

INRS – Institut Armand-Frappier  
Université du Québec

**Sous-localisation de la connexine 43 dans les cellules  
de neuroblastomes: les mécanismes responsables**

Par  
Shaghayegh (Sharo) Safakhoo

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc) en Immunologie, Virologie

Président du jury et examinateur interne :	Dr. Peter Tijssen, INRS–Institut Armand-Frappier, Université du Québec
Examineur externe :	Dr. Jacques Galipeau Faculté de Médecine, Université McGill
Codirecteurs de recherche :	Dr. Max. Arella, INRS–Institut Armand-Frappier, Université du Québec et Dr. Jenny Phipps, CNRC

## RÉSUMÉ :

Le fonctionnement organismique ainsi que le développement embryonnaire de tout organisme multicellulaire dépend de la coordination des cellules qui le composent. La plupart des cellules animales synthétisent des protéines membranaires, appelées connexines (Cx). Ces protéines forment des canaux transmembranaires, qui permettent à des cellules voisines d'échanger directement de nombreux ions et métabolites cytoplasmiques (en particulier des messagers secondaires: AMPc,  $\text{Ca}^{2+}$ , GMPc,  $\text{iP}_3$ ). On reconnaît dans ces derniers, les co-facteurs des protéines kinases. La communication intercellulaire, aussi appelée couplage jonctionnel (GJ), est impliquée dans de nombreuses fonctions au cours du développement embryonnaire ainsi que dans les tissus adultes. L'homéostasie, ainsi que la sécrétion (insuline) et la synchronisation (battement du coeur), par exemple, reposent sur la fonction de ces canaux.

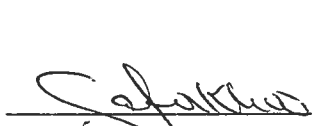
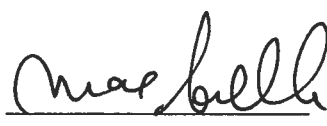
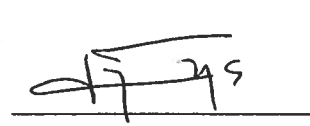
Des études récentes indiquent que l'altération des communications intercellulaires joue un rôle considérable dans diverses maladies et pourrait contribuer à la presque totalité (99%) des cancers. Ainsi, il semble que les deux seules caractéristiques communes à tous les cancers sont l'absence de contrôle de la prolifération et l'altération des communications intercellulaires contrôlées par les Cx et les canaux jonctionnels (GJ).

Dans les lignées de neuroblastomes humains (un cancer pédiatrique), bien que la Cx43 soit exprimée, elle est localisée de manière aberrante autour du noyau. Toutefois, il a été préalablement démontré que le traitement de ces cellules avec une forme perméable d'AMPc, la 8-Br-AMPc, augmentait la synthèse des Cx et leur transfert à la membrane plasmique; la fonctionnalité des canaux restant cependant limitée (Arnold et al., 2005). La restauration de la fonction normale repose sur l'inhibition de la protéine kinase C alpha. Les voies métaboliques qui contrôlent les Cx de la transcription à la fonction n'ont pas été étudiées en détail dans les neuroblastomes (NB). Les cellules de NB de souris (Neuro2A) n'expriment pas de Cx et sont utilisées depuis longtemps pour obtenir

d'étudier leur structure. L'objectif du projet a été de transfecter les cellules de Neuro2A avec des vecteurs contenant la Cx43 afin d'élucider les voies métaboliques impliquées dans le déficit d'expression de la Cx43 et dans l'altération, la formation et la fonction des jonctions lacunaires.

Il sera intéressant de voir si les résultats obtenus chez une lignée humaine de neuroblastome seront comparables à ceux obtenus chez leurs homologues de souris et si, potentiellement, la différence provient d'un changement dans les voies métaboliques associées à l'expression, la sous-localisation et la fonction des Cx et jonctions lacunaires - sans oublier que les différences observées pourraient provenir du site d'insertion du vecteur transfecté. Une approche pharmacologique par inhibition des voies métaboliques principales, dans les cellules transfectées a été choisie pour analyser la modulation des jonctions lacunaires chez les neuroblastomes de souris.

Les résultats obtenus démontrent que les voies métaboliques qui régissent la régulation de la Cx43 dans les cellules Neuro2A diffèrent largement de celles identifiées dans les cellules issues de neuroblastomes humains. Nos résultats suggèrent que les N2A transfectés avec la Cx43 ne peuvent pas être utilisés comme modèle d'étude des neuroblastomes *in vivo*.

  
S. Safakhoo  
Dr. M. Arella  
Dr. J. Phipps

*À mes chers parents sans qui je ne  
serai pas où j'en suis aujourd'hui*

*À mon frère Shahin qui a toujours su me  
faire sourire dans les moments difficiles*

## REMERCIEMENTS :

Je remercie sincèrement mon co-superviseur de recherche, Dr. Jenny Phipps, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et offert la chance de réaliser le présent travail. Je la remercie pour son éternelle patience, ses remarquables qualités scientifiques et son sens critique. Ses conseils, son ouverture d'esprit, son écoute et son amitié m'ont aidée dans bien des circonstances.

J'adresse mes sincères et profonds remerciements à co-superviseur de recherche, Dr. Maximilien Arella, pour sa patience, son soutien, sa confiance, sa disponibilité, ses connaissances, son encouragement et sa grande gentillesse. Mille mercis.

J'aimerais aussi remercier les membres du cadre enseignant ainsi que mon comité d'encadrement à l'Institut Armand-Frappier, et particulièrement Dr. Susanne Lemieux pour m'avoir offert l'opportunité de tirer profit d'une excellente formation en immunologie.

Je tiens à remercier également tous les membres actuels et passés du laboratoire pour leur aide, leur soutien et sympathie. J'aimerais cependant exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont eu à participer de près ou de loin à la réalisation de mon travail de maîtrise.

Un grand merci surtout à ma famille - Behy, Masoud et Shahin - sans qui je n'aurais rien pu faire, pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>page ii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>page v</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>page vi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>page x</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>page xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>page xiii</b>
<b>PROBLÉMATIQUE.....</b>	<b>page xv</b>
<b>OBJECTIF DU PROJET.....</b>	<b>page xix</b>
<b>1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>page 1</b>
1.1 Le cancer.....	page 2
1.2 Les neuroblastomes.....	page 2
1.2.1 Origine et caractérisation des lignées cellulaires de neuroblastomes.....	page 4
1.3 La communication jonctionnelle.....	page 4
1.3.1 Perméabilité jonctionnelle.....	page 5
1.3.2 Les jonctions lacunaires et leurs rôles dans diverses pathologies.....	page 6
1.3.3 Les connexines.....	page 7
1.3.4 La topologie des connexines.....	page 12
1.3.5 Les connexones.....	page 15
1.3.6 Biosynthèse, assemblage et transports des connexines.....	page 16
1.3.7 Les diverses isoformes des connexines.....	page 17
1.3.8 La connexine 43 (Cx43).....	page 22
1.3.9 La régulation des connexines.....	page 22
1.3.9.1 La phosphorylation de la Cx43.....	page 25
1.3.9.2 La protéine kinase A, AMPc dépendante.....	page 26
1.3.9.3 La protéine kinase C.....	page 32
1.4 L'implication possible des jonctions lacunaires dans les neuroblastomes.....	page 33
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>	<b>page 36</b>
2.1 Culture cellulaire.....	page 37

2.1.1	Lignées cellulaires.....	page 37
2.1.2	Culture cellulaire.....	page 37
2.1.3	Traitement cellulaire par les médiateurs...:	page 38
2.1.4	Prolifération cellulaire.....	page 38
2.1.5	Différenciation cellulaire.....	page 39
2.2	Transfection cellulaire et clonage.....	page 39
2.2.1	Amorces Gateway® contre la Cx43.....	page 39
2.2.2	Traitement à l'ADNase et précipitation par l'éthanol.....	page 40
2.2.3	PCR – Réaction de la polymérase en chaîne.....	page 40
2.2.4	Synthèse du premier brin pour la RT.....	page 41
2.2.5	Réaction de la transcriptase reverse.....	page 41
2.2.6	Vecteurs plasmidiques.....	page 41
2.2.7	Préparation des milieux LB sur les plaques d'agar.....	page 42
2.2.8	Préparation et sélection des colonies.....	page 42
2.2.9	Isolement des plasmides.....	page 42
2.2.10	Digestion Enzymatique et Enzyme de restriction.....	page 43
2.2.11	Extraction sur gel.....	page 43
2.2.12	Transfection dans les N2A et caractérisation des clones.....	page 43
2.3	Extraction protéique.....	page 46
2.4	Immunobuvardage.....	page 47
2.4.1	Électrophorèse des protéines (SDS-PAGE).....	page 47
2.4.2	Électrotransfert.....	page 47
2.4.3	Immunodétection.....	page 47
2.5	Immunofluorescence.....	page 48
2.6	Analyse des communications intercellulaires par la technique de chargement par grattage, « Scrape Loading » .....	page 49
2.7	L'analyse des biopsies.....	page 52
2.8	Hoechst.....	page 52
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>page 55</b>
3.1	L'expression endogène de la Cx43 dans les cellules de Neuro2A (N2A) .....	page 56
3.2	Transfection des cellules de Neuro2A (N2A).....	page 56
3.3	L'expression et la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de N2A transfectées avec divers vecteurs.....	page 56

3.4 Les voies de signalisation impliquées au niveau de la régulation des Cxs.....	page 62
3.4.1 L'effet de l'activation de la PKA sur les Cx43 des cellules N2A.....	page 63
3.4.1.1 La sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de N2A.....	page 63
3.4.1.2 Le profil d'expression de la Cx43 dans les cellules de N2A.....	page 63
3.4.2 Le profil d'expression des isoformes de PKC dans les biopsies humaines et l'effet de l'inhibition des isoformes de la PKC au sein des cellules de neuroblastome murin (N2A).....	page 68
3.4.2.1 L'inhibition générale des PKCs.....	page 68
3.4.2.2 L'inhibition des PKC classiques (cPKC).....	page 73
3.4.2.3 L'inhibition des PKC $\alpha$ .....	page 78
3.4.3 L'effet combiné de l'activation de la PKA et de l'inhibition de la PKC $\alpha$ sur communication cellulaire des N2A.....	page 78
3.5 L'expression et fonctionnalité des connexines dans les cellules de neuroblastomes humains, les IMR32.....	page 82
3.5.1 La Cx43 endogène des cellules IMR32.....	page 82
3.6 Les voies de signalisation restaurant la fonctionnalité jonctionnelle des cellules IMR32.....	page 82
3.6.1 L'effet de l'activation de la PKA sur les Cx43 dans les cellules IMR32.....	page 82
3.6.1.1 La sous-localisation des Cx43 dans les cellules IMR32.....	page 85
3.6.1.2 La fonctionnalité jonctionnelle au sein des cellules IMR32.....	page 88
3.6.2 Confirmation de l'effet combiné de l'activation de la PKA et de l'inhibition de la PKC $\alpha$ sur communication cellulaire des IMR32.....	page 91
3.7 Les différences existantes entre les cellules de neuroblastomes humains et murins.....	page 91
3.7.1 Expression constitutive de la Cx43.....	page 91
3.7.2 Le profil protéique de la Cx43.....	page 92
3.7.3 Sous-localisation cellulaire de la Cx43 et prolifération des cellules de neuroblastomes.....	page 92



