une combinaison de la dibutyryl cyclique AMP et de tRA a montré une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase avec un effet additif de ces deux agents (Jankowska et al. 1997). De plus, dans la lignée de neuroblastome LAN-5, le traitement avec le tRA ou le cRA semble suffisant pour induire une différenciation accompagnée par une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase (Han et al. 1995).

Les cellules de neuroblastome IMR-32 traitées avec le 8-Br-cAMP, seul ou en combinaison avec le tRA montrent aussi une augmentation de l'expression de la tyrosine hydroxylase (Figure 3.10). Par contre, le traitement avec le tRA n'a aucun effet sur le niveau d'expression de la tyrosine hydroxylase (Figure 3.10). Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature où il a été montré que le niveau de la tyrosine hydroxylase augmente avec l'avancement de la différenciation neuronale induite par des analogues de la cAMP et non pas par l'acide rétinoïque dans les lignées de neuroblastome humain CHP-126, CHP-134, IMR-32, NB-69 et LAN-5 (Gupta et al. 1985; Ikeda et al. 1994). La tyrosine hydroxylase est une enzyme caractéristique des neurones adrénergiques. Même si la tyrosine hydroxylase est présente dans plusieurs lignées de neuroblastomes (IMR-32, LAN-2, SK-NSH et LAN-5), son niveau d'expression ne dépasse pas 0.5 à 5 % de celui des neurones adrénergiques (West et al. 1977). En général, il est connu que la cAMP et l'augmentation de l'activité de la PKA sont responsables du changement de la fonction cholinergique à la fonction adrénergique dans les neurones (Kim et al. 1994; Ginns et al. 1988).

Ainsi, le traitement au tRA seul a peu d'effet sur la différenciation morphologique et moléculaire des cellules IMR-32 même s'il contribue à l'arrêt de la prolifération cellulaire. Ce dernier effet est connu pour créer des conditions favorables à la différenciation. L'augmentation de la cAMP intracellulaire par l'ajout du 8-Br-cAMP par contre, induit aussi une limitation de la prolifération cellulaire et une différenciation au niveau moléculaire et morphologique plus prononcée. Enfin, la combinaison des deux agents conduit à un degré plus élevé de différenciation neuronale et un arrêt presque complet de la prolifération. En conclusion, l'élévation de la cAMP intracellulaire associé à l'effet de tRA est une condition presque nécessaire au progrès de la maturation des cellules de neuroblastome IMR-32 en cellules à caractère neuronal.

4.2.1.4 Effet de la différenciation sur les marqueurs tumoraux

Le N-myc est amplifié dans la lignée de neuroblastome IMR-32. En effet, ces cellules possèdent 25 copies du gène N-myc, ce qui entraîne une sur-expression accrue de la protéine N-Myc (Azar et al. 1991). Le N-myc comme son homologue c-myc sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Matsunaga et al. 1998). D'après les résultats obtenus (Figure 3.11), le traitement des cellules IMR-32 avec le 8-Br-cAMP seul et surtout en combinaison avec le tRA entraîne une diminution de l'expression de la protéine N-myc. La régulation de la protéine N-myc s'accompagne d'une diminution de la croissance cellulaire telle que démontrée quantitativement par l'expression de la protéine PCNA un autre marqueur classique des tumeurs (Figure 3.11). En général, Le N-myc agit sur la régulation du cycle cellulaire par une réduction de la phase G1 (Aubry et al. 2000). L'inhibition de l'expression de N-myc par un oligonucléotide anti-sens résulte en une suppression de la prolifération et une induction de la différenciation (Galderisi et al. 1999c). De plus, l'expression de N-myc diminue durant la différenciation des tumeurs du neuroectoderme tel que les médulloblastomes (Moriuchi et al. 1997). La protéine N-Myc a été également impliquée dans la mobilité cellulaire ce qui contribue à la production de métastases chez les patients atteints de neuroblastome (Brodeur et al. 1997b). Ces patients chez qui le N-myc est amplifié ont des tumeurs extrêmement invasives qui produisent des métastases très distantes (Brodeur et al. 1997b). En effet, des études ont rapporté qu'une réduction de

l'expression de N-myc par un traitement au tRA permet une réduction du degré de la mobilité cellulaire dans la lignée cellulaire d'IMR-32 (Zaizen et al. 1998). De plus, dans une tentative d'identification des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire des neuroblastomes, l'équipe de Hovland et al. (2001) a rapporté qu'une augmentation intracellulaire du niveau de la cAMP dans les cellules de neuroblastomes de souris NB-2, régule de façon négative le gène de N-myc.

Contrairement à l'oncogène N-myc qui est associé à un pronostic défavorable, le TrkA, le récepteur de haute affinité de NGF est largement exprimé dans les neuroblastomes dont le pronostic est favorable (Brodeur et al. 1997). Le NGF joue un rôle primordial dans la différenciation embryonnaire des neuroblastomes (pour revue voir Nakagawara, 2001). Les cellules IMR-32 contrairement à d'autres types de cellules de neuroblastomes ne répondent pas au NGF, le récepteur du NGF étant défectueux (Azar et al. 1994).

Les résultats de la Figure 3.12 montrent une augmentation de l'expression de TrkA dans les cellules IMR-32 traitées avec le 8-Br-cAMP, le tRA et la combinaison des deux. Dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y et celle du rat PC-12 où le TrkA est fonctionnel, le traitement avec le 8-Br-cAMP et le NGF résulte en une induction de la différenciation terminale. Le retrait du NGF des cellules SH-SY5Y terminalement différenciées induit l'apoptose (Lambeng et al. 2001; Belbaraka, 2002). De plus, les cellules PC-12 différenciées avec une combinaison de NGF et de 8-Br-cAMP deviennent dépendantes de ces facteurs pour leur survie, indiquant que la voie du cAMP peut se substituer à celle évoquée par le NGF dans le maintien de la survie des cellules PC-12 (Lambeng et al. 2001; Wang et al. 1998).

La potentialisation du niveau d'expression de TrkA observée lors du traitement des cellules IMR-32 avec la combinaison de 8-Br-cAMP et de tRA (Figure 3.12) suggère une implication de la voie de signalisation induite par l'acide rétinoïque. En effet, les études de Xie et al. (1997) avaient déjà montré que durant la différenciation des lignées cellulaires leucémiques K562 et KG-1 par l'acide rétinoïque, un accroissement de

l'expression de TrkA a été observée, indiquant la possibilité de l'implication de la voie de signalisation NGF/TrkA dans la différenciation induite par l'acide rétinoïque dans les neuroblastomes où le TrkA est fonctionnel (Xie et al, 1997; Lucarelli et al. 1994). Certaines études ont montré que le pré-traitement des cellules primaires astrogliales par le cAMP, entraîne une augmentation du messenger (l'ARNm) d'un autre récepteur de neutrophines, le TrkB (Concorelli et al. 1994).

Comme le TrkA, le niveau de H-ras augmente aussi lors du traitement des cellules IMR-32 avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA tandis que le tRA seul n'a pas d'effet sur son niveau d'expression (Figure 3.12). Le H-ras est une protéine membranaire qui a une activité intrinsèque de GTPase (pour revue voir Jones et al. 2001). Cette protéine est très importante dans la régulation de la différenciation et la prolifération cellulaire dans plusieurs types de cellules (Hall et al. 2002). Le H-ras est utilisé en clinique comme marqueur de neuroblastome avec un pronostic favorable (Tanaka et al. 1998). Le mécanisme de l'implication de H-ras dans la différenciation des neuroblastomes en général et des IMR-32 en particulier reste inconnu. Cependant, le traitement des cellules de neuroblastome SK-N-SH par le NGF entraîne une activation du p21ras, indiquant l'implication de la voie de signalisation de H-ras dans la différenciation des neuroblastomes induite par le NGF (Burchill et al. 1995a). Par contre, l'induction de la différenciation par le tRA dans les cellules IMR-32 ne semble pas impliquer l'activation de H-ras (Burchill et al. 1995b).

4.2.1.5 p53 et différenciation cellulaire

Il est généralement connu que le gène de p53 est muté dans environ 60 % des cancers (Tweddle et al. 2001; Keshelava et al. 2001). La protéine p53 est impliquée d'une part, dans l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S dans les cellules normales et d'autre part dans l'apoptose dans les cellules dont l'ADN est endommagé (Keshelava et al. 2000).

Dans ce travail, le contrôle de la prolifération observé dans les cellules IMR-32 lors de leur traitement avec le 8-Br-cAMP, le tRA ou la combinaison des deux a été surtout attribué à une régulation du cycle cellulaire (comme expliqué dans la section 4.2.1.1). La question du rôle de la p53 dans ce contexte se pose car la protéine p53 se trouve séquestrée dans le cytoplasme des lignées cellulaires de neuroblastomes en général. Plusieurs études ont démontré la localisation aberrante de la p53 dans le cytoplasme et son absence du noyau dans les biopsies de neuroblastomes peu différenciés et dans des lignées cellulaires incluant la lignée cellulaire SH-SY5Y (McKenzie et al. 1999; Grosfeld, 1999). Selon les expériences illustrées par les Figures 3.13 et 3.14, la p53 retrouve sa localisation nucléaire partielle après un traitement de 24 heures par le 8-Br-cAMP et quasi-complète après un traitement de 7 jours par le 8-Br-cAMP, le tRA ou la combinaison des deux. Nous supposons que cette re-localisation de la p53 pourrait témoigner ainsi d'une reprise de la fonction de la p53 comme gardien du génome.

Le traitement des cellules IMR-32 avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA contribue à réduire le niveau d'accumulation de la protéine p53 tel que montré par immunobuvardage (Figure 3.15). La re-localisation partielle de la p53 dans le noyau lors de l'activation de la PKA par le 8-Br-cAMP dans les cellules IMR-32 peut être associée à la limitation de la prolifération. Les études faites dans les cellules SH-SY5Y ont montré que l'acide rétinoïque et le H7 (un inhibiteur non-spécifique de PKC) provoquent aussi une réduction semblable de l'expression de la p53 et une accumulation de celle-ci dans le noyau. Cela est accompagné dans le cas de l'acide rétinoïque par une élévation de l'expression du Bcl-2 une molécule pro-apoptotique (Tieu et al. 1999; Ronca et al. 1997, 1999).

Normalement la p53 est maintenue à un niveau très bas dans les cellules normales et se déplace du noyau vers le cytoplasme où elle est dégradée par ubiquitination par l'intermédiaire du proto-oncogène Mdm2 (Isaacs et al. 2001). Le Mdm2 est amplifié dans quelques lignées de neuroblastomes (Rodriguez-Lopez et al. 2001). La protéine Mdm2 est accumulée dans les cellules IMR-32 non traitées (Figure 3.16A). Cependant, son niveau d'amplification diminue dans les cellules IMR-32 traitées avec le 8-Br-cAMP seul

ou en combinaison avec le tRA (Figure 3.16C, D). Le fait que le déplacement de la p53 du noyau vers le cytoplasme soit effectué par l'intermédiaire de la protéine Mdm2 (Moll et al. 2000) suggère que l'amplification de Mdm2 est responsable du déséquilibre du transport de la p53 vers le cytoplasme. L'action de 8-Br-cAMP se situerait probablement dans la réduction de l'accumulation du Mdm2, qui ainsi réduit, n'est plus capable de déplacer toutes la p53 vers le cytoplasme et laisse une partie dans le noyau.

Récemment, des études de Rodriguez-Lopez et al. (2001) ont montré que l'écoposide, un agent thérapeutique qui induit l'apoptose par translocation de la p53 vers le noyau dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y qui expriment un faible taux de Mdm2. L'écoposide est cependant inefficace dans le traitement des neuroblastomes SH-EP1 qui expriment un taux élevé de la protéine Mdm2 (Rodriguez-Lopez et al. 2001). L'inhibition de Mdm2 au niveau de l'ARN messager par un oligonucléotide anti-sens dans les cellules SH-EP1 permet une re-localisation de la p53 au niveau du noyau et un déclenchement de la mort cellulaire programmée (Rodriguez-Lopez et al. 2001).

4.3 Effet de la différenciation sur le couplage cellulaire dans la lignée de neuroblastome IMR-32

L'implication des JICGs dans l'induction de la différenciation a été rapportée par plusieurs groupes de recherche (Fromaget et al. 1992; Trosko et al. 2000a; 2000b; Carystinos et al. 2001). En particulier, les JICGs se sont révélées importantes dans la régulation de la différenciation lors du développement embryonnaire et cela même avant la formation des synapses (Bruzzone et al. 1996; Lo, 1999; 2000).

4.3.1 Expression de la Cx43 et fonction des JICGs

Les cellules d'IMR-32 sont déficientes en terme de communication via les jonctions intercellulaires de type gap tel que montré dans la section 3.1. Les résultats de la Figure 3.17 montrent que l'induction de la différenciation par le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA engendre une augmentation de l'expression de la Cx43 dans sa forme non phosphorylée et ses formes phosphorylées P1 et P2 durant la progression vers la différenciation. Cette augmentation est probablement due à une régulation positive du

niveau d'expression de la PKA puisqu'elle est observée en réponse à l'exposition des cellules au 8-Br-cAMP. En effet, le gène de la Cx43 contient un élément de réponse à la PKA (Trosko et al. 1998). Cet élément de réponse est probablement activé par l'unité catalytique de la PKA qui pénètre dans le noyau et induit l'activation de l'expression de la Cx43 (Trosko et al. 2000a). Des résultats semblables ont été rapportés par Carystinos et al. (2001), dans un travail de collaboration avec notre laboratoire. De plus, des études de Banoub et al. (1996), ont montré que l'exposition au 8-Br-cAMP augmente le niveau d'expression de la Cx43 et son assemblage en canaux jonctionnels dans les cellules épithéliales du poumon. L'augmentation de l'expression de la Cx43 observé dans notre travail a été attribuée à l'augmentation du niveau de transcription puisque nous avons observé une augmentation qualitative du taux message d'ARN de la Cx43 (Figure 3.18).

Les résultats des Figures 3.17, 3.18 et 3.19, montrent également que l'induction de la différenciation cellulaire par le tRA, entraîne une augmentation de l'expression et de la transcription de la Cx43 accompagnée par une restauration de la communication intercellulaire dans les cellules IMR-32. La restauration des jonctions intercellulaires de type gap par l'exposition aux rétinoïdes a fait l'objet d'études dans plusieurs types cellulaires. Les résultats ont montré un profil de réponse spécifique à chaque phénotype. Par exemple, l'acide rétinoïque augmente l'expression des jonctions intercellulaires de type gap dans les cellules épithéliales de rat et dans les cellules de tératocarcinome embryonnaire de souris F9 (Trosko et al. 2000a), et prévient la perte de la fonction des JICGs en augmentant l'expression de la Cx43 sans affecter son état de phosphorylation dans les cellules MDCK exposées au TPA, un ester de phorbol connu pour son abilité à bloquer les JICGs (Watanabe et al. 1999). De plus, la modulation de la Cx43 dans les cellules F9 après traitement par le tRA, affecte le messenger et la protéine de la Cx43 (Clairemont et al. 1996b). L'étude de la séquence du promoteur du gène de la Cx43 humain, de rat et de souris a montré l'absence d'élément de réponse (RARE) (Yu et al. 1994, De Leon et al. 1994; Sullivan et al. 1993), confirmant le peu d'effet observé en réponse à un traitement individuel au tRA des cellules IMR-32 (Figures 3.19B et 3.20C, D).

Nous avons montré aussi que le traitement des cellules IMR-32 par le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA provoque la restauration des JICGs en induisant une re-localisation de la Cx43 du cytoplasme vers la membrane plasmique. En effet, les études d'immunolocalisation des cellules IMR-32 non traitées ont démontré que la Cx43 se retrouve séquestrée dans le cytoplasme (Figures 3.20A,B). L'induction de la différenciation par un traitement avec le 8-Br-cAMP seul ou en combinaison avec le tRA entraîne un transfert de la Cx43 du cytoplasme vers la membrane plasmique (Figures 3.20.E, F, G, H) alors que le tRA seul à peu d'effet sur le trafic de la Cx43 (Figures 3.20C, D). Ceci est en accord avec le travail de Watanabe et al. (1999) qui ont montré que les composés carcinogènes réduisent la quantité de Cx43 associée à la membrane cytoplasmique et augmentent la partie associée au noyau alors que les agents différenciateurs augmentent la quantité de Cx43 associée à la membrane cytoplasmique. D'autres études, ont aussi rapporté que le traitement des cellules épithéliales du rein par le tRA permet le rétablissement de la fonction des communications intercellulaires de type gap en normalisant la distribution de la Cx43 au niveau de la membrane (Trosko et al. 2000a; 2000b).

D'après les résultats montrés dans les Figures 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, c'est le traitement combiné de 8-Br-cAMP et de tRA qui montre le plus d'efficacité à la fois pour augmenter le niveau de la transcription de la Cx43 et son transfert du cytoplasme vers la membrane plasmique où elle pourra former des canaux jonctionnels et assurer la communication intercellulaire des cellules de neuroblastomes IMR-32.

4.3.2 Effet de la combinaison du 8-Br-cAMP et avec le tRA sur l'évolution des jonctions intercellulaires de type gap

La différenciation des cellules d'IMR-32 a été induite durant la première étape pour seulement 7 jours et cette différenciation s'est accompagnée d'un rétablissement des communications intercellulaires (Figure 3.19). Il nous a paru nécessaire d'étudier les JICGs dans les cellules d'IMR-32 durant la différenciation prolongée qui mime différents stades du développement embryonnaire du SNP. En effet, le patron d'expression des

connexines et la fonction des JICGs sont modulés durant la différenciation des cellules neuronales (Trosko et al. 2000a).

L'expression des connexines comme rapportée dans la revue de littérature est spécifique à chaque tissu (Zhao et al. 1999; Trosko et al. 2000a; 2000b) et change au sein du même tissu du développement embryonnaire au tissu terminalement différencié (Bruzzone et al. 1996; Trosko et al. 1998b; Wiszniewski et al. 2000). La Cx43 prédomine dans les tissus embryonnaires. A une certaine période du développement, dans les cellules du système nerveux périphérique, la Cx43 arrête de s'exprimer et elle est remplacée par une autre connexine qui est associée au maintien de l'homéostasie cellulaire du tissu. Les auteurs ne s'accordent pas sur la nature de cette dernière, qui peut être la Cx26, la Cx32 ou la Cx36 ((Bruzzone et al. 1996; Rozental et al. 1998). Par contre, il y a consensus concernant la disparition de la Cx43 après différenciation terminale et arrêt définitif du cycle cellulaire (Nadarajah et al. 1997; 1999; Trosko et al. 2000b).

Dans nos conditions de culture *in vitro* (Figure 3.21), la différenciation des cellules IMR-32 a été possible jusqu'à un maximum de 25 jours. Après cette période, les cellules commencent à mourir par perte d'adhésion. Les cellules d'IMR-32 présentent une morphologie étoilée avec extension de plusieurs neurites et formation de pseudo-ganglion après une différenciation de 25 jours (Figure 3.21). Cette différenciation s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de la Cx43 (Figure 3.22) dû à une augmentation du niveau de la transcription tel que montré qualitativement dans la Figure 3.23. De plus, presque toutes les cellules différenciées communiquent par couplage intercellulaire (Figure 3.24) grâce à une re-localisation complète de la Cx43 sur la membrane plasmique (Figure 3.25). Donc, la différenciation prolongée a un effet semblable à celui observé à court terme et nous n'avons pas pu vraisemblablement atteindre l'état de différenciation terminale où la Cx43 disparaît et est remplacée par une autre connexine. Ces résultats diffèrent donc de ceux trouvés dans la littérature, durant le développement embryonnaire (Naus et al. 1997; Trosko et al. 2000b).