<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>page 93</b>
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>page 109</b>
<b>6. LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>	<b>page 113</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

	<b>PAGE</b>
<b>TABEAU 1 :</b> Liste des maladies humaines associées aux mutations de différentes connexines	<b>9</b>
<b>TABEAU 2 :</b> Membre de la famille des connexines murins et leurs homologues chez l'humain	<b>11</b>
<b>TABEAU 3 :</b> La famille des principales connexines	<b>19</b>
<b>TABEAU 4 :</b> Distribution cellulaire et tissulaire de la connexine 43	<b>24</b>
<b>TABEAU 5 :</b> Diverses enzymes et leur site de restriction respectif	<b>45</b>
<b>TABEAU 6 :</b> Les différents types d'anticorps utilisés, leur provenances et leurs dilutions pour l'immunofluorescence et l'immunobuvardage	<b>51</b>

## LISTE DES FIGURES

		PAGE
FIGURE 1 :	Modèle schématisé de la structure des jonctions lacunaires	14
FIGURE 2 :	Illustration des sites phosphorylables par différents enzymes sur l'extrémité carboxy-terminale de la connexine 43	21
FIGURE 3 :	Les protéines kinases responsables de la phosphorylation de la connexine 43	28
FIGURE 4 :	Activation de la PKA via l'AMPc	31
FIGURE 5 :	Profil d'expression et sous-localisation de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes	58
FIGURE 6 :	Mise en évidence de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A transfectées avec divers vecteurs	60
FIGURE 7 :	Effet du 8-Br-AMPc sur la sous-localisation de la Cx43 et sur la prolifération des cellules de neuroblastomes murins, les N2A	65
FIGURE 8 :	Profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes de N2A de souris	67
FIGURE 9 :	Profil d'expression relative des différentes isoformes de la PKC chez les enfants atteints de neuroblastome	70
FIGURE 10 :	Profil d'expression relative des différents isoformes de la PKC chez les cellules N2A	72
FIGURE 11 :	Sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A	75
FIGURE 12 :	Analyse de la prolifération des cellules de N2A transfectées avec le vecteur de la Cx43 (N2A-Cx43) non traitées (bleu), traitées avec 2,5 mM de Bisindolylmaléimide (vert) et 2,5 mM de Go6979 (rouge)	77

FIGURE 13 :	Sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A transfectées en réponse au traitement par Gli005	80
FIGURE 14 :	Profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes humains : IMR32	84
FIGURE 15 :	Effet du 8-Br-AMPC sur la sous-localisation de la Cx43 et sur la prolifération des cellules de neuroblastomes humains, les IMR32	87
FIGURE 16 :	Évaluation des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastomes IMR32	90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS :

8-bromo-AMPC	8-bromo-Adénosine-3':5' Monophosphate Cyclique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
BIS	Bisindolylmaléimide – Inhibiteur des PKC
BSA	« Bovine serum albumin »
C-terminale	Carboxy-terminale
Cdc2	Kinase cycline dépendante
Cx	Connexine
Cx43	Connexine 43
C	Cystéine
cPKC	Protéine Kinase C, classique
CREB	« cAMP-regulated enhancer binding protein »
CRE	« cAMP responsive element »
DFNB1	surdité neurosensorielle (autosomale récessive)
DFNA3	surdité neurosensorielle (autosomale dominante)
FBS	Sérum de bovin fœtal
G0	Go6979 – Inhibiteur des PKC classiques
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GJ	« Gap Junction » ou Jonction Lacunaire
IMR32	Lignée cellulaire – neuroblastome humain
JL	Jonction lacunaire
LTR	« Long terminal repeats »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
m. m	Masse moléculaire
N2A	Neuro2A (lignée cellulaire – neuroblastome murin)
NB	Neuroblastome
NF	Neurofilament

NP	Non-phosphorylé
P1	Monophosphorylé
P2	Diphosphorylé
PBS	Solution tampon Phosphate Saline
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PMSF	Phénylméthylsulfonyl
R	Régulatrice (sous unité de la PKA)
RE	Réticulum Endoplasmique
RTase	Reverse transcriptase
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis »

## PROBLÉMATIQUE

Le fonctionnement normal de tout organe ou tissu dépend de la coordination des cellules qui le composent. Ceci implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines et règle en conséquence son propre niveau de fonctionnement (Laird, 2006; Bao et al., 2004; Doble et al., 2004 ; Imanaga et al., 2004; Araya et al., 2003; Evans et Martin, 2002; Meda, 1996). Ainsi, un organe multicellulaire régule sa capacité à conserver un fonctionnement satisfaisant afin de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les variations constantes de l'environnement externe. Cet état d'équilibre, défini comme l'homéostasie, est contrôlé par trois grands processus de communication : 1) la communication extracellulaire (les hormones, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs et les cytokines) 2) la communication intracellulaire; et 3) la communication intercellulaire. La coordination de ces trois routes de communications permet donc à l'organisme de proliférer, de se différencier, d'entrer en apoptose et de s'adapter/répondre aux stimuli (Laird, 2006; Evans et Martin, 2002; Trosko et Ruch, 1998). Ainsi, les cellules d'un tissu ne fonctionnent pas indépendamment les unes des autres. Au contraire, leur activité est étroitement coordonnée.

La plupart des cellules animales synthétisent des protéines membranaires, appelées connexines (Cx) (Mese et al., 2007). Ces protéines forment des canaux transmembranaires, qui permettent à des cellules voisines d'échanger directement des ions minéraux, des messagers secondaires et des métabolites cytoplasmiques de masse moléculaire inférieure à 1 kDa (Chanson et al., 2007). Ce mécanisme de communication intercellulaire, aussi appelé couplage jonctionnel (GJ), est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, au cours du développement embryonnaire et dans les tissus adultes (Chanson et al., 2007 ; Pahujaa et al., 2007 ; Solan et Lampe, 2005). Il permet en effet, la compartimentation cellulaire lors du développement, le maintien de l'homéostasie tissulaire, le maintien des concentrations et du pH intracellulaire, le comportement synchronisé des cellules, l'amplification de la réponse hormonale (couplage métabolique) et la transmission



des signaux régulateurs (couplage électrique) (Moreno et Lau, 2007 ; Laird, 2006 ; Postma et al., 1998 ; Phipps et al., 1997 ; Lo, 1996 ; Phipps et al., 1990 ; Loewenstein, 1980). L'homéostasie repose sur la fonction de ces canaux (Axelsen et al., 2007). Toutefois, la perte ou l'absence de communications cellulaires par les jonctions lacunaires permet aux cellules privées de GJ d'échapper au contrôle des cellules environnantes. Ceci conduit à divers dysfonctionnements et pathologies, notamment les anomalies du développement embryonnaire et le cancer (Toler et al., 2006).

Le neuroblastome est la tumeur solide pédiatrique la plus fréquente chez les enfants en bas âge (Toler et al., 2006 ; Brodeur et al., 2000). Il s'agit d'un cancer embryonnaire des neurones post-ganglionnaires du système nerveux périphérique. La tumeur tire son origine de la migration aberrante des cellules de la crête neurale durant l'embryogenèse (Unsworth et al., 2006). Malgré leur caractère oncogène, les cellules peuvent néanmoins se différencier, leur potentiel de différenciation étant intact (Laird, 2006). Dans de rares cas, chez les enfants diagnostiqués avant l'âge d'un an, les tumeurs régressent spontanément. Cependant, dans 90% des cas diagnostiqués chez les enfants de plus d'un an, le taux de survie à long terme n'est que de 15% (Howman-Giles et al., 2007).

De nos jours, le neuroblastome est traité par ablation, chimiothérapie et radiothérapie (Li et al., 2007 ; Brodeur et al., 2000). Toutefois, au cours du traitement, cette tumeur présente une résistance accrue aux médicaments et elle est de plus en plus difficile à soigner (Li et al., 2007 ; Lovat et al., 2001). Le contrôle de la prolifération par élimination des cellules cancéreuses et la perfusion de cellules de la moelle osseuse reste le seul moyen de traiter cette maladie dans les stades avancés (Otmani et al., 2007 ; Ara et DeClerck, 2006 ; Brodeur et al., 2000 ; Grosfeld, 1999).

Les neuroblastomes spontanés sont extrêmement rares chez les animaux. L'utilisation des cellules Neuro2A de souris a été envisagée comme modèle

cellulaire *in vitro* et, comme xénogreffe, lorsque transfectés chez des animaux, comme modèle animal *in vivo*.

Comme la lignée Neuro2A est connue pour être déficiente en Cx (Moory et al., 2001 ; Jordan et al., 1999), il était nécessaire de la transfecter de manière stable par la Cx43 (exprimée dans les neuroblastomes humains) et d'identifier les voies métaboliques qui régissent l'expression, la sous-localisation et la fonction de la Cx43.

Les recherches présentées dans le cadre de ce mémoire constituent, à différents niveaux, une contribution expérimentale et théorique à l'identification des différences entre les diverses voies de signalisation impliquées dans la modulation des jonctions lacunaires dans les cellules de neuroblastomes humains et murins. Ainsi notre compréhension générale des pathophysiologies engendrés par l'altération des GJ pourrait permettre d'identifier une cible permettant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Un tel modèle demande la comparaison avec des lignées humaines de neuroblastome. En effet, pour la comparaison avec l'état des Cxs dans les lignées humaines, il est nécessaire, dans un premier temps, de décrire l'état des jonctions intercellulaires dans la lignée de neuroblastome humain IMR32. Dans un deuxième temps, il est important de déterminer si les mécanismes qui les régulent et la restauration de la fonction des jonctions lacunaires restaurent un phénotype quasi normal. Ainsi, nous pourrions comparer sur ces deux lignées, humaine et animale.

## **OBJECTIFS DU PROJET**

Les deux seules caractéristiques communes à tous les cancers sont l'absence de contrôle de la prolifération et la perte de communication intercellulaire résultant de l'altération des canaux jonctionnels et/ou des Cxs (Toler et al., 2006; Phipps et al., 1997). Ainsi, les jonctions lacunaires des lignées cellulaires de neuroblastomes humains (IMR32), ne sont pas fonctionnelles bien que la Cx43, la protéine qui forme les jonctions lacunaires, soit exprimée (Arnold et al., 2005; Carystinos et al., 2001 et Phipps et al., 1997). Cette situation est commune à beaucoup d'autres cancers (Conklin et al., 2007 ; Pointis et al., 2005 ; Haass et al., 2004 ; Defamie et al., 2001; Martin et al., 2001; Yamasaki et al., 1999).