Les neuroblastes sont couplés avec une perte ou encore une réduction des JICGs qui est associée à la différenciation terminale (Bani-Yaghoub, 1999; Cepeda et al. 1993). De plus, une diminution dans l'expression des connexines et des JICGs a été rapportée durant la différenciation *in vitro* de deux lignées cellulaires, de tératocarcinomes de souris P19 et humaines NT2 (Naus et al. 1997; Trosko et al. 2000b). Au moins trois situations peuvent expliquer l'augmentation de la communication cellulaire lors de la différenciation des cellules IMR-32. D'abord, les IMR-32 sont probablement dans un état de différenciation neuronales où les JICGs sont établies comme dans les neuroblastes primaires normaux mais où la différenciation terminale n'a pas pu être atteinte. Donc, malgré l'expression des marqueurs de différenciation, les cellules d'IMR-32 n'ont pu sortir complètement du cycle cellulaire et atteindre le stade de différenciation dit "terminal". Il pourrait s'agir également du fait que les IMR-32 n'expriment pas d'autres types de connexines contrairement aux neuroblastes qui expriment les Cx26 et Cx32 à la fin de leur différenciation embryonnaire (Bruzzone et al. 1996; Rozental et al. 1998). Finalement, le système étudié reste un modèle *in vitro* où les interactions avec d'autres cellules du système nerveux tel que les cellules de soutien sont absentes (Trosko et al. 2000b). Les cellules de soutien sont probablement impliquées dans le maintien de la différenciation terminale. En effet, il a été rapporté que les neuroblastomes qui contiennent un grand nombre de cellules de Schwann régressent spontanément (Girgert et al. 2000).

L'ensemble de nos résultats (Figure 3.22, 3.23, 3.24, 3.25) montre que la différenciation va de paire avec le rétablissement du couplage jonctionnel dans les cellules IMR-32. En effet, des études de transfection du gène de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastome de souris Neuro-2a ont montré que la présence de la Cx43 dans les cellules Neuro-2a n'est pas suffisante, il faut qu'elle soit localisée dans la membrane. Cette re-localisation ne peut s'effectuer que lorsque ces cellules sont induites à se différencier en présence de l'acide rétinoïque (Loewenstein et al. 1966; Yamasaki et al. 1996). Ceci confirme, ce que nous avons constaté chez les cellules IMR-32, où l'expression de la Cx43 à elle seule ne permet pas la diminution de la croissance cellulaire (Figures 3.1 et 3.5).

Il est possible alors de suggérer que le transfert de la Cx43 de la membrane vers le noyau est un élément majeur dans la pathologie des neuroblastomes. La re-localisation complète de la Cx43 vers la membrane plasmique et surtout l'ouverture des pores nécessite au moins 10 jours de traitement avec le 8-Br-cAMP et le tRA (Figure 3.25). L'identification des kinases clés capables d'induire rapidement le transfert de la Cx43 de la membrane vers le noyau serait un atout pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire dans la pathologie des neuroblastomes.

4.4 Régulation des JICGs dans la lignée de neuroblastome humain IMR-32

Plusieurs études ont démontré que la Cx43 est phosphorylée par des protéines kinases dans la partie carboxy-terminale située dans le cytoplasme où plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés (Beyer et al. 1995; Lampe et al. 2000). La phosphorylation des résidus serine, thréonine et tyrosine est la seule modification post-traductionnelle qui a été détectée dans les connexines (Filson et al. 1990; Crow et al. 1990; Saez et al. 1993; Lin et al. 2001). Les protéines kinases suivantes sont impliquées dans la phosphorylation des Cxs: PKC, PKA et MAPK (Lampe et al. 2000). Étant donné leur rôle dans la signalisation cellulaire, ces kinases ont été des candidates potentielles dans la régulation des JICGs (Kwak et al. 1995; Lampe et al. 2000). L'inhibition de chacune de ces kinases va probablement permettre l'identification des voies de signalisations qui participent à la prolifération et au couplage intercellulaires des cellules IMR-32.

4.4.1 Effet de la PKC sur les JICGs

Tel que cité dans la revue bibliographique, la PKC représente une famille d'au moins 12 kinases serine/thréonine (Ventura et al. 2001; Barry et al. 2001) qui participent aux événements de transduction de signaux en réponse aux stimulus hormonaux, neuronaux ou encore aux facteurs de croissance (Shindo et al. 2001; Inoue et al. 1999; 2000). Afin de déterminer l'implication de la PKC en général et de ses isoformes

spécifiques en particulier dans la régulation des JICGs chez les cellules d'IMR-32, des inhibiteurs de PKC montrant différents degrés de spécificité ont été utilisés. Les inhibiteurs utilisés sont la staurosporine, le H7 et le Go6976. La staurosporine et le H7 sont des inhibiteurs de la PKC et d'autres protéines kinases telles que, la PKA, la PKG, la calmoduline kinase, la kinase de la chaîne légère de myosine et la p60src (Shibuya et al. 2001). Ils sont utilisés dans le but d'étudier d'une façon générale l'effet de l'inhibition non spécifique des kinases impliquées dans la régulation des mécanismes transductionnels des JICGs. La staurosporine et le H7 induisent une diminution de la croissance cellulaire qui est reliée à l'apparition de la mort cellulaire programmée comme c'est montré dans les Figures 3.29 et 3.30. L'induction de l'apoptose par la staurosporine est un trait général observé chez presque tous les types de cellules en culture incluant les cellules de neuroblastome (Bursztajn et al. 2001; Lopez et al. 2000). Le H7 induit également l'apoptose dans plusieurs lignées de neuroblastomes humains incluant les IMR-32 (Nonaka et al. 1998; Lopez et al. 2000). Ces deux inhibiteurs de la PKC empruntent des mécanismes différents pour induire la mort programmée. Le H7 induit la re-localisation de la p53 au niveau du noyau, contrairement à la staurosporine (Tieu et al. 1999; Felipo et al. 1990). Puisque la p53 est impliquée dans la régulation de l'apoptose, le H7 induit l'apoptose dans les neuroblastomes par une voie dépendante de la p53 (Tieu et al. 1999). La staurosporine, quand à elle, emprunte une voie indépendante de la p53 (Felipo et al. 1990).

L'arrêt de la prolifération cellulaire lors du traitement par le H7 ou la staurosporine est jumelé à une augmentation de la perméabilité jonctionnelle d'environ 20 % (Figure 3.32). Les JICGs sont probablement impliquées dans la régulation des signaux cellulaires et participent ainsi à l'arrêt de la prolifération ou de l'apoptose (Yamasaki et al. 1999a). Toutefois, les cellules d'IMR-32 traitées par le H7 et la staurosporine ne montrent aucune augmentation de l'expression de la Cx43 dans sa forme non phosphorylée et ses formes phosphorylées et la teneur des cellules en Cx43 apparaît semblable à celle des cellules contrôles (Figure 3.31). L'augmentation du couplage jonctionnel observé lors du traitement par ces deux inhibiteurs (Figures 3.32) semble être reliée à une re-localisation d'une partie de la Cx43 du cytoplasme vers le noyau. L'effet

de la staurosporine et du H7 peut être dû à leurs effets différentiels sur l'inhibition des isoformes de PKC ou encore l'inhibition d'autres kinases.

Même si la spécificité d'inhibition de la staurosporine pour la PKC et ses isoformes reste faible, la staurosporine a servi de base à la synthèse d'autres composés plus spécifiques de la PKC. Le Go6976 est un indocarbazole dérivée de la staurosporine (Dempsey et al. 2000). Ce composé montre une bonne sélectivité pour la PKC et permet une discrimination entre les isoformes conventionnelle (cPKC) et les nouvelles (nPKC). En effet, le Go6976 inhibe de façon spécifique les isoformes de PKC Alpha, Beta et Mu. Les cellules IMR-32 expriment entre autres les PKC Alpha, Beta et Mu (Zeidman et al. 1999a; 1999b). L'analyse des résultats des Figures 3.32 et 3.33, a permis de montrer que l'inhibition de ces isoformes par le Go6976 induit une augmentation accrue de la perméabilité jonctionnelle associée à une re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique. De plus, les résultats de la prolifération cellulaire (Figures 3.26 et 3.27) démontrent une limitation de la croissance chez les cellules IMR-32 traitées par le Go6976, un phénomène qui n'est pas relié à l'apoptose, mais plutôt à un ralentissement des divisions cellulaires tel que montré dans la Figure 3.28. Cela suggère que la régulation de la prolifération cellulaire par la PKC est associée à une modulation des jonctions intercellulaires de type gap puisque l'inhibition des isoformes de PKC Alpha, Beta et Mu par le Go6976 exerce un contrôle négatif sur la prolifération des cellules IMR-32. Ce processus se retrouve associé à l'ouverture des canaux de type gap et à la re-localisation de la Cx43 sur la membrane (Figures 32 et 33).

La régulation des JICGs par le Go6976 ne se situe pas au niveau de l'expression de la Cx43 elle-même puisque nous avons montré que le traitement des cellules IMR-32 par le Go6976 n'a aucun effet sur la régulation de l'expression de la Cx43 (Figure 3.31). Cependant, les PKCs Alpha, Beta et/ou Mu modulent les JICGs au niveau du transfert de la Cx43 du cytoplasme vers la membrane plasmique et au niveau de la perméabilité du canal jonctionnel (Figure 3.32, 3.33).

Plusieurs études ont rapporté que la PKC est impliquée directement dans la régulation des JICGs (Doble et al. 2000; Lampe et al. 2000; Bowling et al. 2001). En effet, le traitement de plusieurs lignées cellulaires par le TPA, un activateur de la PKC induit une élévation de la croissance cellulaire et une fermeture des jonctions cellulaires de type gap (Trosko et al. 2000a; Husoy et al. 2001; Lampe et al. 2000). De plus, l'inhibition de la PKC Alpha, Beta et Mu par le Go6976 influence la prolifération cellulaire dans plusieurs lignées de neuroblastomes incluant, les cellules SH-SY5Y, LAN-2, LAN-5 et SK-NBE (Svensson et al. 2000; Zeidman et al. 1999a; 1999b; Dean et al. 1996).

Les travaux de Zeidman et al. (1999a; 1999b) montrent que la suppression de la croissance causée par la PKC est due à l'inhibition des isoformes classiques et particulièrement celles de la PKC Alpha et Beta. Le mécanisme d'action de ces isoformes de PKC sur la prolifération reste encore inconnu. Toutefois, dans ce travail nous avons observé que l'inhibition spécifique de ces isoformes induit l'inhibition de la prolifération cellulaire reliée à une re-localisation de la Cx43 sur de la membrane et une restauration de la perméabilité des canaux jonctionnels de type gap (Figure 3.32 et 3.33). Ces observations suggèrent l'implication des isoformes Alpha et/ou Beta et/ou Mu dans la modulation de la prolifération cellulaire comme cela a été démontré pour d'autres isoformes de PKC (Dempsey et al. 2000; Wagner et al. 2001; Mandil et al. 2001; Jao et al. 2001).

4.4.2 Effet de la MAPK sur les JICGs

La famille des MAPKs comprend trois voies principales soit celles de la ERK1/2, de la JNK/SAPK et de la p38 (Bennett et al. 1997; Burgen, 2000). Chaque MAPK est impliquée dans un ou plusieurs processus cellulaires particuliers (Kong et al. 2000). Alors que, la ERK1/2, qui est activée par des facteurs de croissance a été impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Dent et al. 1998; Bonni et al. 1999), la p38 qui est activée par des cytokines et une variété de stress a été impliquée dans l'apoptose

dans plusieurs modèles cellulaires (Berra et al. 1998; Birkenkamp et al. 1999; Jun et al. 1999). Le rôle exact de la p38 n'est pas encore élucidé (Kong et al. 2000).

D'après les résultats obtenus lors de l'inhibition de la p38 par le SB202190 et de la ERK1/2 par le PD98059 (Figures 3.39 et 3.40), seule la p38 paraît être impliquée dans la régulation des jonctions intercellulaires de types gap dans les cellules de neuroblastome IMR-32. En effet, l'inhibition de la p38 induit une ouverture des canaux jonctionnels tel que démontré par la technique de chargement par grattage, tandis que l'inhibition de la ERK1/2 ne semble pas avoir n'a d'effet sur l'ouverture du canal jonctionnel (Figure 3.39). Cette élévation du couplage cellulaire à la suite du traitement avec l'inhibiteur de la p38 SB202190 n'implique aucunement une augmentation de l'expression de la Cx43 tel que montré dans la Figure 3.38.

L'implication des MAPKs dans la régulation des JICGs est rapportée à plusieurs reprises dans la littérature (Hossain et al. 1999; Kim et al. 1999; Vikhamar et al. 1998). L'activation de la cascade de la MAPK a été reliée à une diminution de la fonction des JICGs (Hossain et al. 1999). En effet, les cellules épithéliales de foie de rat montrent une diminution de la perméabilité jonctionnelle après traitement par l'EGF (facteur de croissance épidermique). Cet effet se situe au niveau de la phosphorylation de la Cx43 par la MAPK (Warn-Cramer et al. 1998; Vikhamar et al. 1998). Il a été rapporté que la phosphorylation *in vivo* de la Cx43 par la MAPK est situé au niveau des résidus Ser²⁵⁵, Ser²⁷⁹ et Ser²⁸² lors d'un traitement par le EGF (Warn-Cramer, 1996). Un effet similaire est observé après un traitement par le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) (Hossein et al. 1999).

L'inhibition spécifique de la p38 par le SB202190 permet la re-localisation de la Cx43 de la membrane plasmique vers le noyau accompagnée par l'ouverture du canal gap (Figure 3.39, 3.40). De plus, le traitement des cellules IMR-32 avec l'inhibiteur spécifique de la p38 le SB202190, induit un arrêt de la prolifération cellulaire associé à la mort cellulaire programmée (Figure 3.35, 3.36 et 3.37). Ceci semble indiquer que l'apoptose induite lors de l'inhibition de la p38 passe probablement par la régulation des

JICGs. Cependant, cette hypothèse a besoin de plus d'évidences directes pour être confirmée. Cette diminution de la croissance cellulaire due à l'apoptose semble être reliée à une augmentation de la perméabilité jonctionnelle causée par la re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique (Figure 3.39, 3.40).

Plusieurs composés modulent la perméabilité jonctionnelle. Ces composés comprennent entre autres, les rétinoïdes, les flavonoïdes, les carotènes et les analogues de la cAMP (Trosko et al. 2000a; Yamasaki et al. 1999b). Leurs mécanismes d'action sur les JICGs ne sont pas complètement élucidés. Puisque la p38 est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires, l'action de ces composés emprunte probablement cette voie de signalisation ou encore comme démontré plus haut la voie de l'inhibition des isoformes classiques de la PKC de façon directe ou indirecte. En effet, le groupe des p38 kinases est impliqué dans l'inflammation, la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire et la mort programmée (Okamoto et al. 200; Thrane et al. 200; Teng, 2001). A l'opposé de ce qui est observé avec la p38, la ERK1/2 ne semble pas avoir d'effet ni sur l'expression de la Cx43 ni sur la perméabilité jonctionnelle (Figures 3.38 et 3.39). Il est possible de déduire que la régulation du couplage jonctionnel dans les cellules de neuroblastome IMR-32 passe par des voies de signalisations spécifiques dépendamment du signal perçu.

4.5 Les céramides et le couplage cellulaire

Les céramides sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la différenciation, l'inhibition de la croissance ou/et la mort cellulaire programmée (Komatsu et al. 2001; Ruvolo et al. 2001). En effet, elles agissent comme des messagers secondaires qui transmettent les stimulus d'agents extracellulaires en activant diverses cibles incluant: les protéines kinases C, les MAP kinases et certains oncogènes (Ballou et al. 1996; Hannun, 1996; 2000; Mathias et al. 1998; Huwiler et al. 2000 Riboni et al. 2001). Deux analogues synthétiques de la céramide ont été utilisés dans ce travail, soit le C2-cér et le C6-cér (pour revue voir Mathias et al. 1998).

Les résultats de la Figure 3.42 montrent que le traitement des cellules IMR-32 par la C2-céramide entraîne une diminution de la croissance cellulaire dépendamment de la dose utilisée. Cette diminution de la prolifération peut être due soit à un arrêt de la prolifération, soit au déclenchement de l'apoptose. En présence de fluorochrome Hoechst, nous avons observé les changements morphologiques du noyau caractéristiques de l'apoptose. Ceci suggère qu'à une dose de 25 μM de C2-cér les cellules d'IMR-32 ne montrent pas des signes d'apoptose, alors qu'à des doses de 50 à 100 μM de C2-cér, ces cellules présentent une compaction de leur chromatine, caractéristique due au déclenchement de la mort cellulaire programmée (Figure 3.43, 3.44 et 3.45).

Un comportement similaire a été aussi observé dans d'autres lignées cellulaires. En effet, il a été montré que la C2-cér induit l'apoptose dans les cellules du cancer de la prostate LNCaP à une concentration de 50 μM et un arrêt de la prolifération cellulaire à une dose plus faible (Engedal et al. 2001). Dans les cellules leucémiques, les céramides et spécialement la C2-cér se sont montrées responsables de l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1 (Obeid et al. 1993; Jayadev, et al. 1995). À l'opposé de ce qui est observé avec le C2-cér, la toxicité consécutive à l'exposition à la C6-cér s'exerce à des doses très faibles de l'ordre de 10 μM (Figure 3.41). Dans notre modèle expérimental, nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur les effets des céramides *in vivo* (Pahlavani et al. 2000). En effet, la concentration intracellulaire de céramide est strictement contrôlée, à cause de la dualité de son effet, qui en fonction de la concentration endogène peut induire l'apoptose ou l'arrêt de la croissance cellulaire (Pahlavani et al. 2000).

La voie de signalisation empruntée par les céramides lors de l'induction de l'apoptose dans les neuroblastomes d'origine humaine SH-SY5Y a été étudiée par Tavarini et al. (2000). Ces chercheurs ont découvert que c'est la voie de la MAPK, plus spécifiquement, celle de sa sous famille p38 qui est impliquée dans l'apoptose induite par les céramides (Tavarini et al. 2000). L'étude de la signalisation de la C2-cér a été donc limitée dans ce travail à l'effet d'une concentration exogène de 25 μM , qui inhibe la croissance cellulaire.

En général, l'arrêt de la prolifération peut impliquer directement/ou indirectement certaines kinases clés telles que la MAPK et/ou la PKC (Liu et al. 1999; Levade et al. 1999). Ces kinases modulent elles-mêmes l'expression génétique des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou encore activent de façon indirecte les signaux cellulaires qui contrôlent la prolifération (Liu et al. 1999; Levade et al. 1999). L'implication de la voie de la MAPK dans l'arrêt de la prolifération induite par une dose de 25 μ M de C2-cér a été étudiée. Les résultats de la Figure 3.46 montrent que la C2-cér n'emprunte ni la voie de ERK1/2 ni celle de la p38 pour induire l'arrêt de la prolifération observée puisque les inhibiteurs spécifiques de ces deux voies ont un effet additif sur la croissance des cellules traitées par la C2-cér.