Le but de ce travail est d'identifier les mécanismes de signalisation cellulaire qui régulent les communications intercellulaires des cellules de Neuro2A et de les comparer dans les deux modèles cellulaires utilisées : humain et murin. L'identification des voies d'altération des jonctions lacunaires dans les cellules de neuroblastomes permettrait de les modifier afin de normaliser les échanges intercellulaires par les canaux jonctionnels et ainsi de limiter la croissance des tumeurs.

Le premier objectif consistait à déterminer l'importance de la Cx43 dans la tumorigénicité des cellules de neuroblastome murins : les Neuro2A (N2A). En effet, les N2A n'expriment pas de connexine de façon endogène (Moory et al., 2001 ; Jordan et al., 1999) et sont donc déficientes en communication intercellulaire. Ces cellules sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des transfectants stables exprimant diverses connexines à des fins d'étude structurale (Gemel et al., 2006 ; Laird, 2006 ; Tanmahasamut et al., 2005 ; Zhong et al., 2003, Statuto et al., 1997; Zhu et al., 1991; Eghbali et al., 1990). L'objectif du projet a été de transfecter les cellules de Neuro2A avec des vecteurs contenant a) la Cx43, b) la Cx43 fusionnée avec la GFP, c) la partie C-terminale de la Cx43 et d) un vecteur contenant le gène de la Cx43-GFP dans le sens inverse, en utilisant les méthodes classiques de clonage. La transfection de la partie C-terminale de la

Cx43 se justifie du fait que tout processus, de la transcription à l'ouverture des canaux, « gating », dépend de la phosphorylation de différents sites sur cette extrémité C-terminale (Moreno et Lau, 2007 ; Seki et al., 2004 ; Moreno et al., 2002 ; Elenes et al., 2001). Il existe plusieurs enzymes capables de phosphoryler l'extrémité C-terminale des connexines notamment plusieurs sérine/thréonine, protéines kinases et tyrosine kinases (Gemel et al., 2006; Laird, 2006; Dang et al., 2003; Sin et al., 2001; Stagg et Fletcher, 1990; Meda et al., 1984).

Les articles récents mentionnent que la transfection est réalisée sur des cellules différenciées de neuro2A (Delaune et al., 2007 ; Miloso et al., 2004 ; Carystinos et al., 2001 ; Mao et al., 2000). Nous avons plutôt concentré nos travaux sur la transfection des cellules non différenciées afin d'étudier l'influence des connexines dans les cellules non différenciées ou en cours de différenciation.

Le deuxième objectif était d'étudier les voies métaboliques associées aux PKA et PKC et d'évaluer leur implication au niveau de la fonction des Cxs ainsi qu'au niveau de la formation des jonctions lacunaires dans les cellules de N2A, puisque ces voies sont celles empruntées pour phosphoryler les motifs situés sur la partie C-terminale de la Cx43. Les techniques utilisées ont été : l'immunobuvardage pour identifier le profil d'expression et le niveau de phosphorylation de la Cx43, la technique de chargement par grattage (« scrape loading ») en présence d'un colorant fluorescent pour mesurer le niveau de communication jonctionnelle et enfin l'immunocytochimie et l'épi-fluorescence pour déterminer la sous-localisation de la Cx43 transfectée (membranaire ou cytoplasmique).

Le troisième objectif de ce projet était de confirmer l'identification de la ou des connexines exprimées dans le modèle cellulaire d'IMR32 et d'explorer l'altération potentielle de la fonction des jonctions lacunaires.

Le quatrième objectif consistait à confirmer la contribution des différentes voies métaboliques capables de rétablir la perméabilité jonctionnelles dans les

IMR32. En effet, un grand nombre de signaux (oncogènes, autocrines, facteurs de croissance, neurotransmetteurs et hormones) interviennent dans la régulation des jonctions lacunaires et régulent le niveau de communication intercellulaire en activant des protéines kinases (Chanson et al., 2007; Pahuja et al., 2007; Laird, 2006; Bao et al., 2004; Lau et al., 1996).

Dans les deux modèles cellulaires, nous avons choisi une approche pharmacologique par inhibition et/ou activation des voies métaboliques principales : la PKA et la PKC afin d'élucider si les mêmes voies métaboliques sont impliquées dans la régulation des jonctions lacunaires dans les phénotypes humains et murins. Enfin, un médicament en développement a été testé dans les deux modèles selon les techniques décrites dans le deuxième objectif.

Cette étude nous permettra d'analyser la modulation des jonctions lacunaires chez les neuroblastomes de souris afin de déterminer leur utilité comme modèle d'étude *in vivo*.

## **1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1.1 Le cancer**

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale (Nicolis, 2006; Toler et al., 2006), la perte de la différenciation (Conklin et al., 2007 ; Jones et al., 2006 ; Sutor et Hagerty, 2005) et l'absence de la mort cellulaire programmée (Fulda, 2007; Poggi et Zocchi, 2006; Teitz et al., 2001). En général, l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'initiation du processus de différenciation ou de mort cellulaire (apoptose) est engendrée par de multiples signaux (Fulda, 2007; Peng et al., 2007; Yang et al., 2003). Dans les conditions normales de l'organisme adulte, la prolifération des cellules est un processus multifactoriel rigoureusement contrôlé, qui contribue à la réparation de certains tissus ou à leur renouvellement (Chenwei et al., 2007; Chanson et al., 2005; Wei et al., 2004). Cette stabilité du tissu est régulée par des interactions très étroites entre les cellules (Meşe et al., 2007). Or, dans le cas du cancer, cet équilibre ou homéostasie est rompue : la prolifération cellulaire qui mène à la formation d'une tumeur ne s'accompagne pas d'un processus de différenciation adéquat (Laird, 2006; Mezencev et Kohút, 2004; Evans et Martin, 2002). Ainsi, la multiplication cellulaire incontrôlée conduit à l'hyperplasie d'un tissu et éventuellement une tumeur se développe à la suite de mutation(s) génétique(s) ou somatique(s) (Nicolis, 2006 ; Pointis et al., 2005). Ces dernières augmentent avec la croissance de la tumeur.

### **1.2 Les neuroblastomes**

Le neuroblastome est la plus fréquente des tumeurs solides chez les enfants entre 0 et 5 ans (Edsjö et al., 2007 ; Toler et al., 2006 ; Brodeur et al., 2000). Il représente 20% des cancers pédiatriques ; son incidence est de 1/7500 correspondant à la seconde cause de mortalité de cette tranche d'âge après les accidents domestiques (Howman-Giles et al., 2007). Il s'agit d'un cancer embryonnaire des neurones post-ganglionnaires du système nerveux périphérique. La tumeur tire son origine de la migration aberrante des cellules de la crête neurale durant l'embryogénèse (Li et al., 2007 ; Lovat et al., 2001). Son origine provient de cellules neuronales embryonnaires qui se localisent dans le cou, le



thorax, l'abdomen ou le bassin (Unsworth et al., 2006). Malgré leur caractère embryonnaire, ces cellules peuvent néanmoins se différencier, au moins *in vitro* leur potentiel de différenciation étant intact (Laird, 2006; Evans et Martin., 2002; Trosko et Ruch, 1998). Le dépistage du neuroblastome est rendu possible grâce à la propriété de cette tumeur de sécréter dans plus de 85% des cas des catécholamines (acide vanilmandéliques (VMA) et acide homovanilique (HVA)) (Li et Behshti, 2005 ; Black et al., 1999).

Le neuroblastome est souvent présent au moment de la naissance, mais les symptômes ne font leur apparition qu'une fois que la tumeur a progressé. La tumeur démontre une grande variabilité allant d'une régression spontanée à une forme maligne agressive (Otmani et al., 2007 ; Ara et DeClerck, 2006 ; Brodeur et al., 2000 ; Grosfeld, 1999). On estime à 70% les patients atteints de cette maladie qui perdent la vie malgré les traitements chimiothérapeutiques sévères (Li et Behshti, 2005 ; Lovat et al., 2001; Brodeur et al., 2000 ; Evans, 1980). Dans de rare cas, chez les enfants diagnostiqués avant l'âge d'un an, les tumeurs sont bénignes et régressent spontanément sans aucun traitement. Cependant, dans 90% des cas diagnostiqués, les enfants ont plus de un an et le taux de survie à long terme n'est que de 15% (Li et Behshti, 2005). En effet, dans certains cas, il arrive que la tumeur se transforme en lésion bénigne suite à sa différenciation, mais elle peut aussi se propager et former des métastases, particulièrement aux ganglions lymphatiques, au foie, à la peau, aux os et à la moelle osseuse (Otmani et al., 2007 ; Ara et DeClerck, 2006; Matthay, 1999 ; Castleberry, 1997).

Les causes de cette maladie sont inconnues mais il est possible que plusieurs facteurs environnementaux y soient associés notamment l'exposition prénatale à certains produits comme l'alcool et le phénobarbital ou à un certain type de traitement médical contre les infections vaginales durant les mois de grossesse de la mère (Lovat et al., 2001 ; Black et al., 1999).

### **1.2.1 Origine et caractérisation des lignées cellulaires de neuroblastomes**

Les deux modèles de lignées cellulaires utilisées dans ce travail sont : la lignée cellulaire de neuroblastome humain IMR32 et la lignée murine Neuro2A (N2A).

Les cellules IMR32 dérivent d'une masse abdominale de neuroblastome formée dans un fœtus mâle de 3 mois (Tumilowicz et al., 1970). Elles présentent une amplification du gène N-Myc (25 x). Des cultures cellulaires contenant les cellules non différenciées ont été établies à partir de la culture primaire (Tumilowicz et al., 1970). En culture *in vitro*, ces cellules sont capables de se différencier dans des conditions appropriées. Elles récapitulent alors l'ontogénie des neurones du système nerveux périphérique. Les cellules IMR32 représentent donc un modèle attrayant pour l'étude des événements cellulaires majeurs comme la différenciation (Kaneko et al., 2006) et la prolifération cellulaire (Koppen et al., 2007; Hirayama et al., 2000).

Les cellules de N2A proviennent des neuroblastes du cerveau de souris *Mus musculus* ; le neuroblastome a été établi à partir d'une tumeur spontanée chez une souris albinos de souche A. Les cellules de N2A sont déficientes en communications intercellulaires (Jordan et al., 1999 ; Moory et al., 2001) et sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des transfectants stables exprimant diverses connexines pour l'étude de la communication jonctionnelle (Gemel et al., 2006 ; Laird, 2006 ; Tanmahasamut et al., 2005 ; Zhong et al., 2003, Statuto et al., 1997; Zhu et al., 1991; Eghbali et al., 1990).