Plusieurs auteurs suggèrent l'implication de certains isoformes de PKC dans la transmission du signal induit par les céramides (Abousalham et al. 1997; Tanabe et al. 1998; Galve-Roperh et al. 1997; Han et al. 2000; Liu et al. 1999). En effet, certains activateurs de la PKC comme les esters de phorbol et le diacyl glycérol inhibent l'habilité de la céramide à induire l'apoptose, tandis que certains inhibiteurs de PKC augmentent cet effet (Levade et al. 1999). Afin de distinguer si la voie de signalisation des PKCs est associée à cette diminution de la croissance cellulaire, des inhibiteurs spécifiques des PKCs soit le Go6983 et le Go6976 seuls ou en combinaison avec la C2-cér ont été utilisés.

L'analyse des résultats de la Figure 3.47 a permis de démontrer de façon indirecte que la voie de signalisation de la PKC est probablement impliquée dans la régulation négative de la prolifération induite par la C2-Cér et plus précisément les isoformes de PKC inhibées spécifiquement par le Go6976 soit les PKCs Alpha, Beta et/ou Mu . Dans la littérature, des expériences similaires ont montré que les céramides ont un rôle direct dans l'inhibition des PKC dans les cellules de plaquettes sanguines (Hannun et al. 1986) et dans les cellules HL-60 (Merrill et al. 1986).

Afin d'examiner l'implication des isoformes de PKC Alpha, Beta et/ou Mu dans la régulation de la prolifération induite par la C2-cér, une approche plus spécifique a été

empruntée. Cette approche consistait à inhiber de façon spécifique ces isoformes par incorporation individuelle d'anticorps contre chacune de ces isoformes de PKC dans les cellules IMR-32 par la méthode d'endocytose, suivie par un traitement à la C2-cér et à mesurer leurs effets sur la diminution de la croissance cellulaire. Les résultats de la Figure 3.50 montrent que la diminution de la prolifération exercée par la C2-cér n'est pas additive à celle exercée par l'inhibition de la PKC Alpha. Ainsi, la C2-cér emprunte la voie de signalisation de la PKC Alpha pour limiter la prolifération dans les cellules IMR-32.

Il a été rapporté que la C6-céramide est responsable de l'inhibition de l'activité de la PKC Alpha dans les cellules leucémiques humaines, Molt-4 (Lee et al. 1996). De plus, ces auteurs ont montré que la céramide active des phosphatases et cause une translocation de la PKC Alpha sur la membrane plasmique (Lee et al. 1996). Il est possible que la C2-cér inactive la PKC Alpha par déphosphorylation ainsi que cela a été démontré pour la C6-cér dans les cellules leucémiques humaines (Lee et al. 1996). Ces résultats semblent indiquer que la PKC Alpha, constitue une des étapes au cours de l'inhibition de la prolifération des cellules IMR-32 par la C2-cér. Il est en effet reconnu que la PKC Alpha est activée dans les cellules en cours de prolifération (Fournier et al. 2001).

Les jonctions communicantes sont impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire et la différenciation dans plusieurs types cellulaires (Yamasaki et al. 2000; Trosko et al. 2000b). Le but de cette dernière partie du travail était d'étudier l'implication de la voie de signalisation des céramides dans la régulation des jonctions intercellulaires de type gap au cours de la prolifération et de l'induction de l'apoptose. Tel que montré par la technique de chargement par grattage la C2-cér ne semble avoir aucun effet sur le couplage cellulaire via les jonctions intercellulaires de type gap, et ceci quelles que soient les concentrations utilisées 25 ou 100 μM (Figure 3.52). Cela semble démontrer que la régulation de la croissance cellulaire par les céramides à courtes chaînes tel que la C2-cér n'est pas médiée par les jonctions intercellulaires de type gap.

L'ensemble de ces résultats suggère que la re-localisation de la Cx 43 sur la membrane plasmique ainsi que l'ouverture des canaux jonctionnels sont conditionnés par l'inhibition de la p38 et de la PKC Alpha, Beta et/ou Mu et par l'activation de la PKA.

5. CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous nous sommes consacrés à l'étude des jonctions intercellulaires de types gap en utilisant comme modèle expérimental *in vitro* les cellules de neuroblastomes humaines IMR-32. Nous avons démontré que ces cellules expriment seulement la Cx43, caractéristique de l'état embryonnaire, dans ses formes phosphorylées et sa forme non phosphorylée, et que les JICGs sont déficientes. Les cellules de neuroblastome IMR-32 présentent, en effet, des jonctions intercellulaires de type gap non fonctionnelles. Ceci est dû à l'altération de la localisation de la Cx43 au niveau cytoplasmique probablement dans l'appareil de Golgi ou dans le réticulum endoplasmique et de son absence de la membrane plasmique.

Les neuroblastomes sont originaires de cellules embryonnaires qui sont bloquées durant leur développement à des stades divers de leur programme de différenciation (Matthay et al. 1995a; 1995b; 1999a). *In vitro*, nous avons montré que le traitement combiné avec le 8-Br-cAMP et le tRA module non seulement la morphologie cellulaire en transformant les cellules d'une forme épithéliale à une forme neurale, mais agit aussi au niveau moléculaire en activant les gènes responsables de la morphologie et de la fonction neuronales. De plus, ce traitement limite la croissance cellulaire, diminue l'expression de l'oncogène N-myc qui est normalement amplifié dans les cellules de neuroblastomes IMR-32. En outre, ce traitement induit une augmentation de l'expression du récepteur neurotrophique TrkA et de l'oncogène H-ras, deux marqueurs caractéristiques d'un bon pronostic chez les patients atteints du neuroblastome.

L'induction de la différenciation par le traitement combiné de 8-Br-cAMP et de tRA induit aussi une re-localisation nucléaire normale de la p53 initialement retrouvée séquestrée dans le cytoplasme et un rétablissement de son mécanisme de dégradation par le pro-oncogène Mdm2. Ces critères, soit l'émission des neurites, la limitation de la prolifération cellulaire accompagnée d'une diminution de l'expression de l'oncogène N-myc et de l'expression des marqueurs moléculaires neuronaux sont les caractéristiques d'une progression normale de la différenciation neuronale dans le système nerveux périphérique. Ces résultats nous permettent de conclure que des cellules de neuroblastomes très agressives (comme celle de la lignée IMR-32) sont cependant

capables de progresser dans leur programme de maturation moyennant un traitement adéquat. Cette progression s'accompagne d'un retour à une croissance et une morphologie quasi-régulière.

Nous avons aussi démontré que chez les cellules de neuroblastome IMR-32, l'induction de la différenciation morphologique et moléculaire par un traitement avec une combinaison du 8-Br-cAMP et du tRA augmente le profil d'expression de la Cx43, module les JICGs et contribue à l'ouverture des canaux jonctionnels. Cette augmentation du couplage cellulaire durant la différenciation a été retrouvée reliée à la distribution spatiale de la Cx43 qui se re-localise sur la membrane cellulaire ou elle peut former des canaux de type gap.

D'après la littérature, les jonctions communicantes de types gap peuvent être régulées par plusieurs protéines kinases dont la PKA qui est activée lors de l'induction de la différenciation (Trosko et al. 2000b; Lampe et al. 2000). En effet, la Cx43 renferme plusieurs sites de phosphorylation au niveau de la partie C-terminale. Ces sites sont des consensus d'acides aminés pour la phosphorylation par la PKA, la PKC, la MAPK et l'oncogène pp60src (Elcock et al. 2000; Doble et al. 2000). Dans le but de confirmer l'implication d'une ou l'autre de ces kinases dans l'induction de la différenciation des cellules de neuroblastomes IMR-32, nous avons démontré que l'inhibition de la PKC en général et des PKC Alpha, Beta et Mu, en particulier par l'inhibiteur spécifique Go6976, a permis la re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique ainsi que l'augmentation de la perméabilité jonctionnelle. Ceci suggère que les JICGs sont régulées par les PKCs Alpha et/ou Beta et/ou Mu soit au niveau de l'assemblage de la connexines en connexons, et/ou celui du transfert des connexons de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique. Cependant, la PKC, contrairement à la PKA, n'a pas d'effet sur la régulation de l'expression de la Cx43.

Les études réalisées sur l'effet de la famille des MAP kinases soit la ERK1/2 et la p38 sur la modulation des jonctions intercellulaires de types gap ont révélé que seule la p38 est impliquée dans la régulation des jonctions gap dans les cellules de

neuroblastomes IMR-32. En effet, l'inhibition de la p38 par son inhibiteur spécifique SB202190 entraîne une augmentation de la perméabilité jonctionnelle et une translocation de la Cx43 du cytoplasme vers la membrane, associée à l'induction de l'apoptose. La ERK1/2, par contre, ne semblent pas avoir d'effet ni sur le couplage cellulaire ni sur la localisation de la Cx43.

Dans la thérapie des neuroblastomes, deux stratégies peuvent être privilégiées: l'induction de la différenciation et l'induction de l'apoptose. Les céramides sont des produits naturels du métabolisme des cellules neurales qui contribuent à l'un ou l'autre de ces processus selon leurs concentrations intracellulaires. La voie des céramides a donc été explorée dans les neuroblastomes. L'effet de C2-cér sur la prolifération, l'apoptose et la modulation des jonctions intercellulaires de types gap a été étudiée dans la lignée de neuroblastomes IMR-32. Nous avons confirmé que l'effet des céramides dépend de la concentration exogène utilisée. En effet, une concentration de 25 μM de C2-Cér induit un arrêt de la prolifération tandis qu'une concentration de 100 μM induit l'apoptose. En plus, nos résultats indiquent que l'action de 25 μM de C2-cér sur la régulation de la prolifération des cellules IMR-32 se fait à travers la voie de signalisation de la PKC Alpha.

Afin de compléter cette étude, il a été essentiel de vérifier si l'effet des céramides sur la prolifération et l'apoptose passe par les JICGs comme c'est le cas d'autres composés. Nous avons trouvé que ni la concentration de C2-cér qui induit l'arrêt de la croissance (25 μM), ni celle qui entraîne la mort cellulaire programmée (100 μM) ne provoquent de changement au niveau de l'expression de la Cx43 et de la perméabilité jonctionnelle. Ceci suggère que l'effet des céramides ne passe pas à travers les JICGs pour induire ces événements cellulaires.

Même si le traitement du neuroblastome n'est encore qu'une perspective lointaine, ces travaux ont d'ores et déjà des conséquences directes. Jusqu'ici, beaucoup de cas d'échec dans le traitement des neuroblastomes avaient des causes inconnues. Les études réalisées sur les lignées de neuroblastome révèlent une aberration de la localisation

de la Cx43 qui pourrait expliquer certains cas de rejet de la chimiothérapie. Toutefois, les fonctions physiologiques des communications jonctionnelles et les mécanismes moléculaires qui lient les changements de ces communications à ceux de diverses fonctions cellulaires sont mal comprises. De même, nous savons encore peu de chose sur les rapports qui existent entre les communications cellulaires et les nombreux autres mécanismes qui coordonnent le fonctionnement des tumeurs.

Les observations récentes réalisées sur les neuroblastomes suggèrent cependant qu'une localisation adéquate des connexines est fondamentale dans le rétablissement du couplage jonctionnel et de l'homéostasie cellulaire qui lui est associée. Notre étude a permis d'orienter les recherches destinées à élucider chacun des mécanismes qui contrôlent et lient les JICGs à la croissance. A plus long terme, ces conclusions permettront de cibler les voies métaboliques qui conduisent au contrôle de la prolifération des cellules de neuroblastomes via les communications intercellulaires.

6. LISTE DES RÉFÉRENCES

Abdennebi, M., H. Boussen, L. Harzallah, O. Daldoul, A. Ghanem, A. Gamoudi, F. Ben Slimene, K. Rahal, A. El May, F. Ben Ayed, et F. Guemira. 2000. The use of neuron specific enolase in the prognosis and followup of neuroblastoma in children. Results of a retrospective series of 21 patients. *Tunis. Med.* **78**:106-108.

Abousalham, A., C. Liossis, L. O'Brien, et D.N. Brindley. 1997. Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J. Biol. Chem.* **272**:1069-1075.

Abousalham, A., J. Nari, M. Teissere, N. Ferte, G. Noat, et R. Verger. 1997. Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles. *Eur. J. Biochem.* **248**:374-379.

Aggarwal, B.B. et M. Higuchi. 1997. Role of ceramide in tumour necrosis factor-mediated apoptosis and nuclear factor-kappa B activation. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:1166-1171.

Ambros, I.M., A. Attarbaschi, S. Rumpler, A. Luegmayr, E. Turkof, H. Gadner, et P.F. Ambros. 2001. Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro. *Med. Pediatr. Oncol.* **36**:163-168.

Andreeva, A.Y., E. Krause, E.C. Muller, I.E. Blasig, et D.I. Utepbergenov. 2001. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J. Biol. Chem.* **276**:38480-38486.

Aoyama, M., K. Asai, T. Shishikura, T. Kawamoto, T. Miyachi, T. Yokoi, H. Togari, Y. Wada, T. Kato, et A. Nakagawara. 2001. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* **164**:51-60.

Armour, C., K. Garson, et M.W. McBurney. 1999. Cell-cell interaction modulates myoD-induced skeletal myogenesis of pluripotent P19 cells in vitro. *Exp. Cell Res.* **251**:79-91.

Aubry, S. et J. Charron. 2000. N-Myc shares cellular functions with c-Myc. *DNA Cell Biol.* **19**:353-364.

Azar, C., N.J. Scavarda, C.P. Reynolds, et G.M. Brodeur. 1991. Multiple defects of the nerve growth factor receptor in human neuroblastomas. *Prog. Clin. Biol. Res.* **366**:219-226.

Azar, C.G., N.J. Scavarda, A. Nakagawara, et G.M. Brodeur. 1994. Expression and function of the nerve growth factor receptor (TRK-A) in human neuroblastoma cell lines. *Prog. Clin. Biol. Res.* **385**:169-175.

Azar, C.G., N.J. Scavarda, C.P. Reynolds, et G.M. Brodeur. 1990. Multiple defects of the nerve growth factor receptor in human neuroblastomas. *Cell Growth Differ.* **1**:421-428.

Baker, D.L., U.R. Reddy, D. Pleasure, C.L. Thorpe, A.E. Evans, P.S. Cohen, et A.H. Ross. 1989. Analysis of nerve growth factor receptor expression in human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cancer Res.* **49**:4142-4146.

Ballou, L.R., S.J. Lauderkind, E.F. Rosloniec, et R. Raghow. 1996. Ceramide signalling and the immune response. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**:273-287.

Bani-Yaghoub, M., J.F. Bechberger, T.M. Underhill, et C.C. Naus. 1999. The effects of gap junction blockage on neuronal differentiation of human NTera2/clone D1 cells. *Exp. Neurol.* **156**:16-32.

Bannerman, P., W. Nichols, S. Puhalla, T. Oliver, M. Berman, et D. Pleasure. 2000. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J. Neurosci. Res.* **61**:605-615.

Banoub, R.W., M. Fernstrom, A.M. Malkinson, et R.J. Ruch. 1996. Enhancement of gap junctional intercellular communication by dibutyryl cyclic AMP in lung epithelial cells. *Anticancer Res.* **16**:3715-3719.

Barry, O.P. et M.G. Kazanietz. 2001. Protein kinase c isozymes, novel phorbol ester receptors and cancer chemotherapy. *Curr. Pharm.* **7**:1725-1744.

Basu, S. et R. Kolesnick. 1998. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* **17**:3277-3285.

Behrens, M.M., U. Strasser, J.Y. Koh, B.J. Gwag, et D.W. Choi. 1999. Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* **94**:917-927.

Belbaraka, L. 2002. Growth, Differentiation and Cell-Cell Coupling in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. Thèse de doctorat présenté à l'université d'Ottawa.

Bennett, A.M. et N.K. Tonks. 1997. Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* **278**:1288-1291.

Bergoffen, J., S.S. Scherer, S. Wang, M.O. Scott, L.J. Bone, D.L. Paul, K. Chen, M.W. Lensch, P.F. Chance, et K.H. Fischbeck. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**:2039-2042.

Bernard, O., J. Drago, et H. Sheng. 1992. L-myc and N-myc influence lineage determination in the central nervous system. *Neuron* **9**:1217-1224.

Berra, E., M.T. Diaz-Meco, et J. Moscat. 1998. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:10792-10797.

Berthoud, V.M. et J.C. Saez. 1993. Changes in connexin43, the gap junction protein of astrocytes, during development of the rat pineal gland. *J. Pineal. Res.* **14**:67-72.

Beyer, E.C., J. Kistler, D.L. Paul, et D.A. Goodenough. 1989. Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J. Cell Biol.* **108**:595-605.

Beyer, E.C., L.M. Davis, J.E. Saffitz, et R.D. Veenstra. 1995. Cardiac intercellular communication: consequences of connexin distribution and diversity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**:415-425.

Beyer, EC. 1993. Gap junctions. *Int. Rev. Cytol.* **137**:1-37.

Birkenkamp, K.U., W.H. Dokter, M.T. Esselink, L.J. Jonk, W. Kruijer, et E. Vellenga. 1999. A dual function for p38 MAP kinase in hematopoietic cells: involvement in apoptosis and cell activation. *Leukemia* **13**:1037-1045.

Black, C.T. et G.M. Haase. 1999. Neuroblastoma and other adrenal tumors. In *The Surgery of Childhood tumors* (Carachi R., Azmi A. and Grosfeld, J.L., eds.), London, pp. 140-177.

Black, C.T. et J.B. Atkinson. 1997. Neuroblastoma. *Semin. Pediatr. Surg.* **6**:2-10.

Blagosklonny, M.V. 2000a. The dilemma of apoptosis in myelodysplasia and leukemia: a new promise of therapeutic intervention? *Leukemia* **14**:2017-2018.

Blagosklonny, M.V. 2000b. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* **14**:1502-1508.

Blagosklonny, M.V. 2000c. Spotlight on apoptosis. Introduction. *Leukemia* **14**:1500-1501.

Blazquez, C., I. Galve-Roperh, et M. Guzman. 2000. De *nov*o-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* **14**:2315-2322.

Boglari, G. et J. Szeberenyi. 2001. Nerve growth factor in combination with second messenger analogues causes neuronal differentiation of PC-12 cells expressing a dominant inhibitory Ras protein without inducing activation of extracellular signal-regulated kinases. *Eur. J. Neurosc.* **4**:1445-1454.

Bogoyevitch, M.A. 2000. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **45**:826-842.

Boix, J., N. Lecha, V.J. Yuste, et J.X. Comella. 1997. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology* **36**:811-821.

Bonni, A., A. Brunet, A.E. West, S.R. Datta, M.A. Takasu, et M.E. Greenberg. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**:1358-1362.

Borgatti, P., M. Mazzoni, C. Carini, L.M. Neri, M. Marchisio, L. Bertolaso, M. Previati, G. Zauli, et S. Capitani. 1996. Changes of nuclear protein kinase C activity and isotype composition in PC-12 cell proliferation and differentiation. *Exp. Cell Res.* **224**:72-78.

Boss, V., J.D. Roback, A.N. Young, L.J. Roback, D.M. Weisenhorn, R. Medina-Flores, et B.H. Wainer. 2001. Nerve growth factor, but not epidermal growth factor, increases Fra-2 expression and alters Fra-2/JunD binding to AP-1 and CREB binding elements in pheochromocytoma (PC-12) cells. *J. Neurosci.* **21**:18-26.

Bossart, E. et G. Conti. 1989. Epidermal growth factor stimulates colony formation and non-neuronal marker protein expression by human neuroblastoma in methylcellulose culture. *Anticancer Res.* **9**:1497-1504.

Bowling, N., X. Huang, G.E. Sandusky, R.L. Fouts, K. Mintze, M. Esterman, P.D. Allen, R. Maddi, E. McCall, et C.J. Vlahos. 2001. Protein kinase C-alpha and -epsilon modulate connexin-43 phosphorylation in human heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**:789-798.

Brisette, J.L., N.M. Kumar, N.B. Gilula, et G.P. Dotto. 1991. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol. Cell Biol.* **11**:5364-5371.

Britz-Cunningham, S.H., M.M. Shah, C.W. Zuppan, et W.H. Fletcher. 1995. Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* **332**:1323-1329.

Brodeur, G.M. 1993. TrkA expression in neuroblastomas: a new prognostic marker with biological and clinical significance. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**:344-345.

Brodeur, G.M. 1994. Molecular pathology of human neuroblastomas. *Semin. Diagn. Pathol.* **11**:118-125.

- Brodeur, G.M.** 1995a. Genetics of embryonal tumours of childhood: retinoblastoma, Wilms' tumour and neuroblastoma. *Cancer Surv.* **25**:67-99.
- Brodeur, G.M.** 1995b. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur. J. Cancer* **31A**:505-510.
- Brodeur, G.M.** 2000. Meeting summary for Advances in Neuroblastoma Research. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**:727-728.
- Brodeur, G.M. et A. Nakagawara.** 1992. Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **14**:111-116.
- Brodeur, G.M. et C.T. Fong.** 1989. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **41**:153-174.
- Brodeur, G.M., A. Nakagawara, D.J. Yamashiro, N. Ikegaki, X.G. Liu, C.G. Azar, C.P. Lee, et A.E. Evans.** 1997a. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J. Neurooncol.* **31**:49-55.
- Brodeur, G.M., J. Pritchard, F. Berthold, N.L. Carlsen, V. Castel, R.P. Castelberry, B. De Bernardi, A.E. Evans, M. Favrot, et F. Hedborg .** 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* **11**:1466-1477.
- Brodeur, G.M., J.M. Maris, D.J. Yamashiro, M.D. Hogarty, et P.S. White.** 1997b. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **19**:93-101.
- Brondello, J.M., A. Brunet, J. Pouyssegur, et F.R. McKenzie.** 1997. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* **272**:1368-1376.
- Brown, A., P. Jolly, et H. Wei.** 1998. Genistein modulates neuroblastoma cell proliferation and differentiation through induction of apoptosis and regulation of tyrosine kinase activity and N-myc expression. *Carcinogenesis* **19**:991-997.
- Bruce-Staskal P.J. et A.H. Bouton.** 2001. PKC-dependent activation of FAK and src induces tyrosine phosphorylation of Cas and formation of Cas-Crk complexes. *Exp. Cell Res.* **264**:296-306.
- Bruzzone, R. et C. Ressot.** 1997. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur. J. Neurosc.* **9**:1-6.

- Bruzzone, R., T.W. White, et D.L. Paul.** 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **238**:1-27.
- Budunova, I.V., L.A. Mittelman, et J. Miloszevska.** 1994. Role of protein kinase C in the regulation of gap junctional communication. *Teratog. Carcinog. Mutagen* **14**:259-270.
- Burchill, S.A., P.A. Berry, et I.J. Lewis.** 1995a. Activation of p21ras by nerve growth factor in neuroblastoma cells. *J. Neurol. Sci.* **133**:3-10.
- Burchill, S.A., P.A. Berry, et I.J. Lewis.** 1995b. Effect of retinoic acid on p21ras and regulators of its activity in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* **31**:476-481.
- Burgen, A.S.** 2000. Targets of drug action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**:1-16.
- Burke, R.E. et N.G. Kholodilov.** 1998. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? *Ann. Neurol.* **44**:S126-S133.
- Bursztajn, S., J.J. Feng, A. Nanda, et S.A. Berman.** 2001. Differential responses of human neuroblastoma and glioblastoma to apoptosis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **91**:57-72.
- Cacace, A.M., M. Ueffing, A. Philipp, E.K. Han, W. Kolch, et I.B. Weinstein.** 1996. PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* **13**:2517-2526.
- Cacace, A.M., S.N. Guadagno, R.S. Krauss, D. Fabbro, et I.B. Weinstein.** 1993. The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* **8**:2095-2104.
- Cai, J., W.G. Jiang, et R.E. Mansel.** 1998. Gap junctional communication and the tyrosine phosphorylation of connexin 43 in interaction between breast cancer and endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* **1**:273-278.
- Camps, M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Antonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, et S. Arkinstall.** 1998a. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* **280**:1262-1265.
- Camps, M., C. Chabert, M. Muda, U. Boschert, C. Gillieron, et S. Arkinstall.** 1998b. Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC-12. *FEBS Lett.* **425**:271-276.

Cao, F., R. Eckert, C. Elfgang, J.M. Nitsche, S.A. Snyder, D.F. H-ulser, K. Willecke, et B.J. Nicholson. 1998. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* **111**:31-43.

Carricaburu, V. et B. Fournier. 2001. Phosphoinositide fatty acids regulate phosphatidylinositol 5-kinase, phospholipase C and protein kinase C activities. *Eur. J. Biochem.* **268**:1238-1249.

Carter, C.A. 2000. Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr. Drug Targets* **1**:163-183.

Carystinos, G.D., M.A. Alaoui-Jamali, J. Phipps, L. Yen, et G. Batist. 2001. Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **47**:126-132.

Castaigne, S., P. Lefebvre, C. Chomienne, E. Suc, F. Rigal-Huguet, C. Gardin, A. Delmer, E. Archimbaud, H. Tilly, et M. Janvier. 1993. Effectiveness and pharmacokinetics of low-dose all-trans retinoic acid (25 mg/m²) in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **82**:3560-3563.

Castel, V., P. Garcia-Miguel, A. Canete, C. Melero, A. Navajas, S. Navarro, et M.D. Badal. 1999. Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting. *Eur. J. Cancer* **35**:606-611.

Castillo, C., F. Carreno, G.M. Villegas, et R. Villegas. 2001. Ionic currents in PC-12 cells differentiated into neuron-like cells by a cultured-sciatic nerve conditioned medium. *Brain Res.* **911**:181-192.

Castleberry, R.P. 1997a. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr. Clin. North Am.* **44**:919-937.

Castleberry, R.P. 1997b. Neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* **33**:1430-1437.

Castleberry, R.P. 1999. Predicting outcome in neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **340**:1992-1993.

Cepeda, C., J.P. Walsh, W. Peacock, N.A. Buchwald, et M.S. Levine. 1993. Dye-coupling in human neocortical tissue resected from children with intractable epilepsy. *Cereb. Cortex* **3**:95-107.

Cerda, S.R., M. Bissonnette, B. Scaglione-Sewell, M.R. Lyons, S. Khare, R. Mustafi, et T.A. Brasitus. 2001. PKC-delta inhibits anchorage-dependent and -independent growth, enhances differentiation, and increases apoptosis in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* **120**:1700-1712.

Cesaro, P., E. Raiteri, M. Demoz, R. Castino, F.M. Baccino, G. Bonelli, et C. Isidoro. 2001. Expression of protein kinase C beta1 confers resistance to TNFalpha and paclitaxel-induced apoptosis in HT-29 colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **93**:179-84.

Chambery, D., B. De Galle, et S. Babajko. 1998. Retinoic acid stimulates IGF binding protein (IGFBP)-6 and depresses IGFBP-2 and IGFBP-4 in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Endocrinol.* **159**:227-232.

Chambery, D., B. De Galle, E. Ehrenborg, et S. Babajko. 2000. Multi-hormonal regulation of IGFBP-6 expression in human neuroblastoma cells. *Growth Horm. IGF. Res.* **10**:349-359.

Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**:940-954.

Chao, M. 1992. Neutrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* **9**: 583-593.

Chaumontet, C., C. Droumaguet, V. Bex, C. Heberden, I. Gaillard-Sanchez, et P. Martel. 1997. Flavonoids (apigenin, tangeretin) counteract tumor promoter-induced inhibition of intercellular communication of rat liver epithelial cells. *Cancer Lett.* **114**: 207-210.

Chen, J.S., M.Q. Chai, H.H. Chen, S. Zhao, et J.G. Song. 2000. Regulation of phospholipase D activity et ceramide production in daunorubicin-induced apoptosis in A-431 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**:219-232.

Chen, Z.Q., D. Lefebvre, X.H. Bai, A. Reaume, J. Rossant, et S.J. Lye. 1995. Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *J. Biol. Chem.* **270**:3863-3868.

Cheung, N.K.V., S.D.J. Yeh, et B.H. Kushner. 1994. Phase I study of radioimmunotherapy of neuroblastoma using iodine 131 labeled 3F9. *Prog. Clin. Biol. Res.* **385**:328-330.

Chmura, S.J., E. Nodzenski, M.A. Crane, S. Virudachalam, D.E. Hallahan, R.R. Weichselbaum, et J. Quintans. 1996a. Cross-talk between ceramide and PKC activity in the control of apoptosis in WEHI-231. *Adv. Exp. Med. Biol.* **406**:39-55.

Chmura, S.J., E. Nodzenski, R.R. Weichselbaum, et J. Quintans. 1996b. Protein kinase C inhibition induces apoptosis and ceramide production through activation of a neutral sphingomyelinase. *Cancer Res.* **56**:2711-2714.

Chmura, S.J., H.J. Mauceri, S. Advani, R. Heimann, M.A. Beckett, E. Nodzenski, J. Quintans, D.W. Kufe, et R.R. Weichselbaum. 1997. Decreasing the apoptotic threshold of tumor cells through protein kinase C inhibition and sphingomyelinase activation increases tumor killing by ionizing radiation. *Cancer Res.* **57**:4340-4347.

Cho, Y., M.G. Klein, et D.A. Talmage. 1998. Distinct functions of protein kinase Calpha and protein kinase Cbeta during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Cell Growth Differ.* **9**:147-154.

Cho-Chung, Y.S., Y.G. Park, M. Nesterova, Y.N. Lee, et Y.S. Cho. 2000. CRE-decoy oligonucleotide-inhibition of gene expression and tumor growth. *Mol. Cell Biochem.* **212**:29-34.

Choi, R.C., M.L. Man, K.K. Ling, J. Simon, E.A. Barnard, et K.W. Tsim. 2001. Expression of the P2Y1 nucleotide receptor in chick muscle: its functional role in the regulation of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor. *J. Neurosci.* **21**:9224-9234.

Ciechanover, A., J.A. DiGiuseppe, A.L. Schwartz, et G.M. Brodeur. 1991. Degradation of MYC-N oncoprotein by the ubiquitin system. *Prog. Clin. Biol. Res.* **366**:37-43.

Clairmont, A., D. Tessman, A. Stock, S. Nicolai, W. Stahl, et H. Sies. 1996a. Induction of gap junctional intercellular communication by vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear Induction of gap junctional intercellular communication by vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear vitamin D receptor. *Carcinogenesis* **17**:1389-1391.

Clairmont, A., D. Tessmann, et H. Sies. 1996b. Analysis of connexin43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *FEBS Lett.* **397**:22-24.

Clerk, A., M.A. Bogoyevitch, S.J. Fuller, A. Lazou, P.J. Parker, et P.H. Sugden. 1995. Expression of protein kinase C isoforms during cardiac ventricular development. *Am. J. Physiol.* **269**:H1087-H1097.

Cobb, M.H. 1999. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**:479-500.

Cohen, P., D.B. Rylatt, et G.A. Nimmo. 1977. The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Lett.* **76**:182-186.

Cole, M.D. et S.B. McMahon. 1999. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* **18**:2916-2924.

Coleman, B.A. et P. Taylor. 1996. Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**:4410-4416.

Combaret, V., O. Delattre, J. Benard, et M.C. Favrot. 1998. Biological markers for the prognosis of neuroblastoma: proposal of a method of analysis. *Bull. Cancer* **85**:262-266.

Condorelli, D.F., P. Dell'Albani, G. Mudo, T. Timmusk, et N. Belluardo. 1994. Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents. *J. Neurochem.* **63**:509-516.

Conway, A., N.J. Pyne, et S. Pyne. 2000. Ceramide-dependent regulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal-directed protein kinase in cultured airway smooth muscle cells. *Cell Signal.* **12**:737-743.

Cook, J.G., L. Bardwell, et J. Thorner. 1997. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**:85-88.

Cooper, C.D., J.L. Solan, M.K. Dolejsi, et P.D. Lampe. 2000. Analysis of connexin phosphorylation sites. *Methods* **20**:196-204.

Cooper, M.J., G.M. Hutchins, P.S. Cohen, L.J. Helman, et M.A. Israel. 1991. Neuroblastoma cell lines mimic chromaffin neuroblast maturation. *Prog. Clin. Biol. Res.* **366**:343-350.

Corvi, R., L. Savelyeva, S. Breit, A. Wenzel, R. Handgretinger, J. Barak, M. Oren, L. Amler, et M. Schwab. 1995. Non-syntenic amplification of Mdm2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* **10**:1081-1086.

Corvi, R., L. Savelyeva, et M. Schwab. 1997. Patterns of oncogene activation in human neuroblastoma cells. *J. Neurooncol.* **31**:25-31.

Crow, D.S., E.C. Beyer, D.L. Paul, S.S. Kobe, et A.F. Lau. 1990. Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **10**:1754-1763.

Cuenda, A., P. Cohen, V. Buee-Scherrer, et M. Goedert. 1997. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* **16**:295-305.

- Cuvillier, O., D.S. Rosenthal, M.E. Smulson, et S. Spiegel.** 1998. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**:2910-2916.
- De Leon, J.R., P.M. Buttrick, et G.I. Fishman.** 1994. Functional analysis of the connexin43 gene promoter in vivo and in vitro. *J. Mol. Cell Cardiol.* **26**:379-389.
- Deacon, E.M., J. Pongracz, G. Griffiths, et J.M. Lord.** 1997. Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mol. Pathol.* **50**:124-131.
- Deacon, J.M., P.A. Wilson, et M.J. Peckman.** 1985. The radiobiology of human neuroblastoma. *Radiat. Oncol.* **3**:201-209.
- Dean, N., R. McKay, L. Miraglia, R. Howard, S. Cooper, J. Giddings, P. Nicklin, L. Meister, R. Ziel, T. Geiger, M. Muller, et D. Fabbro.** 1996. Inhibition of growth of human tumor cell lines in nude mice by an antisense of oligonucleotide inhibitor of protein kinase C- α expression. *Cancer Res.* **56**:3499-3507.
- Dempsey, E.C., A.C. Newton, D. Mochly-Rosen, A.P. Fields, M.E. Reyland, P.A. Insel, et R.O. Messing.** 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:L429-L438.
- Dent, P., W.D. Jarvis, M.J. Birrer, P.B. Fisher, et S. Grant.** 1998. The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo-sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. *Leukemia* **12**:1843-1850.
- Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I.H. Wu, J. Han, R.J. Ulevitch, et R.J. Davis.** 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**:682-685.
- Dhanasekaran, N.** 1998. Cell signaling: an overview. *Oncogene* **17**:1329-1330.
- Dhanasekaran, N. et R.E. Premkumar.** 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**:1447-1455.
- Di Bartolomeo, S. et A. Spinedi.** 2001. Potentiation of okadaic acid-induced ceramide elevation but not apoptosis by inhibition of glucosylceramide synthase in human neuroepithelioma cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**:851-856.
- Doble, B.W., P. Ping, et E. Kardami.** 2000. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ. Res.* **86**:293-301.

Doble, B.W., P. Ping, et E. Kardami. 2000. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ. Res.* **86**:293-301.

Donahue, L.M., D.R. Webster, I. Martinez, et D.C. Spray. 1998. Decreased gap-junctional communication associated with segregation of the neuronal phenotype in the RT4 cell-line family. *Cell. Tissue Res.* **292**:27-35.

Downing, S.R., P. Jackson, et P.J. Russell. 2001. Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression. a review of the evidence. *Urol. Oncol.* **6**:103-110.

Duan, W., Z. Zhang, D.M. Gash, et M.P. Mattson. 1999. Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **46**:587-597.

DuBois, S.G., Y. Kalika, J.N. Lukens, G.M. Brodeur, R.C. Seeger, J.B. Atkinson, G.M. Haase, C.T. Black, C. Perez, H. Shimada, R. Gerbing, D.O. Stram, et K.K. Matthay. 1999. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **21**:181-189.

Dubourg, O., S. Tardieu, N. Birouk, R. Gouider, J.M. Leger, T. Maissonobe, A. Brice, P. Bouche, et E. LeGuern. 2001. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* **124**:1958-67.

Eggert, A., H. Sieverts, N. Ikegaki, et G.M. Brodeur. 2000d. p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**:573-576.

Eggert, A., M.A. Grotzer, N. Ikegaki, X.G. Liu, A.E. Evans, et G.M. Brodeur. 2000a. Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**:569-572.

Eggert, A., N. Ikegaki, X. Liu, T.T. Chou, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, et G.M. Brodeur. 2000b. Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **19**:2043-2051.

Eggert, A., N. Ikegaki, X.G. Liu, et G.M. Brodeur. 2000c. Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Clin. Pediatr.* **212**:200-205.

Eggert, A., N. Ikegaki, X.G. Liu, T.T. Chou, et G.M. Brodeur. 2001. TrkA signal transduction pathways in neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **36**:108-110.

- Eggert, A., R. Ho, N. Ikegaki, X.G. Liu, et G.M. Brodeur.** 2000e. Different effects of TrkA expression in neuroblastoma cell lines with or without MYCN amplification. *Med .Pediatr. Oncol.* **35**:623-627.
- Elcock, F.J., E. Deag, R.A. Roberts, et J.K. Chipman.** 2000. Nafenopin causes protein kinase C-mediated serine phosphorylation and loss of function of connexin 32 protein in rat hepatocytes without aberrant expression or localization. *Toxicol. Sci.* **56**:86-94.
- Encinas, M., M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Cena, C. Gallego, et J.X. Comella.** 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* **75**:991-1003.
- Engedal, N. et F. Saatcioglu.** 2001. Ceramide-induced cell death in the prostate cancer cell line LNCaP has both necrotic and apoptotic features. *Prostate* **46**:289-297.
- Enomoto, T. et H. Yamasaki.** 1984. Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding nontransformed BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.* **44**:5200-5203.
- Enslen, H., J. Raingeaud, et R.J. Davis.** 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* **273**:1741-1748.
- Evans, A.E.** 1980. Staging and treatment of neuroblastoma. *Cancer* **45**:1799-1802.
- Ewart, J.L., M.F. Cohen, R.A. Meyer, G.Y. Huang, A. Wessels, R.G. Gourdie, A.J. Chin, S.M. Park, B.O. Lazatin, S. Villabon, et C.W. Lo.** 1997. Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* **124**:1281-1292.
- Falk, M.M.** 2000. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. Cell Biol.* **79**:564-574.
- Farooqui, S.M.** 1994. Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. *Life Sci.* **55**:1887-1893.
- Felipo, V., M.D. Minana, et S. Grisolia.** 1990. A specific inhibitor of protein kinase C induces differentiation of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**:9599-9601.
- Ferrer, I. et R. Blanco.** 2000. N-myc and c-myc expression in Alzheimer disease, Huntington disease and Parkinson disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **77**:270-276.