### **1.3 La communication jonctionnelle**

Le fonctionnement normal de tout organisme multicellulaire implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines et règle en conséquence son propre niveau de fonctionnement (Axelsen et al., 2007; Meşe et al., 2007; Vinken et al., 2006;

Meda, 1996). Ainsi, un organisme multicellulaire régule sa capacité à conserver un fonctionnement satisfaisant afin de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les variations constantes de l'environnement externe (Laird, 2006; Chanson et al., 2005; Schneeberger et Lynch, 2004; Trosko et al., 1990). Cet état d'équilibre synchronisant les réponses aux stimuli externes, définit l'homéostasie. Elle est assurée par les jonctions lacunaires.

### 1.3.1 Perméabilité jonctionnelle

Les jonctions lacunaires sont constituées de protéines, appelées connexines, appartenant à une famille dont les membres sont désignés par leur poids moléculaire (connexine 32 à 62, chez l'humain). La plupart des cellules animales synthétisent plusieurs membres de la famille des connexines, dont la séquence et la topographie ont été très conservées au cours de l'évolution (Jordan et al., 1999; Bennett et al., 1994). Ces protéines forment des canaux transmembranaires, regroupés au niveau des jonctions intercellulaires, dont la propriété unique est de permettre à des cellules voisines d'échanger directement et dans les deux sens de nombreux ions et métabolites cytoplasmiques de moins de 1kDa et de 1,5 nm. Les pores des canaux sont perméables à un grand nombre de molécules endogènes, comprenant des nucléotides (dont l'AMPc), des acides aminés, des co-facteurs vitaminiques, des métabolites des phospho-inositides (IP<sub>3</sub>), des sucres (glucose 6-phosphate), des ions Ca<sup>2+</sup>, des molécules énergétiques ADP, ATP, adénosine, etc. (Harris, 2007; Viken, 2005 ; Evans et Martin, 2002 ; Rivedal et al., 2001). Ce mécanisme de communication intercellulaire, aussi appelé couplage jonctionnel, a été impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, au cours du développement embryonnaire et dans les tissus adultes (Huettner et al., 2006; Houghton, 2005; Malassiné et Cronier, 2005; Meda, 1996). Elles permettent en effet, la compartimentation cellulaire lors du développement, le maintien de l'homéostasie tissulaire, le maintien des concentrations et du pH intracellulaire, le comportement synchronisé des cellules, l'amplification de la réponse hormonale (couplage métabolique), la transmission des signaux

régulateurs (couplage électrique) (Charpantier et al., 2007; Nlend et al., 2006; Haefliger et al., 2005; Postma et al., 1998 ; Phipps et al., 1997 ; Lo, 1996 ; Phipps et al., 1990 ; Loewenstein, 1980). L'échange de ces substances, non-spécifiques, à bas poids moléculaire, à travers les jonctions lacunaires, est une façon importante pour la cellule de réguler le processus d'homéostasie, de prolifération et de différenciation et de maintenir un consensus face aux stimuli externes afin de synchroniser leur réponse (Conklin et al., 2007; Fulda, 2007; Poggi et Zocchi, 2006; Postma et al., 1998 ; Phipps et al., 1997 ; Lo, 1996 ; Phipps et al., 1990 ; Loewenstein, 1980).

La perméabilité de chaque type de connexine étant sélective, elles contrôlent le passage d'informations spécifiques sous la forme des messagers secondaires – co-facteurs des kinases, les enzymes clef qui conditionnent l'état de différenciation des cellules, par exemple. De fait, la distribution de chaque type de connexine est spécifique du tissu chez l'adulte et est régulée d'une façon extrêmement précise durant l'embryogenèse.

### **1.3.2 Les jonctions lacunaires et leurs rôles dans diverses pathologies**

Des études récentes indiquent qu'une altération du mécanisme de communication intercellulaire pourrait jouer un rôle considérable dans diverses maladies et dans 99% des cancers (Fulda, 2007 ; Phipps et al., 1997). Les mutations de certaines Cxs sont à l'origine de nombreuses maladies humaines héréditaires (Tableau 1) telles que la cataracte (Bilchick et al., 2007; Harris, 2007 ; Shiels et al., 1998), la surdité (Kenna et al., 2001), l'infertilité (Axelsen et al., 2007; Simon et al., 1997) et l'arythmie cardiaque (Welch et al., 2007; King et al., 2000). Une mutation de la Cx43 (caractérisée par la substitutions du résidu sérine 364 par un résidu proline) cause l'hétérotaxie viscéroatriale et engendre une malformation cardiaque, une atrophie musculaire, la faiblesse des membres et une perte de sensibilité (Wang et al., 2004; Gutstein et al., 2003; King et al., 2000). De plus, la neuropathie périphérique héréditaire de Charcot-Marie-Tooth résulte d'une mutation au sein de la Cx32 qui engendre la dégénération axonale et la démyélinisation de nerfs périphériques (Dubourg et al., 2001). Des anomalies

du gène de la Cx26, sont responsables d'une surdité neurosensorielle de transmission autosomique récessive (DFNB1), d'une surdité neurosensorielle beaucoup plus rare de transmission autosomique dominante (DFNA3), et de différentes surdités associées à des signes cutanés : syndrome de Vohwinkel (surdité associée à une hyperkératose palmoplantaire) (Kenna et al., 2001). Des altérations des Cx30, Cx31 et Cx43 sont aussi responsables de surdités isolées ou syndromiques chez l'homme. La Cx40 est propre au tissu auriculaire du coeur et joue un rôle crucial dans la conduction des impulsions électriques. Des mutations héréditaires dans le gène producteur de Cx40 chez les patients atteints de fibrillation auriculaire ont été découvertes (Tableau 1).

De plus, l'altération de la fonctionnalité des jonctions lacunaires en absence de mutation des connexines contribue à un grand nombre de maladies comme le diabète, la neurodégénération, l'hypertension, la détérioration des fonctions rénales et le dysfonctionnement érectile (Want et al., 2004 ; Simon et al., 1999).

### 1.3.3 Les connexines

Depuis les travaux de séquençage et de clonage de la première connexine, Cx32, par Paul et ses collègues en 1986, la famille des connexines s'est accrue et contient 20 membres murins et 21 humains (Yen et al., 2007; Cruciani et al., 2006; Laird, 2006) (Tableau 2). Ces connexines sont désignées par leur poids moléculaire (connexine 32 à 62, chez l'humain) ainsi que mentionné plus haut. Ces protéines polytopiques de la membrane plasmique ont une demi-vie de quelques heures (5 heures dans les hépatocytes du foie et 1,3 heures dans le coeur) (Laird, 2005) et sont synthétisées pratiquement dans chaque type de cellule animale (Bennett et al., 1991).

La plupart des gènes des connexines sont distribués sur des chromosomes différents (Mese et al., 2007; Yen et al., 2007; Fishman et al., 1991). Dans l'espèce 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

**Tableau 1 – Liste des maladies humaines associées aux mutations de  
différentes connexines**

Connexine	Maladie humaine	Pathologie
Cx26	Surdité	Surdité neurosensorielle de transmission autosomique récessive (DFNB1) ; d'une surdité neurosensorielle beaucoup plus rare de transmission autosomique dominante (DFNA3) ; surdité associées à des signes cutanés : syndrome de Vohwinkel (surdité associée à une hyperkératose palmoplantaire).
Cx32	Charcot-Marie-Tooth	Neuropathie périphérique héréditaire : atteintes motrices et sensibles distales – une atrophie musculaire, la faiblesse des membres et une perte de sensibilité – souvent associée à une surdité
Cx30	Surdité	Surdité autosomique dominante Dysplasie ectodermique hydrotique de Clouston
Cx30,3		Maladie de la peau autosomale dominante
Cx31		Erythro-kératodermie variabilis Surdité
Cx40	Fibrillation auriculaire	Arythmie cardiaque (battements irr�guli�rs)
Cx43	H�t�rotaxie v�sc�roatriale	malformations cardiaques et à l'insuffisance rénale
Cx46 Cx50		Cataracte

(Tiré de : Axelsen et al., 2007; Bilchick et al., 2007; Gropman et Adams, 2007; Harris, 2007; (modifiée de Kelsell et al., 2001 ; Mazereeuw-Hautier et al., 2007; Welch et al., 2007; Dzhemileva et al., 2006; Sliwi nska-Kowalska et al., 2006; Boralevi et al., 2005; Tekin et al., 2003; Yotsumoto et al., 2003; Latour et al., 1997; Bennett et al., 1994)

**Tableau 2 – Membres de la famille des connexines murines et leurs homologues chez l'humain (Laird, 2006)**



<b>Connexines Murines</b>	<b>Connexine Humaines</b>
Cx23	Cx23
	Cx25
Cx26	Cx26
Cx29	Cx30,2
Cx30	Cx30
Cx30,2	Cx31,9
Cx30,3	Cx30,3
Cx31	Cx31
Cx31,1	Cx31,1
Cx32	Cx32
Cx33	
Cx36	Cx36
Cx37	Cx37
Cx39	Cx40,1
Cx40	Cx40
Cx43	Cx43
Cx45	Cx45
Cx46	Cx46
Cx47	Cx47
Cx50	Cx50
	Cx59
Cx57	Cx62

(Tiré de : Söhl et al., 2003; Söhl et Willecke, 2003; Willecke et al., 2002; Eiberger et al., 2001)

Cx43 sur le chromosome 5 (Söhl et al., 2003; Shibata et al., 2001; Meda, 1996). 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, suggérant un partage possible de séquences régulatrices (Duffy et al., 2006; Shibata et al., 2001; Trosko et al., 1998). Il n'y a pas cependant de lien immédiat entre ce regroupement chromosomique et l'expression des connexines. Ainsi, alors que la Cx37 et la Cx40 sont généralement produites dans les mêmes tissus, les Cx26 et Cx46 proviennent de tissus différents (Gerido et White, 2004; Krutovskikh et Yamasaki, 2000).

Tous les gènes des connexines étudiés à ce jour démontrent une structure similaire comportant deux exons séparés par un long intron (Yen et al., 2007; Fisherman et al., 1991). Le petit exon (d'environ 100 paires de bases) code pour une séquence non-transcrite (Mese et al., 2007). Il est séparé du deuxième exon par un long intron (6 000-8 000 paires de bases) qui contient un site accepteur d'épissage en amont du codon du début (Mese et al., 2007; Yen et al., 2007). Le deuxième exon contient en un bloc toute la séquence codante pour la protéine (Oyamada et al., 2005). Les promoteurs du gène de la Cx43 de différentes origines soit humain, rat et souris ont été clonés (Chen et al., 1995). Les 3 promoteurs contiennent une boîte TATA située en amont du codon et plusieurs activateurs de protéines de transcription comme les sites AP-1 et AP-2 (Duffy et al., 2006; Oyamada et al., 2005; Trosko et al., 1998 ; Chen et al., 1995).