- Filson, A.J., R. Azarnia, E.C. Beyer, W.R. Loewenstein, et J.S. Brugge.** 1990. Tyrosine phosphorylation of a gap junction protein correlates with inhibition of cell-to-cell communication. *Cell. Growth Differ.* **1**:661-668.
- Fishman, G.I., R.L. Eddy, T.B. Shows, L. Rosenthal, et L.A. Leinwand.** 1991. The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics* **10**:250-256.
- Flamigni, F., A. Facchini, E. Giordano, B. Tantini, et C. Stefanelli.** 2001a. Signaling pathways leading to the induction of ornithine decarboxylase: opposite effects of p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p38 MAPK inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **61**:25-32.
- Flamigni, F., A. Facchini, I. Stanic, B. Tantini, F. Bonavita, et C. Stefanelli.** 2001b. Control of survival of proliferating L1210 cells by soluble guanylate cyclase and p44/42 mitogen-activated protein kinase modulators. *Biochem. Pharmacol.* **62**:319-328.
- Foley, J., S.L. Cohn, H.R. Salwen, D. Chagnovich, J. Cowan, K.L. Mason, et L.M. Parysek.** 1991. Differential expression of N-myc in phenotypically distinct subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* **51**:6338-6345.
- Fong, C.T., N.C. Dracopoli, P.S. White, P.T. Merrill, R.C. Griffith, D.E. Housman, et G.M. Brodeur.** 1989. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:3753-3757.
- Fournier, D.B., M. Chisamore, J.R. Lurain, A.W. Rademaker, V.C. Jordan, et D.A. Tonetti.** 2001. Protein kinase C alpha expression is inversely related to ER status in endometrial carcinoma: possible role in AP-1-mediated proliferation of ER-negative endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* **81**:366-372.
- Frasch, S.C., J.A. Nick, V.A. Fadok, D.L. Bratton, G.S. Worthen, et P.M. Henson.** 1998. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **273**:8389-8397.
- Fromaget, C., A. Aoumari, et D. Gros.** 1992. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation* **51**:9-20.
- Galderisi, U., A. Cascino, et A. Giordano.** 1999a. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J. Cell Physiol.* **181**:251-257.
- Galderisi, U., G. Di Bernardo, M. Cipollaro, F.P. Jori, E. Piegari, A. Cascino, G. Peluso, et M.A. Melone.** 1999b. Induction of apoptosis and differentiation in

neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein. *J. Cell Biochem.* **74**:313-322.

Galderisi, U., G. Di Bernardo, M. Cipollaro, G. Peluso, A. Cascino, R. Cotrufo, et M.A. Melone. 1999c. Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *J. Cell Biochem.* **73**:97-105.

Galve-Roperh, I., A. Haro, et I. Diaz-Laviada. 1997. Ceramide-induced translocation of protein kinase C zeta in primary cultures of astrocytes. *FEBS Lett.* **415**:271-274.

Garzotto, M., M. White-Jones, Y. Jiang, D. Ehleiter, W.C. Liao, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, et R. Kolesnick. 1998. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis in LNCaP cells is mediated through ceramide synthase. *Cancer Res.* **58**:2260-2264.

Gasparini, P., R. Rabionet, G. Barbuji, S. Melchionda, M. Petersen, K. Brondum-Nielsen, A. Metspalu, E. Oitmaa, M. Pisano, P. Fortina, L. Zelante, et X. Estivill. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**:19-23.

Gaub, M.P., Y. Lutz, N.B. Ghyselinck, I. Scheuer, V. Pfister, P. Chambon, et C. Rochette-Egly. 1998. Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:1103-1111.

Ghatan, S., S. Larner, Y. Kinoshita, M. Hetman, L. Patel, Z. Xia, R.J. Youle, et R.S. Morrison. 2000. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J. Cell Biol.* **150**:335-347.

Giannini, F., R. Maestro, T. Vukosavljevic, F. Pomponi, et M. Boiocchi. 1997a. All-trans, 13-cis and 9-cis retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines: implications for *in vivo* retinoic acid use. *Int. J. Cancer* **70**:194-200.

Giannini, G., M.I. Dawson, X. Zhang, et C.J. Thiele. 1997b. Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **272**:26693-26701.

Ginns, E.I., M. Rehavi, B.M. Martin, M. Weller, K.L. O'Malley, M.E. LaMarca, C.G. McAllister, et S.M. Paul. 1988. Expression of human tyrosine hydroxylase cDNA in invertebrate cells using a baculovirus vector. *J. Biol. Chem.* **263**:7406-7410.

Girgert, R., P. Schweizer, et J. Schwable. 2000. Neuroblastoma: induction of differentiation (Part I). Basical science in pediatric surgery. *Eur. J. Pediatr. Surg.* **10**:79-82.

Godwin, A.J., L.M. Green, M.P. Walsh, J.R. McDonald, D.A. Walsh, et W.H. Fletcher. 1993. In situ regulation of cell-cell communication by the 8-Br-cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell Biochem.* **127**:293-307.

Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, et P. Cohen. 1997a. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* **16**:3563-3571.

Goedert, M., M. Hasegawa, R. Jakes, S. Lawler, A. Cuenda, et P. Cohen. 1997b. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* **409**:57-62.

Goldberg, G.S., J.F. Bechberger, Y. Tajima, M. Merritt, Y. Omori, M.A. Gawinowicz, R. Narayanan, Y. Tan, Y. Sanai, H. Yamasaki, C.C. Naus, H. Tsuda, et B.J. Nicholson. 2000. Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. *Cancer Res.* **60**:6018-6026.

Goldkorn, T., N. Balaban, M. Shannon, V. Chea, K. Matsukuma, D. Gilchrist, H. Wang, et C. Chan. 1998. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.* **111**:3209-3220.

Goldman, S.C., C.Y. Chen, T.J. Lansing, T.M. Gilmer, et M.B. Kastan. 1996. The p53 signal transduction pathway is intact in human neuroblastoma despite cytoplasmic localization. *Am. J. Pathol.* **148**:1381-1385.

Gomez, J., E. Boutou, C. Hurel, A. Mamalaki, S. Kentroti, A. Vernadakis, et R. Matsas. 1998. Overexpression of the neuron-specific molecule BM88 in mouse neuroblastoma cells: altered responsiveness to growth factors. *J. Neurosc. Res.* **51**:119-128.

Goodenough, D.A., J.A. Goliger, et D.L. Paul. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:475-502.

Gorman, A.M., S. Orrenius, et S. Ceccatelli. 1998. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* **9**:R49-R55.

Gottlieb T.M. et M. Oren. 1996. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**:77-102.

Graf, B. et J. Bescol-Liversac. 1975. Variation of the mitotic coefficient and biochemical specialization. Study of the differentiation of the liver parenchyma in the goose during the embryonal period and after hatching. *Bull. Assoc. Anat.* **59**:169-76.

Green, D. et G. Kroemer. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8**:267-271.

Grosfeld, J.L. 1998. Neuroblastoma. In *Pediatric surgery* (O'Neill J.A., Rowe M.I. and Grosfeld, J.L., eds.), CV Mosby, St Louis, pp. 405-419.

Grosfeld, J.L. 1999. Risk-based management: current concepts of treating malignant solid tumors of childhood. *J. Am. Cell. Surg.* **189**:407-425.

Grosfeld, J.L. 2000. Risk-based management of solid tumors in children. *Am. J. Surg.* **180**:322-327.

Grosfeld, J.L., F.J. Rescorla, K.W. West, et J. Goldman. 1993. Neuroblastoma in the first year of life: clinical and biologic factors influencing outcome. *Semin. Pediatr. Surg.* **2**:37-46.

Grummer, M.A. et R.D. Zachman. 2000a. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**:829-836.

Grummer, M.A., Z.N. Salih, et R.D. Zachman. 2000b. Effect of retinoic acid and ethanol on retinoic acid receptor beta and glial fibrillary acidic protein mRNA expression in human astrocytoma cells. *Neurosc. Lett.* **294**:73-76.

Guarneri, P., C. Cascio, T. Piccoli, F. Piccoli, et R. Guarneri. 2000. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J. Neurosc. Res.* **60**:656-665.

Gubkina, O., H. Cremer, et G. Rougon. 2001. Mutation in the neural cell adhesion molecule interferes with the differentiation of anterior pituitary secretory cells. *Neuroendocrinology* **74**:335-346.

Gudas, L.J. 1994. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* **269**:15399-15402.

Guerrier, A., P. Fonlupt, I. Morand, R. Rabilloud, C. Audebet, V. Krutovskikh, D. Gros, B. Rousset, et Y. Munari-Silem. 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**:2609-2617.

Gulbins, E., B. Brenner, K. Schlottmann, J. Welsch, H. Heinle, U. Koppenhoefer, O. Linderkamp, K.M. Coggeshall, et F. Lang. 1996a. Fas-induced programmed cell death is mediated by a Ras-regulated O₂- synthesis. *Immunology* **89**:205-212.

Gulbins, E., K.M. Coggeshall, B. Brenner, K. Schlottmann, O. Linderkamp, et F. Lang. 1996b. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**:26389-26394.

Guo, B., M.B. Yin, K. Toth, S. Cao, R.G. Azrak, et Y.M. Rustum. 1999. Dimerization of mitochondrial Bax is associated with increased drug response in Bax-transfected A253 cells. *Oncol. Res.* **11**:91-99.

Guo, H., T. Liu, et J. Gao. 1998. Inhibiting effect of murine double minute-2 oncogene on apoptosis induced by retroviral-mediated wild-type p53. *Chin. Med. J. (Engl.)* **111**:1102-1106.

Guo, Y., C. Martinez-Williams, C.E. Yellowley, H.J. Donahue, et D.E. Rannels. 2001. Connexin expression by alveolar epithelial cells is regulated by extracellular matrix. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **280**:L191-L202

Gupta, M., M.F. Notter, S. Felten, et D.M. Gash. 1985. Differentiation characteristics of human neuroblastoma cells in the presence of growth modulators and antimitotic drugs. *Brain Res.* **351**:21-29.

Gutstein, D.E, G.E. Morley, D. Vaidya, F. Liu, F.L Chen, H. Stuhlmann, et G.I. Fishman. 2001. Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation* **104**:1194-1199.

Guzman, M., I. Galve-Roperh, et C. Sanchez. 2001. Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends. Pharmacol. Sci.* **22**:19-22.

Hall, B.E., S.S. Yang, et D. Bar-Sagi. 2002. Autoinhibition of sos by intramolecular interactions. *Front. Biosci.* **7**:288-294.

Han, G., B. Chang, M.J. Connor, et N. Sidell. 1995. Enhanced potency of 9-cis versus all-trans-retinoic acid to induce the differentiation of human neuroblastoma cells. *Differentiation.* **59**:61-69.

Han, J. et I. Shin. 2000. Ceramide does not inhibit protein kinase C beta-dependent phospholipase D activity stimulated by anti-Fas monoclonal antibody in A20 cells. *Cell Signal* **12**:731-736.

Han, J., Y. Jiang, Z. Li, V.V. Kravchenko, et R.J. Ulevitch. 1997. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**:296-299.

Haneda, M., T. Sugimoto, et R. Kikkawa. 1999. Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **365**:1-7.

Hanna, E.A., S. Umhauer, S.L. Roshong, M.P. Piechocki, M.J. Fernstrom, J.D. Fanning, et R.J. Ruch. 1999. Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* **20**:1369-1373.

Hannun, Y.A. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**:3125-3128.

Hannun, Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**:1855-1859.

Hannun, Y.A. et C. Luberto. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**:73-80.

Hannun, Y.A., C.R. Loomis, A.H.J. Merrill, et R.M. Bell. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J. Biol. Chem.* **261**:12604-12609.

Hannun, Y.A., L.M. Obeid, et R.A. Wolff. 1993. The novel second messenger ceramide: identification, mechanism of action, and cellular activity. *Adv. Lipid Res.* **25**:43-64.

Hanusch, M., W. Stahl, W.A. Schulz, et H. Sies. 1995. Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**:423-428.

Harada-Shiba, M., M. Kinoshita, H. Kamido, et K. Shimokado. 1998. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**:9681-9687.

Hartmann, O., D. Valteau-Couanet, E. Benhamou, G. Vassal, H. Rubie, F. Beaujean, et J. Lemerle. 1997. Stage IV neuroblastoma in patients over 1 year of age at diagnosis: consolidation of poor responders with combined busulfan, cyclophosphamide and melphalan followed by *in vitro* mafosfamide-purged autologous bone marrow transplantation. *Eur. J. Cancer* **33**:2126-2129.

Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, et M. Oren. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**:296-299.

- Heidkamp, M.C., A.L. Bayer, J.L. Martin, et A.M. Samarel.** 2001. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Apoptosis by Protein Kinase C epsilon and delta in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **89**:882-890.
- Herrera, B., M. Fernandez, C. Roncero, J.J. Ventura, A. Porras, A. Valladares, M. Benito, et I. Fabregat.** 2001. Activation of p38MAPK by TGF-beta in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *FEBS Lett.* **499**:225-229.
- Hertig, C.M., S. Butz, S. Koch, M. Eppenberger-Eberhardt, R. Kemler, et H.M. Eppenberger.** 1996. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell-cell contact and communication. Formation of two distinct N-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Sci.* **109**:11-20.
- Hertzberg, E.L., J.C. Saez, R.A. Corpina, C. Roy, et J.A. Kessler.** 2000. Use of antibodies in the analysis of connexin 43 turnover and phosphorylation. *Methods* **20**: 129-139.
- Hewson, Q.C., P.E. Lova, A.J. Malcolm, A.D. Pearson, et C.P. Redfern.** 2000. Receptor mechanisms mediating differentiation and proliferation effects of retinoids on neuroblastoma cells. *Neurosc. Lett.* **279**:113-116.
- Hjelmquist, G., J. Andersson, B. Edlund, et L. Engstrom.** 1974. Amino acid sequence of a (32P) phosphopeptide from pig liver pyruvate kinase phosphorylated by cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase and gamma-(32P)ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**:559-563.
- Hoffman, B. et D.A. Liebermann.** 1998. The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene* **17**:3351-3357.
- Hofmann, J.** 1997. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* **11**:649-669.
- Hofmann, J.** 2001. Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**:1-96.
- Hogarty, M.D. et G.M. Brodeur.** 1999. Wild-type sequence of MYCN in neuroblastoma cell lines. *Int. J. Cancer* **80**:630-631.
- Holder, J.W., E. Elmore, et J.C. Barrett.** 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* **53**:3475-3485.

- Hoopes, C.W., M. Taketo, K. Ozato, Q. Liu, T.A. Howard, E. Linney, et M.F. Seldin.** 1992. Mapping of the mouse Rxr loci encoding nuclear retinoid X receptors RXR alpha, RXR beta, and RXR gamma. *Genomics* 14:611-617.
- Hosny, S. et L. Jennes.** 1998. Identification of gap junctional connexin-32 mRNA and protein in gonadotropin-releasing hormone neurons of the female rat. *Neuroendocrinology* 67:101-108.
- Hossain, M.Z. et J.S. Bertram.** 1994a. Retinoids suppress proliferation, induce cell spreading, and up-regulate connexin43 expression only in postconfluent 10T1/2 cells: implications for the role of gap junctional communication. *Cell Growth Differ.* 5:1253-1261.
- Hossain, M.Z., A.B. Jagdale, P. Ao, A. Kazlauskas, et A.L. Boynton.** 1999. Disruption of gap junctional communication by the platelet-derived growth factor is mediated via multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274:10489-10496.
- Hossain, M.Z., J. Peeling, G.R. Sutherland, E.L. Hertzberg, et J.I. Nagy.** 1994b. Ischemia-induced cellular redistribution of the astrocytic junction intercellulaire de type gap protein connexin43 in rat brain. *Brain Res.* 652:311-322.
- Hovland, A.R., P. Nahreini, C.P. Andreatta, J. Edwards-Prasad, et K.N. Prasad.** 2001. Identifying genes involved in regulating differentiation of neuroblastoma cells. *J. Neurosc. Res.* 64:302-310.
- Huang, G.Y., E.S. Cooper, K. Waldo, M.L. Kirby, N.B. Gilula, et C.W. Lo.** 1998. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J. Cell Biol.* 143:1725-1734.
- Huot, J., F. Houle, S. Rousseau, R.G. Deschesnes, G.M. Shah, et J. Landry.** 1998. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 143:1361-1373.
- Husoy, T., V. Cruciani, T. Sanner, et S.O. Mikalsen.** 2001. Phosphorylation of connexin43 and inhibition of gap junctional communication in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-exposed R6 fibroblasts: minor role of protein kinase CbetaI and mu. *Carcinogenesis* 22:221-231.
- Huwiler, A., B. Johansen, A. Skarstad, et J. Pfeilschifter.** 2001. Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *FASEB J.* 15:7-9.
- Ikeda, H., A. Pastuszko, N. Ikegaki, R.H. Kennett, et D.F. Wilson.** 1994. 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) metabolism and retinoic acid induced differentiation in human neuroblastoma. *Neurochem. Res.* 19:1487-1494.

Inoue, M. et H. Ueda. 2000. Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral mu-opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**:662-669.

Inoue, T., S. Itoh, M. Kobayashi, Y. Kang, R. Matsuo, S. Wakisaka, et T. Morimoto. 1999. Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J. Neurophysiol.* **82**:626-637.

Isaacs, J.S., S. Saito, et L.M. Neckers. 2001. Requirement for HDM2 activity in the rapid degradation of p53 in neuroblastoma. *J. Biol. Chem.* **276**:18497-18506.

Ishikawa, T., K. Umesono, D.J. Mangelsdorf, H. Aburatani, B.Z. Stanger, Y. Shibasaki, M. Imawari, R.M. Evans, et F.A. Takaku. 1990. functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol. Endocrinol.* **4**:837-844.

Jankowska, A., J.K. Blusztajn, et A. Szutowicz. 1997. Activities of enzymes of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in SN56 hybrid cholinergic cell line differentiated by dibutyryl cyclic AMP and all-trans retinoic acid. *Folia Neuropathol.* **35**:247-249.

Jao, H.C., R.C. Yang, H.K. Hsu, et C. Hsu. 2001. The decrease of PKC α is associated with hepatic apoptosis at early and late phases of polymicrobial sepsis. *Shock* **15**:130-134.

Jarvis, W.D., F.A. Fornari, R.S. Traylor, H.A. Martin, L.B. Kramer, R.K. Erukulla, R. Bittman, et S. Grant. 1996. Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **271**:8275-8284.

Jarvis, W.D., S. Grant, et R.N. Kolesnick. 1996. Ceramide and the induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **2**:1-6.

Jayadev, S., B. Liu, A.E. Bielawska, J.Y. Lee, F. Nazaire, M.Y. Pushkareva, L.M. Obeid, et Y.A. Hannun. 1995. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **270**:2047-2052.

Jelinek, T., P. Dent, T.W. Sturgill, et M.J. Weber. 1996. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **16**:1027-1034.

Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J.A. Gegner, S. Lin, et J. Han. 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J. Biol. Chem.* **271**:17920-17926.

- Johns, D.G., A.M. Dorrance, R. Leite, D.S. Weber, et R.C. Webb.** 2000. Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension. *J. Biomed. Sci.* 7:431-443.
- Johns, D.G., J.S. Jin, D.W. Wilde, et R.C. Webb.** 1999. Ceramide-induced vasorelaxation: An inhibitory action on protein kinase C. *Gen. Pharmacol.* 33:415-421.
- Johnson, J.E., J. Giorgione, et A.C. Newton.** 2000. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 39:11360-11369.
- Jones, H.A., S.M. Hahn, E. Bernhard, et W.G. McKenna.** 2001. Ras inhibitors and radiation therapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 11:328-337.
- Jongen, W.M., D.J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T.J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi, et H. Yamasaki.** 1991. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 114:545-555.
- Jordan, K., J.L. Solan, M. Dominguez, M. Sia, A. Hand, P.D. Lampe, et D.W. Laird.** 1999. Trafficking, assembly, and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 10:2033-2050.
- Judware, R. et L.A. Culp.** 1995. Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SK-NSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit. *Oncogene* 11:2599-2607.
- Jun, C.D., C.D. Oh, H.J. Kwak, H.O. Pae, J.C. Yoo, B.M. Choi, J.S. Chun, R.K. Park, et H.T. Chung.** 1999a. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J. Immunol.* 162:3395-3401.
- Jun, C.D., H.O. Pae, H.J. Kwak, J.C. Yoo, B.M. Choi, C.D. Oh, J.S. Chun, S.G. Paik, Y.H. Park, et H.T. Chung.** 1999b. Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol.* 194:36-46.
- Kaneko, M., H. Ohakawa, et M. Iwakawa.** 1997. Is extensive surgery required for treatment of advanced neuroblastoma? *J. Pediatr. Surg.* 32:1616-1619.
- Kanemitsu, M.Y. et A.F. Lau.** 1993. Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* 4:837-848.

Kanemitsu, M.Y., L.W. Loo, S. Simon, A.F. Lau, et W. Eckhart. 1997. Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J. Biol. Chem.* **272**:22824-22831.

Karahashi, H., K. Nagata, K. Ishii, et F. Amano. 2000. A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide-treated macrophage-like cell line, J774.1. *Biochim. Biophys. Acta* **1502**:207-223.

Kato, J. 1999. Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front. Biosci.* **4**:D787-D792.

Keim, D.R., N. Hailat, R. Kuick, C.P. Reynolds, G.M. Brodeur, R.C. Seeger, et S.M. Hanash. 1993. PCNA levels in neuroblastoma are increased in tumors with an amplified N-myc gene and in metastatic stage tumors. *Clin. Exp. Metastasis* **11**:83-90.

Kelsell, D.P. et M.J. Houseman. 2001a. Connexin mutations in skin disease and hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **68**:559-68.

Kelsell, D.P., J. Dunlop, et M.B. Hodgins. 2001b. Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell. Biol.* **11**:2-6.

Kenna, M.A., B.L. Wu, D.A. Cotanche, B.R. Korf, et H.L. Rehm. 2001. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **127**:1037-1042.

Keshelava, N., J.J. Zuo, N.S. Waidyaratne, T.J. Triche, et C.P. Reynolds. 2000. p53 mutations and loss of p53 function confer multidrug resistance in neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**:563-568.

Keshelava, N., J.J. Zuo, P. Chen, S.N. Waidyaratne, M.C. Luna, C.J. Gomer, T.J. Triche, et C.P. Reynolds. 2001. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* **61**:6185-6193.

Kharbanda, S., A. Saleem, Y. Emoto, R. Stone, U. Rapp, et D. Kufe. 1994. Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**:872-878.

Kim, D.Y., Y. Kam, S.K. Koo, et C.O. Joe. 1999. Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**:5581-5587.

Kim, J., J. Lu, et P.G. Quinn. 2000a. Distinct 8-Br-cAMP response element-binding protein (CREB) domains stimulate different steps in a concerted mechanism of transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:11292-11296.

- Kim, K.S., C. Tinti, B. Song, J.F. Cubells, et T.H. Joh.** 1994. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates basal and cyclic AMP-stimulated but not phorbol ester-stimulated transcription of the tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurochem.* **63**:834-842.
- Kim, N.Y., H.O. Pae, T.H. Kang, Y.C. Kim, H.S. Lee, et H.T. Chung.** 2000b. Cyclic adenosine monophosphate inhibits quinolone alkaloid evocarpine-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacol. Toxicol.* **87**:1-5.
- Kim, S.J., H. Kim, et D.J. Pillion.** 1991. Insulin-sensitive myelin basic protein phosphorylation on tyrosine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**:392-400.
- Kim, S.N., S.G. Kim, J.H. Park, M.A. Lee, S.D. Park, et S.H. Hong.** 2000c. Dual anticancer activity of 8-Cl-8-Br-cAMP: inhibition of cell proliferation and induction of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**:404-410.
- Kirchhoff, S., E. Nelles, A. Hagendorff, O. Kruger, O. Traub, et K. Willecke.** 1998. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol.* **8**:299-302.
- Ko, L.J. et C. Prives.** 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**:1054-1072.
- Kogner, P., G. Barbany C. Dominici, M.A. Castello, G. Raschella, et H. Persson.** 1993. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* **53**:2044-2050.
- Komatsu, M., T. Takahashi, T. Abe, I. Takahashi, H. Ida, et G. Takada.** 2001. Evidence for the association of ultraviolet-C and H₂O₂-induced apoptosis with acid sphingomyelinase activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1533**:47-54.
- Kong, A.N., R. Yu, C. Chen, S. Mandlekar, et T. Primiano.** 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* **23**:1-16.
- Konikova. E. et J. Kusenda.** 2001. p53 protein expression in human leukemia and lymphoma cells. *Neoplasma* **48**:290-298.
- Kosako, H., Y. Gotoh, S. Matsuda, M. Ishikawa, et E. Nishida.** 1992. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* **11**:2903-2908.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, et M. Resche-Rigon.** 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**:619-642.

- Krutovskikh, V.A., S.M. Troyanovsky, C. Piccoli, H. Tsuda, M. Asamoto, et H. Yamasaki.** 2000. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* **19**: 505-513.
- Kumar, N.M. et N.B. Gilula.** 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. et N.B. Gilula.** 1996. The gap junction communication channel. *Cell* **84**:381-8
- Kurokawa, K. et J. Kato.** 1998. Cyclic AMP delays G2 progression and prevents efficient accumulation of cyclin B1 proteins in mouse macrophage cells. *Cell Struct. Funct.* **23**:357-365.
- Kurowski, C. et F. Berthold.** 1998. Presence of classical multidrug resistance and P-glycoprotein expression in human neuroblastoma cells. *Ann. Oncol.* **9**:1009-1014.
- Kwak, B.R., M.M. Hermans, H.R. De Jonge, S.M. Lohmann, H.J. Jongsma, et M. Chanson.** 1995. Differential regulation of distinct types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. *Mol. Biol. Cell* **6**:1707-1719.
- Laird, D.W.** 1996. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**:311-318.
- Laird, D.W., M. Castillo, et L. Kasprzak.** 1995. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J. Cell Biol.* **131**:1193-1203.
- Lambeng, N., P.P. Michel, Y. Agid, et M. Ruberg.** 2001. The relationship between differentiation and survival in PC-12 cells treated with cyclic adenosine monophosphate in the presence of epidermal growth factor or nerve growth factor. *Neurosc. Lett.* **297**:133-136.
- Lampe P.D.** 1994. Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: adramatic inhibition of assembly. *J. Cell. Biol.* **127**:1895-1905.
- Lampe, P.D. et A.F. Lau.** 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**:205-215.
- Lampe, P.D., E.M. TenBroek, J.M. Burt, W.E. Kurata, R.G. Johnson, et A.F. Lau.** 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* **149**:1503-1512.

Lando, M., E. Abemayor, M.A. Verity, et N. Sidell. 1990. Modulation of intracellular cyclic adenosine monophosphate levels and the differentiation response of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **50**:722-727.

Langenfeld, J., H. Kiyokawa, D. Sekula, J. Boyle, et E. Dmitrovsky. 1997. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:12070-12074.

Lau, A.F., M.Y. Kanemitsu, W.E. Kurata, , S. Danesh, et A.L. Boynton. 1992. Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine. *Mol. Biol. Cell* **3**:865-874.

Lau, A.F., W.E. Kurata, M.Y. Kanemitsu, L.W. Loo, B.J. Warn-Cramer, W. Eckhart, et P.D. Lampe. 1996. Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**:359-368.

Lee, J.Y., Y.A. Hannun, et L.M. Obeid. 1996. Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* **271**:13169-13174.

Leszczynski, D., S. Joenvaara, et M.L. Foegh. 1996. Protein kinase C-alpha regulates proliferation but not apoptosis in rat coronary vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **58**:599-606.

Levade, T., N. Andrieu-Abadie, B. Segui, N. Auge, M. Chatelut, J.P. Jaffrezou, et R. Salvayre. 1999. Sphingomyelin-degrading pathways in human cells role in cell signalling. *Chem. Phys. Lipids* **102**:167-178.

Levine, M Corvi. 1997. Treatment of thrombotic disorders in cancer patients. *Haemostasis* **27**:38-43.

Li, G.Y., H.H. Lin, Z.J. Tu, et D.T. Kiang. 1998. Gap junction Cx26 gene modulation by phorbol esters in benign and malignant human mammary cells. *Gene* **209**: 139-147.

Li, R. et S. Ladisch. 1992. Alteration of neuroblastoma ganglioside metabolism by retinoic acid. *J. Neurochem.* **59**:2297-2303.

Liedtke, C.M. et T. Cole. 1997a. Antisense oligodeoxynucleotide to PKC-delta blocks alpha 1-adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport. *Am. J. Physiol.* **273**:C1632-C1640.

Liedtke, C.M., T. Cole, et M. Ikebe. 1997b. Differential activation of PKC-delta and -zeta by alpha 1-adrenergic stimulation in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **273**:C937-C943.

Lin, A., A. Minden, H. Martinetto, F.X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G.L. Johnson, et M. Karin. 1995. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **268**:286-290.

Lin, R., B.J. Warn-Cramer, W.E. Kurata, et A.F. Lau. 2001. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J. Cell Biol.* **154**:815-827.

Liu, B., L.M. Obeid, et Y.A. Hannun. 1997. Sphingomyelinases in cell regulation. *Semin.Cell Dev. Biol.* **8**:311-322.

Liu, G., L. Kleine, et R.L. Hebert. 1999. Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **36**:511-573.

Liu, Y.Y., T.Y. Han, A.E. Giuliano, et M.C. Cabot. 2001. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* **15**:719-730.

Livingstone, A. et R.J. Mairs. 1997. N-myc amplification and its relationship to experimental therapy. *J. Neurooncol.* **31**:33-39.

Livingstone, A., R.J. Mairs, J. Russell, J. O'Donoghue, M.N. Gaze, et T.E. Wheldon. 1994. N-myc gene copy number in neuroblastoma cell lines and resistance to experimental treatment. *Eur. J. Cancer* **30A**:382-389.

Lo, C.W. 1999. Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions. *Dev. Genet.* **24**:1-4.

Lo, C.W. 2000. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ. Res.* **87**: 346-348.

Lo, C.W., M.F. Cohen, G.Y. Huang, B.O. Lazatin, N. Patel, R. Sullivan, C. Pauken, et S.M. Park. 1997. Cx43 gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev. Genet.* **20**:119-132.

Loewenstein, W.R. et Y. Kanno. 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* **209**:1248-1249.

Loewenstein, W.R., Y. Kanno, et S.J. Socolar. 1978. The cell-to-cell channel. *Fed.Proc.* **37**:2645-2650.

Lopez, E. et I. Ferrer. 2000. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **85**:61-67.

- LoTurco, J.J., M.G. Blanton, et A.R. Kriegstein.** 1991. Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J. Neurosc.* **11**:792-799.
- Lovat, P.E., H. Irving, M. Annicchiarico-Petruzzelli, F. Bernassola, A.J. Malcolm, A.D. Pearson, G. Melino, et C.P. Redfern.** 1997. Retinoids in Neuroblastoma therapy: distinct biological properties of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Eur. J. Cancer* **33**:2075-2080.
- Lovat, P.E., M. Dobson, , A.J. Malcolm, , A.D. Pearson, et C.P. Redfern.** 2001. Differential gene regulation by 9-cis and All-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Med. Pediatr. Oncol.* **36**:135-138.
- Lovat, P.E., S.P. Lowis, A.D. Pearson, A.J. Malcolm, et C.P. Redfern.** 1994. Concentration-dependent effects of 9-cis retinoic acid on neuroblastoma differentiation and proliferation in vitro. *Neurosc. Lett.* **182**:29-32.
- Lu, Z., A. Hornia, Y.W. Jiang, Q. Zang, S. Ohno, et D.A. Foster.** 1997. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell. Biol.* **17**:3418-3428.
- Lucarelli, E., D. Kaplan, K. Matsumoto, S. Sickafuse, et C.J. Thiele.** 1994. Retinoic acid induced differentiation is mediated by trkB receptors. *Prog. Clin. Biol. Res.* **385**:185-198.
- Macari, F., M. Landau, P. Cousin, B. Mevorah, S. Brenner, R. Panizzon, D.F. Schorderet, D. Hohl, et M. Huber.** 2000. Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratodermia variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* **67**:1296-301.
- Macleod, M.R., T.E. Allsopp, J. McLuckie, et J.S. Kelly.** 2001. Serum withdrawal causes apoptosis in SHSY 5Y cells. *Brain Res.* **889**:308-315.
- Magni, P., E. Beretta, E. Scaccianoce, et M. Motta.** 2000. Retinoic acid negatively regulates neuropeptide Y expression in human neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* **39**:1628-1636.
- Mak, N.K., H.L. Lung, R.N. Wong, H.W. Leung, H.Y. Tsang, et K.N. Leung.** 2001. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Planta Med.* **67**:400-405.
- Makarenkova, H. et K. Patel.** 1999. Gap junction signalling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev. Biol.* **207**:380-392.
- Makarenkova, H., D.L. Becker, C. Tickle, et A.E. Warner.** 1997. Fibroblast growth factor 4 directs gap junction expression in the mesenchyme of the vertebrate limb Bud. *J. Cell Biol.* **138**:1125-1137.

Malik, M.A., C.E. Greenwood, J.K. Blusztajn, et B. Berse. 2000. Cholinergic differentiation triggered by blocking cell proliferation and treatment with all-trans-retinoic acid. *Brain Res.* **874**:178-185.

Mandil, R., E. Ashkenazi, M. Blass, I. Kronfeld, G. Kazimirsky, G. Rosenthal, F. Umansky, P.S. Lorenzo, P.M. Blumberg, et C. Brodie. 2001. Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* **61**:4612-4619.

Manthey, D., F. Bukauskas, C.G. Lee, C.A. Kozak, et K. Willecke. 1999. Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**:14716-14723.

Marechal, V. 1997. Mdm2, p53 and the cell cycle: when well enough is best left alone. *Pathol. Biol.(Paris.)* **45**:824-832.

Maris, J.M. et K.K. Matthay. 1999. Molecular biology of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **17**:2264-2279.

Martin, P.E., C.H. George, C. Castro, J.M. Kendall, J. Capel, A.K. Campbell, A. Revilla, L.C. Barrio, et W.H. Evans. 1998. Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. Reporting intracellular and plasma membrane calcium environments. *J. Biol. Chem.* **273**:1719-1726.

Mathias, S., L.A. Pena, et R.N. Kolesnick. 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* **335**:465-480.

Matsuda, S., H. Kosako, K. Takenaka, K. Moriyama, H. Sakai, T. Akiyama, Y. Gotoh, et E. Nishida. 1992. Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO J.* **11**:973-982.

Matsunaga, T., H. Shirasawa, H. Enomoto, H. Yoshida, J. Iwai, M. Tanabe, K. Kawamura, T. Etoh, et N. Ohnuma. 1998. Neuronal src and trk a protooncogene expression in neuroblastomas and patient prognosis. *Int. J. Cancer* **79**:226-231.

Matsuo, T. et C.J. Thiele. 1998. p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* **16**:3337-3343.

Mattei, M.G., M. Riviere, A. Krust, S. Ingvarsson, B. Vennstrom, M.Q. Islam, G. Levan, P. Kautner, A. Zelent, et P. Chambon. 1991. Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* **10**:1061-1069.

Matthay, K.K. 1995a. Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. *Cancer J. Clin.* **45**:179-192.

Matthay, K.K. 1999a. Intensification of therapy using hematopoietic stem-cell support for high-risk neuroblastoma. *Pediatr. Transplant.* **3**:72-77.

Matthay, K.K., J.G. Villablanca, R.C. Seeger, D.O. Stram, R.E. Harris, N.K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C.T. Black, G.M. Brodeur, R.B. Gerbing, et C.P. Reynolds. 1999b. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N. Engl. J. Med.* **341**:1165-1173.

Matthay, K.K., M.C. O'Leary, N.K. Ramsay, J. Villablanca, C.P. Reynolds, J.B. Atkinson, G.M. Haase, D.O. Stram, et R.C. Seeger. 1995b. Role of myeloablative therapy in improved outcome for high risk neuroblastoma: review of recent Children's Cancer Group results. *Eur. J. Cancer* **31A**:572-575.

Maurer, B.J., L.S. Metelitsa, R.C. Seeger, M.C. Cabot, et C.P. Reynolds. 1999. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**:1138-1146.

McBurney, M.W. 1993a. P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* **37**:135-140.

McBurney, M.W., S. Costa, et M.A. Pratt. 1993b. Retinoids and cancer: a basis for differentiation therapy. *Cancer Invest.* **11**:590-598.

McKenzie, P.P., S.M. Guichard, D.S. Middlemas, R.A. Ashmun, M.K. Danks, et L.C. Harris. 1999. Wild-type p53 can induce p21 and apoptosis in neuroblastoma cells but the DNA damage-induced G1 checkpoint function is attenuated. *Clin. Cancer Res.* **5**:4199-4207.

McLaughlin, M.M., S. Kumar, P.C. McDonnell, S. Van Horn, J.C. Lee, G.P. Livi, et P.R. Young. 1996. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **271**:8488-8492.

Meda, P. 1996. Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**:1053-1057.

Mehta, P.P., M. Yamamoto, et B. Rose. 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.

Mellor, H. et P.J. Parker. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**:281-292.

Melman, A. et G.J. Christ. 2001. Integrative erectile biology. The effects of age and disease on gap junctions and ion channels and their potential value to the treatment of erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* **28**:217-31.

Mena, M.A., M.J. Casarejos, A. Bonin, J.A. Ramos, et Y.J. Garcia. 1995. Effects of dibutyryl cyclic AMP and retinoic acid on the differentiation of dopamine neurons: prevention of cell death by dibutyryl cyclic AMP. *J. Neurochem.* **65**:2612-2620.

Merrill, A.H.J., A.M. Sereni, V.L. Stevens, Y.A. Hannun, R.M. Bell, et J.M.J. Kinkade. 1986. Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases. *J. Biol. Chem.* **261**:12610-12615.

Mesnil, M., C. Piccoli, et H. Yamasaki. 1993. An improved long-term culture of rat hepatocytes to detect liver tumour-promoting agents: results with phenobarbital. *Eur. J. Pharmacol.* **248**:59-66.

Mesnil, M., C. Piccoli, et H. Yamasaki. 1997. A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the bystander effect in HeLa cells. *Cancer Res.* **57**:2929-2932.

Michaud, N.R., M. Therrien, A. Cacace, L.C. Edsall, S. Spiegel, G.M. Rubin, et D.K. Morrison. 1997. KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:12792-12796.

Mielke, K. et T. Herdegen. 2000. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**:45-60.

Mignon, C., C. Fromaget, M.G. Mattei, D. Gros, H. Yamasaki, et M. Mesnil. 1996. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-->q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **72**:185-186.

Miller, T., G. Dahl, et R. Werner. 1988. Structure of a gap junction gene: rat connexin-32. *Biosci.Rep.* **8**:455-464.