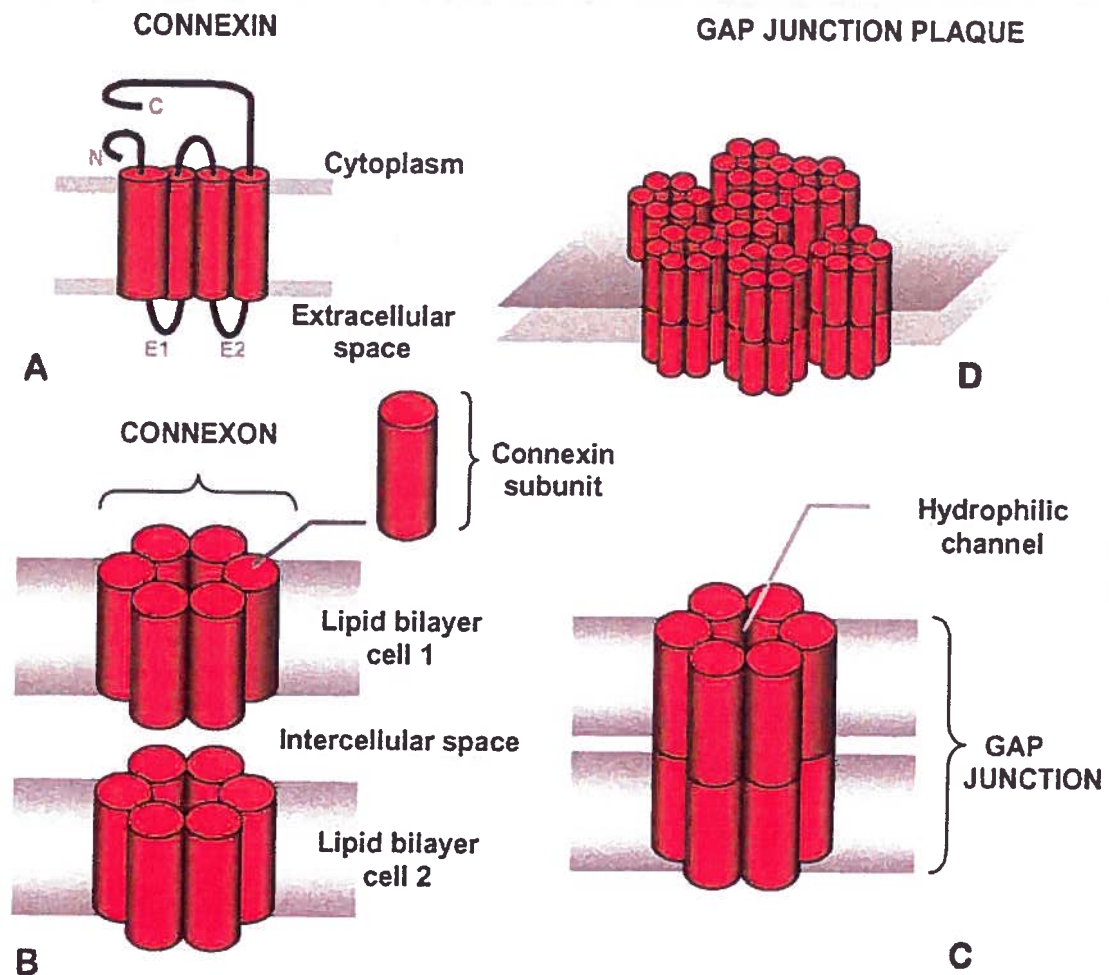
#### **1.3.4 La topologie des connexines**

Chaque sous-unité possède une topologie identique : les deux terminaisons (amine et carboxyle) sont localisées dans le cytoplasme alors que la molécule traverse 4 fois la membrane plasmique (4 domaines transmembranaires hydrophobes: M1, M2, M3 et M4), formant ainsi une boucle intracellulaire (I) et deux boucles extracellulaires (E1 et E2) (Figure 1 A) (Kovacs et al., 2007; Skerrett et al., 2002; Goodenough et al., 1997). Le domaine M3 est impliqué dans la formation du pore central hydrophile par lequel transitent les molécules et les

**Figure 1 – Modèle schématisé de la structure des jonctions lacunaires.**

(Tiré de : Kovacs et al., 2007; Sosinsky et al., 2005 ; Skerrett et al., 2002; Falk, 2000; Goodenough et al., 1997; Kumar et al., 1996)

- A) Une connexine possède 4 domaines transmembranaires (M1, M2, M3 et M4), et traverse 4 fois la membrane plasmique, formant une boucle intracellulaire (I) et deux boucles extracellulaires (E1 et E2). Elle est caractérisée par deux terminaisons (amine et carboxyle) localisées dans le cytoplasme.
- B) Les connexines s'assemblent en complexes de six sous unités qui forment une connexone ménageant ainsi un pore. Les connexones présentes dans les membranes de deux cellules voisines se placent en vis-à-vis, se lient entre elles et forment ainsi une jonction percée par un pore reliant les cytoplasmes des deux cellules contigües.
- C) Plusieurs connexones rassemblées en un champs membranaire, plus au moins étendu, forment des plaques jonctionnelles.
- D) La portion centrale de chaque connexone comporte un espace hydrophile de 2 à 4 nm de diamètre qui constitue la moitié d'un canal jonctionnel d'environ 10 nm.



(Kovacs et al., 2007; Mese et al., 2007; Yen et al., 2007; Duffy et al., 2006; Oyamada et al., 2005; Sosinsky et al., 2005; Gerido et White, 2004; Söhl et al., 2003; Skerrett et al., 2002; Shibata et al., 2001; Falk, 2000; Krutovskikh et Yamasaki, 2000; Trosko et al., 1998; Goodenough et al., 1997; Kumar et al., 1996; Meda, 1996; Chen et al., 1995; Fishman et al., 1991)

ions. Enfin, la partie extracellulaire comprend deux boucles (E1 et E2) possédant chacune trois cystéines (C) conservées chez tous les membres de la famille (Sosinsky et al., 2005 ; Falk, 2000 ; Kumar et al., 1996). Trois cystéines participent à la formation de ponts di-sulfures intramoléculaires, qui confèrent aux connexines une conformation compacte et rigide leur permettant d'interagir étroitement avec les connexines des cellules adjacentes (Laird 2006 ; Söhl, 2004; Evans et Martin, 2002). Leur interaction étroite isole ainsi le canal intercellulaire hydrophile du milieu extracellulaire (Kovacs et al., 2007 ; Sosinsky et al., 2005).

Les homologies entre les différentes connexines sont assez fortes sauf au niveau de la boucle intracellulaire et de la terminaison carboxyle qui peut varier en longueur et en séquence (Mese et al., 2007 ; Yen et al., 2007). Cette terminaison carboxyle leur confère une spécificité fonctionnelle puisqu'on y trouve, selon les connexines, des résidus phosphorylables ainsi que des sites possibles d'interaction avec d'autres protéines (Solan et Lampe, 2005; Lampe et Lau, 2004 ; Warn-Cramer et Lau, 2004).

### 1.3.5 Les connexones

Avant le transfert à la membrane cellulaire, six connexines s'oligomérisent au niveau du Réticulum Endoplasmique et du Golgi (Figure 1 B) pour former des structures tubulaires creuses, un pore, appelé connexone (Flak et al. 2000). Les connexones présentes dans les membranes de deux cellules voisines se placent en vis-à-vis, se lient entre eux et forment ainsi une jonction percée par un pore reliant les cytoplasmes des deux cellules contiguës (Chanson et al., 2007 ; Pahuja et al, 2007; Solan et Lampe, 2005). Il existe des connexones homomériques (composées des même connexines) et hétéromériques (composés de 2 - ou plus - différentes connexines). Les connexones sont ensuite incorporées, après la fusion de vésicules golgiennes avec la membrane plasmique dans les régions membranaires qui ne participent pas aux contacts intercellulaires (Moreno et Lau, 2007 ; Barbe et al., 2006). Chaque connexone traverse alors complètement la double couche lipidique de la membrane, exposant une de ses extrémités dans le cytoplasme et l'autre dans l'espace intercellulaire (Figure 1 C). La portion

centrale de chaque connexone comporte un espace hydrophile de 2 à 4 nm de diamètre qui constitue la moitié d'un canal jonctionnel (Yen et al., 2007). Lorsqu'un contact intercellulaire est établi, les connexones d'une cellule s'alignent bout à bout avec celles de la cellule voisine, établissant un canal hydrophile continu long d'environ 10 nm (Mese et al., 2007; Duffy et al., 2006; Oyamada et al., 2005). Ainsi que rapporté plus haut, ce canal jonctionnel met en communication directe le cytoplasme des deux cellules en contact, par delà l'espace intercellulaire (Kovacs et al., 2007; Söhl et al., 2003). Ces jonctions sont généralement rassemblées en champs membranaires, les plaques de jonctions lacunaires, plus au moins étendues (Figure 1 D) (Sosinsky et al., 2005; Gerido et White, 2004).

On trouve également des demi-canaux (où les connexones ne sont pas reliées à celles de la cellule voisine) que l'on pensait fonctionnellement fermés, jusqu'à ce que l'extrémité intercellulaire des connexones soit isolée de l'espace environnant pour éviter une rapide dialyse cytoplasmique. Cependant on a démontré l'existence de demi canaux fonctionnels, les hemi-canaux. Ces canaux s'ouvrent en particulier dans les neurones durant des épisodes d'ischémie (Dhein et al., 2006 ; Thompson et al., 2006 ; Cascio et al., 2005).

### 1.3.6 Biosynthèse, assemblage et transport des connexines

Tout comme les autres protéines intégrales de la membrane, les connexines sont synthétisées dans le Réticulum Endoplasmique (RE) et y sont co-transcriptionnellement insérées (Koval, 2006 ; Salameh, 2006). Même si les connexines ne sont pas glycosylées, il semblerait qu'une ou plusieurs protéines chaperonne(s) soi(en)t impliquée(s) lors de l'organisation topologique finale et l'obtention de l'état stable (Laird, 2006). De nombreuses études ont démontré que l'oligomérisation de la grande majorité des connexines se produisait aussi lors de la période de transition dans le Réticulum Endoplasmique (Thomas et al., 2005 ; Maza et al., 2003) sauf pour la Cx43 et 46 (Moreno et Lau, 2007; Laird, 2006). Ces dernières semblent être présentes sous leur forme monomérique dans l'appareil de Golgi et s'oligomérisent seulement dans le *trans*-Golgi (Koval et al.,

1997 ; Musil et al., 1993). Il a aussi été suggéré que la Cx43 est phosphorylée de façon transitoire très tôt dans la voie sécrétoire mais il semble que la plupart de la phosphorylation est acquise une fois la protéine arrivée à la membrane cellulaire. Des intermédiaires vésiculaires pléiomorphiques semblent être impliqués dans le transport des connexines à la membrane plasmique, ce processus semble être facilité par les microtubules (Martin et Evans, 2004; Musil et al., 1993). L'appareil contractile, ainsi que son remodelage, induit par le changement de longueur des filaments intermédiaires est régie par diverses voies de signalisation impliquant le dynamique de l'actine (Wall et al., 2007; Lau, 2005; Irie et al., 2004)

### **1.3.7 Les diverses isoformes des connexines**

Même s'il existe une vingtaines d'isoformes de connexines chez les mammifères (Tableau 3), leurs séquences sont très conservées. Elles partagent donc des similarités au niveau structural : 4 portions hydrophobes dont 2 boucles intercellulaires et 1 boucle cytoplasmique et d'une extrémité carboxy-terminale exposée dans le cytoplasme (Kovacs et al., 2007; Skerrett et al., 2002). Toutefois, elles diffèrent considérablement entre elles en ce qui concerne la taille de la boucle cytoplasmique et la longueur de l'extrémité carboxy-terminale (Laird 2005 ; Sosinsky et al., 2005; Falk, 2000; Kumar et al., 1996). Ainsi, la variabilité de cette extrémité a permis la production d'anticorps spécifiques utilisés pour l'immunolocalisation des différentes isoformes. De plus, cette région est très importante au niveau de la fonctionnalité de la connexine puisque l'ouverture et/ou la fermeture des canaux jonctionnels dépend de l'état de phosphorylation des résidus sérine-thréonine sur cette extrémité (Figure 2) (Moreno et Lau, 2007; Britz-Cunningham et al., 1995). En effet, la plupart des connexines (Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 et Cx56) détiennent des séquences consensus de phosphorylation par les protéines kinases (Lampe et Lou, 2000). La Cx26 est une exception (Laird, 2006).

**Tableau 3 – La famille des principales connexines.**

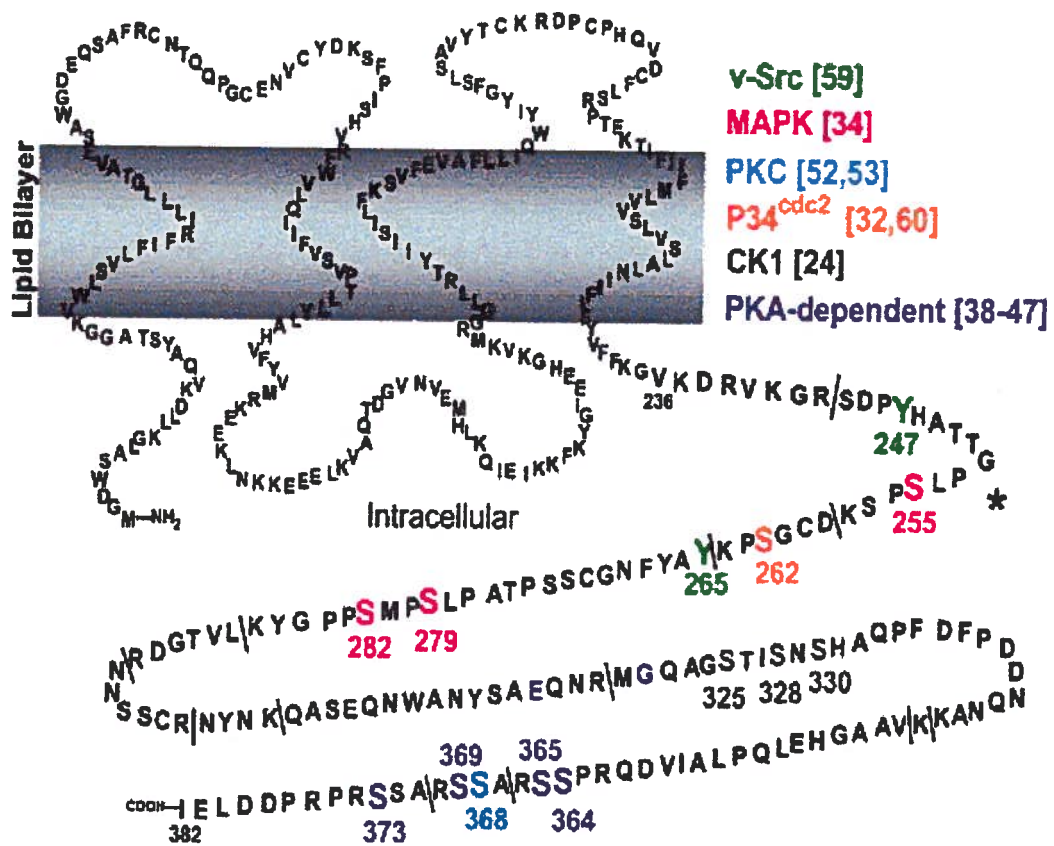


Connexines	Poides moléculaires (kDa)	Organe d'expression
Cx50	49,6	Cellules épithéliales de la cornée
Cx46	46,0	Fibres du cristallin, cellules musculaires cardiaques
Cx45	45,6	Cellules musculaires cardiaques, cellules du blastocytes, cellules épithéliales du poumon
Cx43	43,0	Cellules musculaires cardiaques, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices des glandes endocrines, kératinocytes
Cx40	40	Certaines cellules endothéliales, certains kératinocytes et les cellules musculaires cardiaques
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, certaines neurones, oligodendrocytes, cellules 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

(Tiré de : Cruciani et Mikalsen, 2006 ; Araya et al., 2003 ; Neuhaus et al., 2002 ; Sui et al., 2002)

**Figure 2 – Illustration des sites phosphorylables par différents enzymes sur l'extrémité carboxy-terminale de la connexine 43.**

Cette représentation démontre la composition en acide aminé de la connexine 43. Les sites phosphorylables sur l'extrémité carboxy-terminale de la protéine sont représentés en couleur. Chaque couleur correspond à une enzyme spécifique responsable de la phosphorylation de ces résidus: v-Src (vert clair), MAPK (rose), PKC (bleu), p34<sup>cdc2</sup> (orange), CK1 (vert foncé) et la PKA-dépendent (violet).



(Laird, 2006)

### **1.3.8 La connexine 43 (Cx43)**

La distribution des connexines varie au cours du développement selon l'état fonctionnel du tissu ou de l'organe (Axelsen et al., 2007; Meşe et al., 2007; Vinken et al., 2006). En effet, d'un type cellulaire à l'autre, chaque connexine a son propre patron d'expression (Laird, 2005 ; Malassiné et Cronier, 2005). Certaines connexines sont produites par de très nombreux types cellulaires, alors que d'autres ont une distribution beaucoup plus restreinte. Néanmoins, la plupart des cellules expriment plus d'une connexine (Dzhemileva et al., 2006 ; Servers et al., 2006 ; Pointis et Segretain, 2005 ; Meda, 1996).

La vaste majorité des études faites sur les connexines concernent la Cx43 puisqu'elle est retrouvée extensivement chez les mammifères (Laird, 2006) (Tableau 4). Elle est largement distribuée dans une grande variété de cellules et tissus incluant les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes, les astrocytes, les cellules du myocarde et d'autres tissus lisses et connectifs (Bermudez-Fajardo et al., 2007 ; Neijssen et al., 2007 ; Oviedo-Orta et Evans, 2002 ; Kumar et al., 1996; Lo, 1996). Les cellules embryonnaires de la crête neurale expriment aussi la Cx43 et la Cx46 durant leur migration, et leur survie dépend de la présence de la fonctionnalité des jonctions lacunaires (Edsjö et al., 2007 ; Li et al., 2007 ; Unsworth et al., 2006 ; Lovat et al., 2001 ; Bannerman et al., 2000). La mutation du gène de la Cx43 chez les souris engendre la mort de l'animal à la fin de la vie foetale et sa mutation provoque une malformation cardiaque chez l'homme (Chen et al., 1995).

### **1.3.9 La régulation des connexines**

La communication cellulaire via les jonctions lacunaires est régulée à plusieurs niveaux : la transcription du gène de la Cx, l'assemblage des Cxs en connexones, le transport à la membrane plasmique, l'assemblage de connexones en canaux jonctionnels, l'ouverture et la fermeture du canal jonctionnel, le désassemblage des jonctions lacunaires et la dégradation des connexines par voie protéosomique et/ou lysosomique (Laird, 2006). La phosphorylation est le principal mécanisme de régulation (Moreno et Lau, 2007 ; Lampe et Lau, 2000).

**Tableau 4 – Distribution cellulaire et tissulaire de la connexine 43**

(Bermudez-Fajardo et al., 2007 ; Neijssen et al., 2007 ; Dzhemileva et al., 2006 ; Komuro, 2006 ; Lee et Pogwizd, 2006 ; Servers et al., 2006 ; Michon et al., 2005 ; Pointis et Segretain, 2005 ; Araya et al., 2003 ; About et al., 2002 ; Oviedo-Orta et Evans, 2002 ; Neuhaus et al., 2002 ; Seki et Komuro, 2002 ; Sui et al., 2002 ; Arensbak et al., 2001 ; Iino et al., 2001 ; Ihara et al., 2000 ; Ilvesaro et al., 2000 ; Nemeth et al., 2000 ; Wang et al., 2001 ; Meda, 1996)

<b>Tissu</b>	<b>Type cellulaire</b>
Cardiaque	Cardiomyocytes Cellules musculaires lisses
Cavité orale	Kératinocytes
Pulpe dentaire	Odontoblastes Cellules de la pulpe dentaire Fibroblastes périodontaux
Glandes salivaires	Cellules myoépithéliales
Œsophage et estomac	Cellules épithéliales
Gastroduodenum	Cellules musculaires
Petit intestine	Cellules musculaires, Cellules de Cajal
Colon	Cellules musculaires
Pancréas	Cellules- $\beta$ endocrines
Glande pituitaire	Cellules du pituitaire antérieur et postérieures
Glande parathyroïd	
Glande thyroïde	Cellules épithéliales thyroïdiennes
Glande adrénaie	
Peau	Kératinocytes, Fibroblastes dermiques
Muscles (myogénèse)	Myoblastes
Cerveau	Astrocytes, Cellules leptomeningiales, Cellules ependymales
Testicules	Cellules Sertoli Cellules Leydig
Ovaires	Cellules granuleuses
Utérus	Cellules myométriales
Oviducte	Cellules épithéliales, Cellules musculaires lisses
Glande mammaire	Cellules épithéliales
Poumon	Cellules épithéliales alvéolaires
Trachée	Cellules musculaires lisses
Os	Ostéoblastes, Ostéoclastes, Ostéocytes
Cartilage	Chondrocytes
Rein	Cellules vasculaires, cellules glomérulaires
Vessie	Cellules musculaires lisses Cellules interstitielles suburothéliales
Rétine	Cellules gliales rétinales
Thymus	Cellules épithéliales thymiques
Moelle osseuse	Cellules stromales
Ganglions lymphatiques	Cellules dendritiques folliculaires
Rate	Cellules dendritiques folliculaires
Amygdales	Cellules épithéliales des amygdales

En effet, les connexines sont des substrats pour les protéines kinases ; un grand nombre de signaux (autocrine, facteurs de croissance, hormones et neurotransmetteurs) régulent le niveau de communication intercellulaire en contrôlant indirectement leur niveau de phosphorylation (Laird, 2006 ; Moreno, 2005 ; Trosko et al., 1998 ; Phipps et al., 1997).