Miller, W., J. Rigas, et F. Benedetti. 2001. Initial clinical trial of the the retinoic receptor pan agonist 9-cis retinoic acid. *Clin. Cancer Res.* **2**:471-475.

Misawa, H., R. Takahashi, et T. Deguchi. 1993. Transcriptional regulation of choline acetyltransferase gene by cyclic AMP. *J. Neurochem.* **60**:1383-1387.

- Miyoshi, H., M.B. Boyle, L.B. MacKay, et R.E. Garfield.** 1996. Voltage-clamp studies of gap junctions between uterine muscle cells during term and preterm labor. *Biophys. J.* **71**:1324-1334.
- Modur, V., G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, et T.M. McIntyre.** 1996. Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **271**:13094-13102.
- Moll, U.M. et A. Zaika.** 2000. Disrupting the p53-mdm2 interaction as a potential therapeutic modality. *Drug Resist. Updat.* **3**:217-221.
- Moll, U.M., A.G. Ostermeyer, R. Haladay, B. Winkfield, M. Frazier, et G. Zambetti.** 1996. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **16**:1126-1137.
- Moll, U.M., M. LaQuaglia, J. Benard, et G. Riou.** 1995. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:4407-4411.
- Moriuchi, S., K. Shimizu, Y. Miyao, H. Kishima, M. Okawa, et T. Hayakawa.** 1997. Decreased N-myc expression in human medulloblastoma cell lines during differentiation. *Anticancer Res.* **17**:301-306.
- Morrison, D.K. et R.E. Cutler.** 1997. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:174-179.
- Morriss-Kay G.M. et S.J. Ward.** 1999. Retinoids and mammalian development. *Int. Rev. Cytol.* **188**:73-131.
- Muindi, J.R., S.R. Frankel, C. Huselton, F. DeGrazia, W.A. Garland, C.W. Young, et R.P.J. Warrell.** 1992. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res.* **52**:2138-2142.
- Munari-Silem, Y. et B. Rousset.** 1996. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands--molecular and functional aspects: a review. *Eur. J. Endocrinol.* **135**:251-64.
- Murray, A.W. et N.E. Fusenig.** 1979. Binding of epidermal growth factor to primary and permanent cultures of mouse epidermal cells: inhibition by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Lett.* **7**:71-77.

- Musil, L.S. et D.A. Goodenough.** 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* **115**:1357-1374.
- Musil, L.S. et D.A. Goodenough.** 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* **74**:1065-1077.
- Musil, L.S., A.C. Le, J.K. VanSlyke, et L.M. Roberts.** 2000. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase assembly and function. *J. Biol. Chem.* **275**:25207-25215.
- Myer, V.E. et R.A. Young.** 1998. RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **273**:27757-27760.
- Nadarajah, B. et J.G. Parnavelas.** 1999. Gap junction-mediated communication in the developing and adult cerebral cortex. *Novartis. Found. Symp.* **219**:157-170.
- Nadarajah, B., A.M. Jones, W.H. Evans, et J.G. Parnavelas.** 1997. Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J. Neurosci.* **17**:3096-3111.
- Naderi, S., K.B. Gutzkow, J. Christoffersen, E.B. Smeland, et H.K. Blomhoff.** 2000. cAMP-mediated growth inhibition of lymphoid cells in G1: rapid down-regulation of cyclin D3 at the level of translation. *Eur. J. Immunol.* **30**:1757-1768.
- Nakagawara, A.** 2001. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* **169**:107-114.
- Nakagawara, A., K. Kadomatsu, S. Sato, K. Kohno, H. Takano, K. Akazawa, Y. Nose, et M. Kuwano.** 1990. Inverse correlation between expression of multidrug resistance gene and N-myc oncogene in human neuroblastomas. *Cancer Res.* **50**:3043-3047.
- Nakagawara, A., M. Arima, C.G. Azar, N.J. Scavarda, et G.M. Brodeur.** 1992. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* **52**:1364-1368.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, C.G. Azar, N.J. Scavarda, et G.M. Brodeur.** 1994. Clinical significance of expression of neurotrophic factors and their receptors in neuroblastoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* **385**:155-161.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N.J. Scavarda, C.G. Azar, A.B. Cantor, et G.M. Brodeur.** 1993. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **328**:847-854.

Nakamura, S. et Y. Nishizuka. 1994. Lipid mediators and protein kinase C activation for the intracellular signaling network. *J. Biochem.* **115**:1029-1034.

Nardini, M., F. Leonardi, C. Scaccini, et F. Virgili. 2001. Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Radic. Biol. Med.* **30**:722-733.

Nau, H. 1995. Chemical structure-teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids. *Toxicol. Lett.* **82**:975-979.

Nau, H., M.M. Elmazar, R. Ruhl, R. Thiel, et J.O. Sass. 1996. All-trans-retinoyl-beta-glucuronide is a potent teratogen in the mouse because of extensive metabolism to all-trans-retinoic acid. *Teratology* **54**:150-156.

Naus, C.C., J.F. Bechberger, Y. Zhang, L. Venance, H. Yamasaki, S.C. Juneja, G.M. Kidder, et C. Giaume. 1997. Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J. Neurosc. Res.* **49**:528-540.

Negroni, A., S. Scarpa, A. Romeo, S. Ferrari, A. Modesti, et G. Raschella. 1991. Decrease of proliferation rate and induction of differentiation by a MYCN antisense DNA oligomer in a human neuroblastoma cell line. *Cell Growth Differ.* **2**:511-518.

Neuhaus, I., G. Dahl, et R. Weener. 1995. Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for Connexin32. *Gene* **158**:257-262.

Newlon, M.G., M. Roy, D. Morikis, D.W. Carr, R. Westphal, J.D. Scott, et P.A. Jennings. 2001. A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO J.* **20**:1651-62.

Newton, A.C. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:161-167.

Newton, A.C. et J.E. Johnson. 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**:155-172.

Ni, H., X.S. Wang, K. Diener, et Z. Yao. 1998. MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**:492-496.

Nicholson, D.W. et N.A. Thornberry. 1997a. Caspases: killer proteases. *Trends. Biochem. Sci.* **22**:299-306.

Nicholson, S.M. et R. Bruzzone. 1997b. Gap junctions: getting the message through. *Curr. Biol.* **7**:R340-R344.

Nickerson, H.J., K.K. Matthay, R.C. Seeger, G.M. Brodeur, H. Shimada, C. Perez, J.B. Atkinson, M. Selch, R.B. Gerbing, D.O. Stram, et J. Lukens. 2000. Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J. Clin. Oncol.* **18**:477-486.

Niles, R.M. 1998. Control of retinoid nuclear receptor function and expression. *Subcell. Biochem.* **30**:3-28.

Niles, R.M. 2000. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* **16**:1084-1089.

Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**:484-496.

Nishizuka, Y. et S. Nakamura. 1995. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* **1**:S202-S203

Noguchi, M., K. Nomata, J.I. Watanabe, H. Sato, H. Kanetake, et Y. Saito. 1999. Disruption of gap junctional intercellular communication in human renal cancer cell lines. *Urology.* **53**:218-222.

Nonaka, K., A. Ishisaki, M. Muro, S. Kato, M. Oido, K. Nakashima, Y. Kowashi, et T. Nishihara. 1998. Possible involvement of protein kinase C in apoptotic cell death of macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**:247-254.

Obaya, A.J., M.K. Mateyak, et J.M. Sedivy. 1999. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* **18**:2934-2941.

Obeid, L.M., C.M. Linardic, L.A. Karolak, et Y.A. Hannun. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**:1769-1771.

O'Brien, J., M.R. Al-Ubaidi, et H. Ripps. 1996. Connexin 35: a gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol. Biol. Cell* **7**:233-243.

Okamoto, S., D. Krainc, K. Sherman, et S.A. Lipton. 2000. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:7561-7566.

Olsson, A.K. et E. Nanberg. 2001. A functional role for ERK in gene induction, but not in neurite outgrowth in differentiating neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* **265**:21-30.

Omori, Y., K. Yamakage, et H. Yamasaki. 2001. Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. *Mutat. Res.* **477**:191-196.

O'Neill, S., L. Ekstrom, M. Lastowska, P. Roberts, G.M. Brodeur, U.R. Kees, M. Schwab, et N. Bown. 2001. MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Cancer* **30**:87-90.

Ono, K. et J. Han. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* **12**:1-13.

Oppenheim, R.W. 1991a. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosc.* **14**:453-501.

Oppenheim, R.W., D. Prevette, Q.W. Yin, F. Collins, et J. MacDonald. 1991b. Control of embryonic motoneuron survival *in vivo* by ciliary neurotrophic factor. *Science* **251**:1616-1618.

Orsino, A., C.V. Taylor, et S.J. Lye. 1996. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* **137**:1545-1553.

Ostrowski, J., T. Roalsvig, L. Hammer, A. Marinier, J.E. Starrett, K.L. Yu, et P.R. Reczek. 1998. Serine 232 and methionine 272 define the ligand binding pocket in retinoic acid receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **273**:3490-3495.

Padua, R.R., P.L. Merle, B.W. Doble, C.H. Yu, P. Zahradka, G.N. Pierce, V. Panagia, et E. Kardami. 1998. FGF-2-induced negative inotropism and cardioprotection are inhibited by chelerythrine: involvement of sarcolemmal calcium-independent protein kinase C. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**:2695-2709.

Pahlavani, M.A. et D.M. Vargas. 2000. The effect of a ceramide analog, N-acetyl sphingosine on the induction of proliferation and IL-2 synthesis in T cells from young and old F344 rats. *Immunopharmacology* **49**:345-354.

Parissenti, A.M., A.F. Kirwan, S.A. Kim, C.M. Colantonio, et B.P. Schimmer. 1998. Inhibitory properties of the regulatory domains of human protein kinase Calpha and mouse protein kinase Cepsilon. *J. Biol. Chem.* **273**:8940-8945.

Parker, J.C., M.A. VanVolkenburg, N.A. Nardone, D.M. Hargrove, et K.M. Andrews. 1997. Modulation of insulin secretion and glycemia by selective inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**:665-669.

- Paul, D.L.** 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* **103**:123-134.
- Pawson, T. et J.D. Scott.** 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**:2075-2080.
- Phipps, M., J. Darozewski, et J. Phipps.** 1997. How the neighborhood coherence principle (NCP) can give rise to tissue homeostasis: a cellular automaton approach. *J. Theor. Biol.* **185**:475-487.
- Piedrafita, F.J. et M. Pfahl.** 1997. Retinoid-induced apoptosis and Sp1 cleavage occur independently of transcription and require caspase activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6348-6358.
- Piette, J., H. Neel, et V. Marechal.** 1997. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* **15**:1001-1010.
- Plum, A., G. Hallas, T. Magin, F. Dombrowski, A. Hagendorff, B. Schumacher, C. Wolpert, J. Kim, W.H. Lamers, M. Evert, P. Meda, O. Traub, et K. Willecke.** 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* **10**:1083-1091.
- Prasad, K.N., S. Kentroti, J. Edwards-Prasad, A. Vernadakis, M. Imam, E. Carvalho, et S. Kumar.** 1994. Modification of the expression of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-induced differentiated functions in neuroblastoma cells by beta-carotene and D-alpha-tocopheryl succinate. *J. Am. Cell. Nutr.* **13**:298-303.
- Prendergast, G.C.** 1999. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* **18**:2967-2987.
- Prinetti, A., R. Bassi, L. Riboni, et G. Tettamanti.** 1997. Involvement of a ceramide activated protein phosphatase in the differentiation of neuroblastoma Neuro2a cells. *FEBS Lett.* **414**:475-479.
- Pritchard, J., D. Germond, D. Jones, J. DeKraker, et S. Love.** 1986. Is high dose melphalan of value in treating advanced neuroblastoma? *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **5**:205-211.
- Raingeaud, J., A.J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, et R.J. Davis.** 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**:1247-1255.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, et R.J. Davis.** 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**:7420-7426.

- Redfern, C.P., P.E. Lovat, A.J. Malcolm, et A.D. Pearson.** 1994. Differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid on the induction of retinoic acid receptor-beta and cellular retinoic acid-binding protein II in human neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **304**:147-154.
- Redfern, C.P., P.E. Lovat, A.J. Malcolm, et A.D. Pearson.** 1995. Gene expression and neuroblastoma cell differentiation in response to retinoic acid: differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Eur. J. Cancer* **31**:486-494.
- Renaud, J.P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, et D. Moras.** 1995. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**:681-689.
- Reynolds, C.H., A.R. Nebreda, G.M. Gibb, M.A. Utton, et B.H. Anderton.** 1997. Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.* **69**:191-198.
- Reynolds, C.P.** 2000a. Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. *Curr. Oncol. Rep.* **2**:511-518.
- Reynolds, C.P., Y. Wang, L.J. Melton, P.A. Einhorn, D.J. Slamon, et B.J. Maurer.** 2000b. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**:597-602.
- Riboni, L., P. Viani, R. Bassi, P. Giussani, et G. Tettamanti.** 2001. Basic fibroblast growth factor-induced proliferation of primary astrocytes. evidence for the involvement of sphingomyelin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**:12797-12804.
- Risek, B., S. Guthrie, N. Kumar, et N.B. Gilula.** 1990. Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J. Cell Biol.* **110**:269-282.
- Rivas, C.I., D.W. Golde, J.C. Vera, et R.N. Kolesnick.** 1994. Involvement of the sphingomyelin pathway in autocrine tumor necrosis factor signaling for human immunodeficiency virus production in chronically infected HL-60 cells. *Blood* **83**:2191-2197.
- Rivedal, E. et H. Opsahl.** 2001. Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* **22**:1543-1550.
- Robinson, B.S., C.S. Hi, A. Poulos, et A. Ferrante.** 1997. Activation of neutral sphingomyelinase in human neutrophils by polyunsaturated fatty acids. *Immunology* **91**:274-280.
- Rodriguez-Lopez, A.M., Xenaki, D., Eden, T.O., Hickman, et C.M. Chresta.** 2001. Mdm2 mediated nuclear exclusion of p53 attenuates etoposide-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* **59**:135-143.

- Roeder, R.G.** 1996. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol.* **273**:165-171.
- Ronca, F., K.S. Yee, et V.C. Yu.** 1999. Retinoic acid confers resistance to p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells by modulating nuclear import of p53. *J. Biol. Chem.* **274**:18128-18134.
- Ronca, F., S.L. Chan, et V.C. Yu.** 1997. 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine induces apoptosis in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, through a p53-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **272**:4252-4260.
- Rose, B., P.P. Mehta, et W.R. Loewenstein.** 1993. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. *Carcinogenesis* **14**:1073-5.
- Ross, R.A., B.A. Spengler, et J.L. Biedler.** 2001. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **71**:741-747.
- Rossner, S., K. Mendla, R. Schliebs, et V. Bigl.** 2001. Protein kinase Calpha and betal isoforms are regulators of alpha-secretory proteolytic processing of amyloid precursor protein in vivo. *Eur. J. Neurosc.* **13**:1644-1648.
- Rousset, B.** 1996. Introduction to the structure and functions of junction communications or gap junctions. *Ann. Endocrinol.* **57**:476-480.
- Rozental, R., M. Morales, M.F. Mehler, M. Urban, M. Kremer, R. Dermietzel, J.A. Kessler, et D.C. Spray.** 1998. Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosc.* **18**:1753-1762.
- Rozzo, C., V. Chiesa, G. Caridi, G. Pagnan, et M. Ponzoni .** 1997. Induction of apoptosis in human neuroblastoma cells by abrogation of integrin-mediated cell adhesion. *Int. J. Cancer* **70**:688-698.
- Ruch, R.J. et J.E. Trosko.** 1999. The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res.* **19**:4831-4838.
- Rudie, H.A., P. Nahreini, C.P. Andreatta, J. Edwards-Prasad, et K.N. Prasad.** 2001. Identifying genes involved in regulating differentiation of neuroblastoma cells. *J. Neurosc. Res.* **64**:302-310.
- Ruvolo, P.P.** 2001. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* **15**:1153-1160.

Rybczynska, M., K. Ksiazek, et J. Kaczmarek. 2000. The role of PKC isoforms in tumorigenicity and apoptotic cell death. *Postepy. Hig. Med. Dos.* **54**:777-796.

Saba, J.D., L.M. Obeid, et Y.A. Hannun. 1996. Ceramide: an intracellular mediator of apoptosis and growth suppression. *Philos. Trans. Soc. Lond. Biol. Sci.* **351**:233-240.

Sadee, W., V.C. Yu, M.L. Richards, P.N. Preis, M.R. Schwab, F.M. Brodsky, et J.L. Biedler. 1987. Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* **47**:5207-5212.

Saez, J.C., A.C. Nairn, A.J. Czernik, D.C. Spray, E.L. Hertzberg, P. Greengard, et M.V. Bennett. 1990. Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Biochem.* **192**:263-273.

Saez, J.C., A.C. Nairn, A.J. Czernik, G.I. Fishman, D.C. Spray, et E.L. Hertzberg. 1997. Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**:2131-2145.

Saez, J.C., A.D. Martinez, M.C. Branes, et H.E. Gonzalez. 1998. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:593-600.

Saez, J.C., V.M. Berthoud, A.P. Moreno, et D.C. Spray. 1993. Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **27**:163-198.

Saez, J.C., W.A. Gregory, T. Watanabe, R. Dermietzel, E.L. Hertzberg, L. Reid, M.V. Bennett, et D.C. Spray. 1989. cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture. *Am. J. Physiol.* **257**:C1-C11.

Saharinen, P., N. Ekman, K. Sarvas, P. Parker, K. Alitalo, et O. Silvennoinen. 1997. The Bmx tyrosine kinase induces activation of the Stat signaling pathway, which is specifically inhibited by protein kinase Cdelta. *Blood* **90**:4341-4353.

Salvesen, G.S. et V.M. Dixit. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**:443-446.

Sandberg, M., K. Tasken, O. Oyen, V. Hanson, et T. Jahnsen. 2001. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**: 939-945.

- Sawai, S., A. Shimono, Y. Wakamatsu, C. Palmes, K. Hanaoka, et H. Kondoh.** 1993. Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse. *Development* **117**:1445-1455.
- Scafonas, A., C.L. Wolfgang, J.L. Gabriel, K.J. Soprano, et D.R. Soprano.** 1997. Differential role of homologous positively charged amino acid residues for ligand binding in retinoic acid receptor alpha compared with retinoic acid receptor beta. *J. Biol. Chem.* **272**:11244-11249.
- Schwab, M.** 1993. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol.* **4**:13-18.
- Schwab, M., H.E. Varmus, et J.M. Bishop.** 1985. Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* **316**:160-162.
- Sculerati N.** 2000. Analysis of a cohort of children with sensory hearing loss using the SCALE systematic nomenclature. *Laryngoscope* **110**:787-98.
- Seeger, R.C., G.M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S.E. Siegel, K.Y. Wong, et D. Hammond.** 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* **313**:1111-1116.
- Seeman, P., R. Mazanec, M. Ctvrtickova, et D. Smilkova.** 2001. Charcot-Marie-Tooth type X: A novel mutation in the Cx32 gene with central conduction slowing. *Int. J. Mol. Med.* **8**:461-8.
- Seidenfaden, R. et H. Hildebrandt.** 2001. Retinoic acid-induced changes in polysialyltransferase mRNA expression and NCAM polysialylation in human neuroblastoma cells. *J. Neurobiol.* **46**:11-28.
- Serlachius, E., J. Svennilson, M. Schalling, et A. Aperia.** 1997. Protein kinase C in the developing kidney: isoform expression and effects of ceramide and PKC inhibitors. *Kidney Int.* **52**:901-910.
- Shapiro, L.S., R.M. Roland, et M. Halpern.** 1997. Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Morphol.* **234**:109-129.
- Shea, T.B. et M.L. Beermann.** 1991. Staurosporine-induced morphological differentiation of human neuroblastoma cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**:161-168.
- Shen, J.C., R.D. Klein, Q. Wei, Y. Guan, J.H. Contois, T.T. Wang, S. Chang, et S.D. Hursting.** 2000. Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) cell-cycle arrest in human prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* **29**:92-102.

Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* **274**:1672-1677.

Shibuya, K., S. Kawasaki, M. Kuroda, J. Asaumi, S. Kanazawa, et Y. Hiraki. 2001. Effects of PKC inhibitors on suppression of thermotolerance development in tsAF8 cells. *Int. J. Hyperthermia* **17**:106-113.

Shiels, A., D. Mackay, A. Ionides, V. Berry, A. Moore, et S. Bhattacharya. 1998. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:526-532.

Shindo, M., K. Irie, A. Nakahara, H. Ohigashi, H. Konishi, U. Kikkawa, H. Fukuda, et P.A. Wender. 2001. Toward the identification of selective modulators of protein kinase C (PKC) isozymes. establishment of a binding assay for PKC isozymes using synthetic C1 peptide receptors and identification of the critical residues involved in the phorbol ester binding. *Bioorg. Med. Chem.* **9**:2073-2081.

Sillence, D.J. 2001. Apoptosis and signalling in acid sphingomyelinase deficient cells. *Cell Biol.* **2**:24-28.

Simkhovich, B.Z., K. Przyklenk, et R.A. Kloner. 1998. Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc. Res.* **40**:9-22.

Simon, A.M. 1999. Gap junctions: more roles and new structural data. *Trends Cell Biol.* **9**:169-170.

Simon, A.M. et D.A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* **8**:477-83.

Simon, A.M., D.A. Goodenough, E. Li, et D.L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* **385**:525-529.

Singh, L.P., J. Andy, V. Anyamale, K. Greene, M. Alexander, et E.D. Crook. 2001. Hexosamine-induced fibronectin protein synthesis in mesangial cells is associated with increases in cAMP responsive element binding (CREB) phosphorylation and nuclear CREB: the involvement of protein kinases A and C. *Diabetes* **50**:2355-2362.

Sluss, H.K., T. Barrett, B. Derijard, et R.J. Davis. 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell Biol.* **14**:8376-8384.

Small, M.B., N. Hay, M. Schwab, et J.M. Bishop. 1987. Neoplastic transformation by the human gene N-myc. *Mol. Cell Biol.* **7**:1638-1645.

Smith, C.M., E. Radzio-Andzelm, P. Akamine, et S.S. Taylor. 1999. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**:313-341.

- Smith, E.I., G.M. Haase, R.C. Seeger, et G.M. Brodeur.** 1989. A surgical perspective on the current staging in neuroblastoma--the International Neuroblastoma Staging System proposal. *J. Pediatr. Surg.* **24**:386-390.
- Sohl, G., C. Gilen, F. Bosse, M. Gleichmann, et K. Willecke.** 1996. A second alternative transcript of the gap junction gene connexin 32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. *J. Cell Biol.* **69**:267-275.
- Stahl, W., L.J. Von, H.D. Martin, T. Emmerich, et H. Sies.** 2000. Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**:271-274.
- Steinberg, S.F., M. Goldberg, et V.O. Rybin.** 1995. Protein kinase C isoform diversity in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **27**:141-153.
- Stoker, M.G., M. Shearer, et C. O'Neill.** 1966. Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts. *J. Cell Sci.* **1**:297-310.
- Suchard, S.J., P.J. Mansfield, L.A. Boxer, et J.A. Shayman.** 1997. Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide. *J. Immunol.* **158**:4961-4967.
- Suchard, S.J., V. Hinkovska-Galcheva, P.J. Mansfield, L.A. Boxer, et J.A. Shayman.** 1997. Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **89**:2139-2147.
- Sullivan, R., C. Ruangvoravat, D. Joo, J. Morgan, B.L. Wang, X.K. Wang, et C.W. Lo.** 1993. Structure, sequence and expression of the mouse Cx43 gene encoding connexin 43. *Gene* **130**:191-199.
- Sutherland, E.W. et G.A. Robison.** 1966. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.* **18**:145-161.
- Svensson, K., R. Zeidman, U. Troller, A. Schultz, et C. Larsson.** 2000. Protein kinase C beta1 is implicated in the regulation of neuroblastoma cell growth and proliferation. *Cell Growth Differ.* **11**:641-648.
- Tairis, N., J.L. Gabriel, K.J. Soprano, et D.R. Soprano.** 1995. Alteration in the retinoid specificity of retinoic acid receptor-beta by site-directed mutagenesis of Arg269 and Lys220. *J. Biol. Chem.* **270**:18380-18387.
- Takai, Y., M. Ogawara, Y. Tomono, C. Moritoh, S. Imajoh-Ohmi, O. Tsutsumi, Y. Taketani, et M. Inagaki.** 1996. Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. *J. Cell Biol.* **133**:141-149.

Takeda, A., S. Saheki, T. Shimazu, et N. Takeuchi. 1989. Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes. *J. Biochem.* **106**:723-727.

Tanabe, F., S.H. Cui, et M. Ito. 1998. Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C beta in murine polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**:129-133.

Tanaka, T., E. Hiyama, T. Sugimoto, T. Sawada, M. Tanabe, et N. Ida. 1995. trk A gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* **76**:1086-1095.

Tanaka, T., T. Sugimoto, et T. Sawada. 1998. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer* **83**:1626-1633.

Tang, X.X., A.E. Evans, H. Zhao, A. Cnaan, G.M. Brodeur, et N. Ikegaki. 2001. Association among EPHB2, TrkA, and MYCN expression in low-stage neuroblastomas. *Med. Pediatr. Oncol.* **36**:80-82.

Tavarini, S., L. Colombaioni, et M. Garcia-Gil. 2000. Sphingomyelinase metabolites control survival and apoptotic death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosc. Lett.* **285**:185-188.

Taylor, C.T., N. Fueki, A. Agah, R.M. Hershberg, et S.P. Colgan. 1999b. Critical role of cAMP response element binding protein expression in hypoxia-elicited induction of epithelial tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **274**:19447-19454.

Taylor, J.R., S. Birnbaum, R. Ubriani, et A.F. Arnsten. 1999a. Activation of cAMP-dependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. *J. Neurosc.* **19**:23-32.

Teitz, T., J.M. Lahti, et V.J. Kidd. 2001 Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J. Mol. Med.* **79**:428-36.

Temme, A., A. Buchmann, H.D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz, et K. Willecke. 1997. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* **7**:713-716.

Teng, C.S. 2001. Differential activation of MAPK during Mullerian duct growth and apoptosis: JNK and p38 stimulation by DES blocks tissue death. *Cell Tissue Res.* **306**:27-34.

Teubner, B., J. Degen, G. Sohl, M. Guldenagel, F.F. Bukauskas, E.B. Trexler, V.K. Verselis, Z.C. De, C.G. Lee, C.A. Kozak, E. Petrasch-Parwez, R. Dermietzel, et K. Willecke. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* **176**:249-262.

Thomas, S.A., R.B. Schuessler, et J.E. Saffitz. 1998. Connexins, conduction, and atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **9**:608-611.

Thorin-Trescases, N., S.N. Orlov, S. Taurin, N.O. Dulin, B.G. Allen, D. deBlois, J. Tremblay, A.V. Pshezhetsky, P. Hamet. 2001. Antiproliferative effect of brief exposure to cholera toxin in vascular smooth muscle cells: role of cAMP and protein kinase A. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**:471-480.

Thornberry, N.A. 1998a. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* **5**:R97-103.

Thornberry, N.A. et Y. Lazebnik. 1998b. Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.

Thrane, E.V., M. Refsnes, G.H. Thoresen, M. Lag, et P.E. Schwarze. 2001. Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK. *Toxicol. Sci.* **61**:83-91.

Tieu, K., D.M. Zuo, et P.H. Yu. 1999. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J. Neurosc. Res.* **58**:426-435.

Toker, A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* **3**:D1134-D1147.

Trosko, J.E. et C.C. Chang. 2000a. Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer. *Biofactors* **12**:259-263.

Trosko, J.E. et R.J. Ruch. 1998b. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* **3**:208-236.

Trosko, J.E., C.C. Chang, B. Upham, et M. Wilson. 1998a. Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication. *Toxicol. Lett.* **102**:71-8.

Trosko, J.E., C.C. Chang, L.P. Yotti, et E.H. Chu. 1977. Effect of phorbol myristate acetate on the recovery of spontaneous and ultraviolet light-induced 6-thioguanine and ouabain-resistant Chinese hamster cells. *Cancer Res.* **37**:188-193.

- Trosko, J.E., C.C. Chang, M.R. Wilson, B. Upham, T. Hayashi, et M. Wade.** 2000b. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods* **20**:245-264.
- Tsuchida, Y., H. Hemmi, A. Inoue, K. Obana, H.W. Yang, Y. Hayashi, N. Kanda, et H. Shimatake.** 1996. Genetic clinical markers of human neuroblastoma with special reference to N-myc oncogene: amplified or not amplified?--An overview. *Tumour. Biol.* **17**:65-74.
- Tumilowicz, J.J, W.W. Nichols, J.J. Cholon, et A.E. Greene.** 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* **30**:2110-2118.
- Tweddle, D.A., A.J. Malcolm, M. Cole, A.D. Pearson, et J. Lunec.** 2001. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am. J. Pathol.* **158**:2067-2077.
- Unger, V.M., N.M. Kumar, N.B. Gilula, et M. Yeager.** 1997. Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**:39-43.
- Van Veldhoven, P.P., T.J. Matthews, D.P. Bolognesi, et R.M. Bell.** 1992. Changes in bioactive lipids, alkylacylglycerol and ceramide, occur in HIV-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:209-216.
- Vanblitterswijk, W.J., A.H. Vanderluit, W. Caan, M. Verheij, et J. Borst.** 2001. Sphingolipids related to apoptosis from the point of view of membrane structure and topology. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:819-824.
- VanSlyke, J.K. et L.S. Musil.** 2000a. Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods* **20**:156-164.
- VanSlyke, J.K., S.M. Deschenes, et L.S. Musil.** 2000b. Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell* **11**:1933-1946.
- 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.
- Venable, M.E., A. Bielawska, et L.M. Obeid.** 1996. Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **271**:24800-24805.
- Ventura, C. et M. Maioli.** 2001. Protein kinase C control of gene expression. *Crit.Rev. Eukaryot. Gene Exp.* **11**:243-267.

- Verheij, M., W.J. van Blitterswijk, et H. Bartelink.** 1998. Radiation-induced apoptosis-the ceramide-SAPK signaling pathway and clinical aspects. *Acta Oncol.* **37**:575-581.
- Vikhamar, G., E. Rivedal, S. Mollerup, et T. Sanner.** 1998. Role of Cx43 phosphorylation and MAP kinase activation in EGF induced enhancement of cell communication in human kidney epithelial cells. *Cell Adhes. Commun.* **5**:451-460.
- Voute, P.A.** 1984. Nephroblastoma or Wilm's tumor: treatment and prognosis. *J. Biol. Chem.* **128**:121-125.
- Wada, R.K., D.S. Pai, J. Huang, J.M. Yamashiro, et N. Sidell.** 1997. Interferon-gamma and retinoic acid down-regulate N-myc in neuroblastoma through complementary mechanisms of action. *Cancer Lett.* **121**:181-188.
- Wada, R.K., R.C. Seeger, G.M. Brodeur, P.A. Einhorn, S.A. Rayner, M.M. Tomayko, et C.P. Reynolds.** 1993. Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification. *Cancer* **72**:3346-3354.
- Wagner, L.M. et D.J. Takemoto.** 2001. PKC α and PKC γ overexpression causes lentoid body formation in the N/N 1003A rabbit lens epithelial cell line. *Mol. Vis.* **7**:138-144.
- Wakamatsu, Y., Y. Watanabe, A. Shimono, et H. Kondoh.** 1993. Transition of localization of the N-Myc protein from nucleus to cytoplasm in differentiating neurons. *Neuron* **10**:1-9.
- Wakamatsu, Y., Y. Watanabe, H. Nakamura, et H. Kondoh.** 1997. Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation. *Development* **124**:1953-1962.
- Walsh, D.A., J.P. Perkins, et E.G. Krebs.** 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**:3763-3765.
- Waltereit, R., B. Dammermann, P. Wulff, J. Scafidi, U. Staubli, G. Kauselmann, M. Bundman, et D. Kuhl.** 2001. Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and 8-Br-cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J. Neurosc.* **21**:5484-5493.
- Wan, D.C., R.C. Choi, N.L. Siow, et K.W. Tsim.** 2000. The promoter of human acetylcholinesterase is activated by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway in cultured NG108-15 neuroblastoma cells. *Neurosc. Lett.* **288**:81-85.

- Wang, X.S., K. Diener, C.L. Manthey, S. Wang, B. Rosenzweig, J. Bray, J. Delaney, C.N. Cole, P.Y., N. Mantlo, H.S. Lichenstein, M. Zukowski, et Z. Yao. 1997. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:23668-23674.
- Wang, X.S., K. Diener, T.H. Tan, et Z. Yao. 1998. MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**:33-37.
- Warn-Cramer, B.J., G.T. Cottrell, J.M. Burt, et A.F. Lau. 1998. Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:9188-9196.
- Warn-Cramer, B.J., P.D. Lampe, W.E. Kurata, M.Y. Kanemitsu, L.W. Loo, W. Eckhart, et A.F. Lau. 1996. Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J. Biol. Chem.* **271**:3779-3786.
- Warn-Cramer, B.J., W.E. Kurata, et A.F. Lau. 2001. Biochemical analysis of connexin phosphorylation. *Methods Mol. Biol.* **154**:431-446.
- Watanabe, J., K. Nomata, M. Noguchi, H. Satoh, S. Kanda, H. Kanetake, et Y. Saito. 1999. All-trans retinoic acid enhances gap junctional intercellular communication among renal epithelial cells *in vitro* treated with renal carcinogens. *Eur. J. Cancer* **35**:1003-1008.
- Watters, D.J. et P.G. Parsons. 1999. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. *Biochem. Pharmacol.* **58**:383-388.
- Way, K.J., E. Chou, et G.L. King. 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.* **21**:181-187.
- Weinberg, R.A. 1995. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann. NY. Acad. Sci.* **758**:331-338.
- Weisenhorn, D.M., J. Roback, A.N. Young, et B.H. Wainer. 1999. Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **189**:177-265.
- West, G.J., J. Uki, H.R. Herschman, et R.C. Seeger. 1977. Adrenergic, cholinergic, and inactive human neuroblastoma cell lines with the action-potential Na⁺ ionophore. *Cancer Res.* **37**:1372-1376.
- White, T.W. et R. Bruzzone. 2000. Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **32**:130-137.

- Willaime, S., P. Vanhoutte, J. Caboche, Y. Lemaigre-Dubreuil, J. Mariani, et B. Brugg.** 2001. Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur. J. Neurosc.* **13**:2037-2046.
- Wilson, B.W., S. Padilla, J.D. Henderson, S. Brimijoin, P.D. Dass, G. Elliot, B. Jaeger, D. Lanz, R. Pearson, et R. Spies.** 1996. Factors in standardizing automated cholinesterase assays. *J. Toxicol. Environ. Health* **48**:187-195.
- Wiszniewski, L., A. Limat, J.H. Saurat, P. Meda, et D. Salomon.** 2000. Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **15**:278-85.
- Woo, K.R., W.P. Shu, L. Kong, et B.C. Liu.** 1996. Tumor necrosis factor mediates apoptosis via Ca^{++}/Mg^{++} dependent endonuclease with protein kinase C as a possible mechanism for cytokine resistance in human renal carcinoma cells. *J. Urol.* **155**:1779-1783.
- Woodgate, A., G. MacGibbon, M. Walton, et M. Dragunow.** 1999a. The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC-12 and P19 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **69**:84-92.
- Woodgate, A., M. Walton, G.A. MacGibbon, et M. Dragunow.** 1999b. Inducible transcription factor expression in a cell culture model of apoptosis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **66**:211-216.
- Xie, J., Q. Guo, H. Zhu, M.W. Wooten, et M.P. Mattson.** 2000. Protein kinase C ι protects neural cells against apoptosis induced by amyloid beta-peptide. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **82**:107-113.
- Xie, P., W.M. Cheung, F.C. Ip, N.Y. Ip, et M.F. Leung.** 1997. Induction of TrkA receptor by retinoic acid in leukaemia cell lines. *Neuroreport* **8**:1067-1070.
- Ya, J., E.B. Erdtsieck-Ernste, B.P. De, K.M. Van, H. Jongsma, D. Gros, A.F. Moorman, et W.H. Lamers.** 1998. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ. Res.* **82**:360-366.
- Yamasaki, H. et F. Katoh.** 1988. Further evidence for the involvement of gap-junctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.* **48**:3490-3495.
- Yamasaki, H., M. Hollstein, M. Mesnil, N. Martel, et AM. Aguelon.** 1987. Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.* **47**:5658-5664.

- Yamasaki, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, et Y. Omori.** 1996. Connexin genes and cell growth control. *Arch. Toxicol. Suppl.* **18**:105-114.
- Yamasaki, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, T. Tanaka, M.L. et Y. Omori.** 1999a. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *Ann. Acad. Sc.* **322**:151-159.
- Yamasaki, H., Y. Omori, M.L., N. Mironov, M. Mesnil, et V. Krutovskikh.** 1999b. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* **23**:273-279.
- Yamasaki, H., Y. Omori, V. Krutovskikh, W. Zhu, N. Mironov, K. Yamakage, et M. Mesnil.** 1999c. Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis. Found. Symp.* **219**:241-254.
- Yang, J., H. Sun, W. Bian, et N.H. Jing.** 1998. Neural differentiation of Wnt-1 overexpression P19 cells. *J. Biol. Chem.* **50**:289-295.
- Yen, A., M.S. Roberson, S. Varvayanis, et A.T. Lee.** 1998. Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res.* **58**:3163-3172.
- Yokozaki, H., G. Tortora, S. Pepe, E. Maronde, H.G. Genieser, B. Jastorff, et Y.S. Cho-Chung.** 1992. Unhydrolyzable analogues of adenosine 3':5'-monophosphate demonstrating growth inhibition and differentiation in human cancer cells. *Cancer Res.* **52**:2504-2508.
- Yoshimura, S., Y. Banno, S. Nakashima, K. Takenaka, H. Sakai, Y. Nishimura, N. Sakai, S. Shimizu, Y. Eguchi, Y. Tsujimoto, et Y. Nozawa.** 1998. Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC-12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* **273**:6921-6927.
- Young, C.C. et A. Takemura.** 2001. Molecular cloning and expression of connexin 32.3 cDNA in the ovary from the red seabream (*Pagrus major*). *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **129**:767-775.
- Yu, W., G. Dahl, et R. Werner.** 1994. The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc. Soc. Lond. Biol. Sci.* **255**:125-132.
- Zaizen, Y., S. Taniguchi, et S. Suita.** 1998. The role of cellular motility in the invasion of human neuroblastoma cells with or without N-myc amplification and expression. *J. Pediatr. Surg.* **33**:1765-1770.