Dans des conditions physiologiques, la perméabilité des canaux jonctionnels est modulée par le  $\text{Ca}^{++}$  libre intracellulaire, le pH du cytoplasme (Eckert, 2002), de très nombreuses hormones (Fulda, 2007 ; Harris, 2007 ; Meşe et al., 2007 ; Stagg et Fletcher, 1990 ; Meda et al., 1984), des neuromédiateurs, des facteurs de croissance, des métabolites de l'acide arachinoïque, les protéine-kinases A et C (Conklin et al., 2007 ; Stagg et Fletcher, 1990 ; Kanno, 1985 ; Loewentein, 1985), des phosphatases, des oncogènes et enfin certains morphogènes (Poggi et Zocchi, 2006). Ainsi, la régulation des connexines est multifactorielle et diffère selon le type de connexine, le phénotype cellulaire, le stage du cycle cellulaire, l'état d'immortalisation ou de transformation, l'environnement tridimensionnel, les divers facteurs de croissance et l'interaction avec la matrice extracellulaire (Chanson et al., 2007 ; Lampe et al., 2000) et leur cycle métabolique sont rigoureusement régulés et sujets à de rapides remodelages selon les conditions physiologiques. Tout processus, de la transcription à l'ouverture/fermeture des canaux, dépend de la phosphorylation de différents sites sur l'extrémité carboxy-terminale de la connexine (Moreno et Lau, 2007 ; Lampe et Lau, 2000). C'est donc grâce à cette modification post-transcriptionnelle, engendrant un changement de configuration de la molécule, qui permet aux 6 sous-unités une fois assemblées en connexones, d'ouvrir ou de fermer le canal (Moreno et Lau, 2007 ; Lampe et Lau, 2000).

#### **1.3.9.1 La phosphorylation de la Cx43**

Dans le cas de la Cx43, l'extrémité de 17 kDa du domaine carboxy-terminal cytoplasmique est extensivement phosphorylée par différentes protéines kinases aux 12 (ou plus) différents sites détenant des motifs de résidus sérine, thréonine et tyrosine (Laird, 2005 ; Solan et Lampe, 2005). Certains sites sont

phosphorylés dès les premières 15 minutes après la synthèse de la Cx43 (Moreno, 2005) dans les cultures cellulaires de fibroblastes démontrant ainsi que ces modifications se produisent avant l'arrivée de la protéines à la membrane plasmique (Hervé et al., 2007; Crow et al., 1990). Les protéines kinases responsables de la phosphorylation comprennent entre autres la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), la pp60src (Lampe et Lau et al., 2004; Lau et al., 2000), les kinases v- et c-src et v-Fps (Lau, 2005; Kurata et Lau, 1994), la caséine kinase 1, (Laird, 2005), la kinase cycline-dépendante (cdc2 kinase, p34<sup>cdc2</sup>), la caséine kinase 1 et la protéine kinase A (PKA) (Figure 3) (Hervé et al., 2007; Laird, 2006).

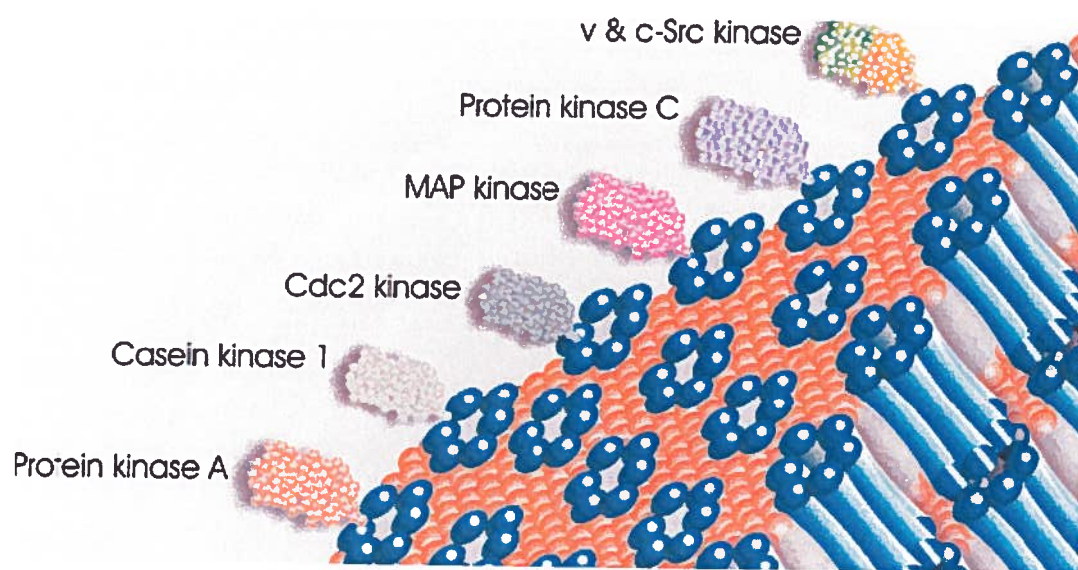
Cependant, à cause des interrelations (« cross-talk ») existant entre les différentes voies de signalisation et du nombre de sites de consensus de phosphorylation dans la partie carboxyl-terminale de la Cx43, il est difficile de déterminer quelle enzyme est responsable de la phosphorylation des connexines. Dans le cadre de ce projet, nous tenterons d'identifier les protéines kinases qui contribuent à l'expression et la fonction de la Cx43 entre autres, la PKA et la PKC, afin d'identifier les voies nécessaires au contrôle du couplage jonctionnel et à la régulation des phénomènes qui lui sont associés (prolifération, différenciation, etc.) dans une lignée de NB qui exprime la Cx43 et dans une lignée transfectée par cette connexine.

### 1.3.9.2 La protéine kinase A, AMPc dépendante

Les kinases et les phosphatases sont associées à la régulation et la coordination de différents aspects métaboliques (Hervé et al., 2007). Ces contrôles se font par la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines effectrices (Koval., 2006). Il existe près de 400 domaines protéiques ayant une activité kinase (Vinken et al., 2006; Hardie et Hanks, 1995). Le séquençage de ces domaines ainsi que des études poussées en cristallographie ont démontré que les sites catalytiques possèdent des structures similaires; la seule différence remarquable est une subtile variabilité du site de reconnaissance du substrat



**Figure 3 – Les protéines kinases responsables de la phosphorylation de la connexine 43.**



donnant ainsi la spécificité de chaque enzyme (Gold et al., 2006; Lau, 2005; Johnson et al., 1996).

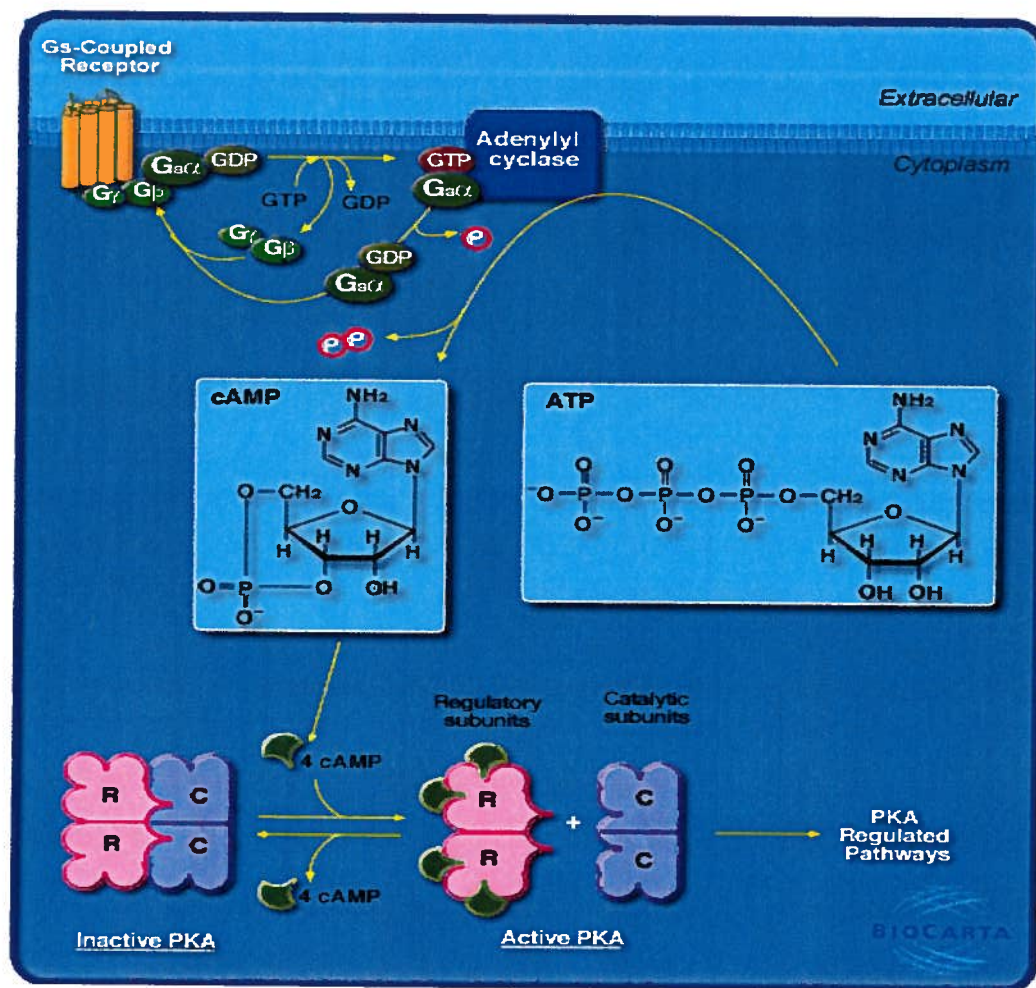
La phosphorylation par les kinases est probablement la voie métabolique la plus étudiée. En 1960, Sutherland a reçu le prix Nobel de médecine pour ses études concernant la transmission d'un signal hormonal : noradrénaline sur la glycolyse dans les cellules hépatiques (Sutherland et Robison, 1996). L'identification de la glycogène phosphorylase kinase kinase, nommée plus tard protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et son activation par l'AMPc, a mené à deux principes fondamentaux soit, le système des cascades des kinases et le concept du messenger secondaire (Solan et Lampe, 2005 ; Shah et al., 2002).

La PKA est composée de deux sous unités, une sous unité régulatrice (R) et une sous unité catalytique (C) associées en un holoenzyme inactif. En l'absence d'AMPc, l'enzyme existe sous forme d'un holoenzyme tétramérique inactif (Reddy, 2005).

Dépendamment du type cellulaire, l'AMPc est générée par l'activation de l'adénylate cyclase qui répond à plusieurs stimuli (Figure 4) (Taylor et al., 2005 ; Skalhogg et al., 1997). L'association de l'AMPc avec la sous unité R du complexe enzymatique, engendre une diminution de l'affinité des sous unités R pour les sous unités C, et induit un changement de conformation qui provoque la dissociation du tétramère en dimères de sous unités régulatrices et de sous unités catalytiques actives (Ouyang et al., 2005 ; Schwartz, 2001). Les sous unités catalytiques ont plusieurs substrats connus. Leurs cibles varient suivant le type cellulaire et plus précisément la nature des protéines exprimées dans ces cellules (Urschel et al., 2006 ; Marunaka et al., 2003). La sous unité catalytique de la PKA permet alors la phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmiques comme la glycogène synthase, la pyruvate kinase, la phosphofructokinase II, l'inhibiteur I de la protéine phosphatase et toutes les protéines du foie qui contribuent à l'immobilisation du glycogène (Robinson-White et Stratakis, 2002; Brushia et Walsh, 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

**Figure 4 – Activation de la PKA via l'AMPc (Biocarta)**

La PKA est une enzyme intracellulaire qui a un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire ; elle comprend des sous-unités catalytiques (C) (violet) et des sous-unités régulatrices (R) (rose). Dépendamment du type cellulaire, l'AMPc est générée par l'activation de l'adénylate cyclase qui répond à plusieurs stimuli. L'association de l'AMPc avec la sous unité R du complexe enzymatique, engendre une diminution de l'affinité des sous unités R pour les sous unités C, et induit un changement de conformation qui provoque la dissociation du tétramère en dimères de sous unités régulatrices et de sous unités catalytiques actives.



(Urschel et al., 2006 ; Ouyang et al., 2005 ; Reddy, 2005 ; Taylor et al., 2005 ; Skalhogg et al., 1997).

CREB (*cAMP-regulated enhancer binding protein*) qui se lie à l'élément régulateur de l'AMPc (CRE) (*cAMP responsive element*). CREB recrute alors une histone-acétyl-transférase et la transcription des gènes dont le promoteur contient un ou des CRE est ainsi activée. (Marunaka et al., 2003 ; Syin et al., 2001).

### 1.3.9.3 La protéine kinase C

Il existe 12 isoformes constituant la famille des protéine kinase C. Elles sont impliquées dans de nombreux processus de signalisation, de prolifération, de différenciation, de transport, d'expression génique, d'organisation cytosquelette et elle joue donc un rôle dans diverses pathologies (Kheifets et Mochly-Rosen, 2007; Carter 2000). La protéine kinase C est une sérine thréonine kinase, ce qui signifie qu'elle est capable de phosphoryler d'autres protéines sur les fonctions alcools de ses résidus acides aminés, lorsqu'ils sont compris dans une séquence dite consensus. Elle est considérée comme un médiateur classique de nombreux agonistes extracellulaires qui produisent divers seconds messagers lipidiques (Redig et Platanias, 2007; Kishimoto al., 1980). Elle est de ce fait une cible thérapeutique intéressante dans le cas de cancers, de syndromes inflammatoires, de désordres du système immunitaire ou du système nerveux central ou de dysfonctionnements cardiovasculaires (Podar et al., 2007; Toker, 1998).

La famille des protéines kinases C est hétérogène et regroupe les kinases phospholipides dépendantes. Les différentes isoformes sont constituées d'une seule chaîne protéique composée de régions conservées (C1 à C4) et de régions variables (V1 à V5) (Redig et Platanias, 2007). Chaque protéine est constituée de deux domaines. Le premier a une fonction de régulation ; il est situé du côté N-terminal avec une masse moléculaire allant de 20 à 40 kDa environ et réagit à différents activateurs en fonction de l'isoforme concernée (Mackay et Twelves, 2007). Le deuxième est le domaine catalytique situé du côté C-terminal avec une masse moléculaire proche de 45 kDa (Gold et al., 2006). C'est à ce niveau que vient se fixer le nucléotide donneur de phosphate qu'est l'ATP et le substrat qui est une protéine acceptrice de phosphate. Ils sont reliés entre eux par la région V3

qui sert de charnière et qui peut subir une protéolyse sous l'action de la calpaïne (Redig et Plataniias, 2007; Newton, 1997; Azzi et al., 1992). L'enzyme clivée est fonctionnelle, dérégulée et souvent oncogène (Phipps et al., 1997)

Il existe douze isoformes de la PKC (entre autre  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$  et  $\tau$ ); la plupart des cellules expriment plus d'un membre de la famille des PKC (Kato et al., 2005; Carter, 2000). Ceci explique ainsi qu'il existe divers mécanismes de contrôle pour un large spectre de réponses physiologiques. Les isoformes de la PKC, qui seront détaillées plus loin, sont regroupées en trois catégories : classique ou conventionnelle (cPKC :  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ), nouvelle (nPKC :  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ) et atypique (aPKC :  $\zeta$ ,  $\tau$ ) (Redig et Plataniias, 2007; Nishizuka, 1995). Ces isoformes se différencient par leur expression tissulaire, leur localisation et les facteurs capables de les activer.

#### **1.4 L'implication possible des jonctions lacunaires dans les neuroblastomes**

La majorité des cancers présentent une altération des jonctions lacunaires qui assurent la répartition dans un tissu des petites molécules, en particulier les messagers secondaires, co-facteurs et modulateurs des protéines kinases (Sosinsky et al., 2007; Solan et Lampe, 2005). Ainsi, les deux seules caractéristiques communes à tous les cancers sont l'absence de contrôle de la prolifération et l'absence de communications intercellulaires résultant de l'altération des canaux jonctionnels et des Cxs (Laird, 2006; Evans et Martin, 2002; Laird et al., 1999; Yamasaki et al., 1999). Comme dans les autres cancers, les jonctions lacunaires des neuroblastomes humains, des tumeurs du système nerveux périphérique, ne sont pas fonctionnelles bien que la Cx43, la protéine qui forme les jonctions lacunaires, y soit exprimée (Defamie et al., 2001; Martin et al., 2001; Yamasaki et al., 1999). En effet, la Cx43 se trouve localisée de manière anormale autour du noyau au lieu de se trouver sur la membrane plasmique (Arnold et al., 2005). Dans les lignées cellulaires humaines de neuroblastomes, les IMR32, la restauration d'un phénotype normal passe par la restauration de la fonction des canaux jonctionnels, eux-mêmes tributaires de l'expression et de la

phosphorylation de la Cx43 (Hervé et al., 2007; Moreno, 2005). Il a été préalablement démontré que le traitement des cellules avec une forme perméable de AMPc augmentait la synthèse des Cx et leur transfert à la membrane plasmique (Arnold et al., 2005). Néanmoins, les canaux ainsi formés n'étaient pas fonctionnels. Dans ce cas précis, la restauration de la fonctionnalité nécessite une seconde étape : l'inhibition spécifique de la PKC alpha (Arnold et al., 2005).

Les cellules de neuroblastome de souris (Neuro2A) n'expriment pas de connexine de façon endogène (Jordan et al., 1999 ; Moory et al., 2001) et sont déficientes en communication intercellulaire. Toutefois, ces cellules sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des transfectants stables exprimant diverses connexines (Gemel et al., 2006 ; Laird, 2006 ; Tanmahasamut et al., 2005 ; Zhong et al., 2003, Statuto et al., 1997; Zhu et al., 1991; Eghbali et al., 1990). Les articles récents mentionnent que la transfection est réalisée sur des cellules différenciées de Neuro2A (Delaune et al., 2007 ; Mao et al., 2007; Miloso et al., 2004 ; Carystinos et al., 2001 ; Mao et al., 2000). Néanmoins, nous avons concentré nos travaux sur la transfection des cellules non différenciées afin d'obtenir et étudier des transfectants stables dans le but d'identifier les processus responsables de l'altération des connexines et des jonctions lacunaires dans les cellules malignes.

L'objectif du projet a été de transfecter les cellules de Neuro2A avec un vecteur contenant la connexine 43 fusionnée ou non avec GFP afin d'élucider les voies métaboliques impliquées dans le déficit d'expression de la Cx43 ainsi que l'altération et la formation et la fonction des jonctions lacunaires. Les propriétés fluorescentes de la protéine fluorescent en vert (GFP) sont très utiles pour l'étude des mécanismes de transport intracellulaires, de l'assemblage et de la sécrétion de la protéine, autant intégrale que soluble, et du transfert à la membrane (Chanson et al., 2007; Jordan et al., 1999). La plupart des protéines fusionnées à la GFP maintiennent leur propriété native concernant leur transport et leur ciblage aux bonnes organelles (Falk, 2001; Laird et al., 2001 ; Jordan et al., 1999). Des études préalables par micro-injection ont démontré que la protéine de fusion n'inhibe pas



la communication intercellulaire et peut promouvoir des jonctions lacunaires fonctionnelles (Evans et Martin, 2002 ; Laird et al., 2001 ; Jordan et al., 1999). Ainsi, puisque la Cx43-GFP possède des caractéristiques de la Cx43 de type sauvage (Falk, 2001; Laird et al., 2001 ; Jordan et al., 1999), il a été possible d'examiner les mécanismes de transport des connexines de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique; la mobilité des jonctions lacunaires sur la membrane plasmique et leur départ de la surface cellulaire dans les cellules vivantes (Martin et Evans, 2004).

Il nous a paru intéressant de voir si les résultats obtenus chez la lignée cellulaire humaine (IMR32) ressemblent à ceux obtenus chez la lignée de souris (N2A) et si, potentiellement, la différence proviendrait d'un changement dans les voies métaboliques associées à l'expression, la sous-localisation et la fonction des Cx et jonctions lacunaires ou si les différences observées proviennent de différences dans la localisation du gène transfecté. Cette étude pourrait nous permettre par la suite de rétablir, chez les neuroblastomes de souris, les jonctions lacunaires en utilisant une approche pharmacologique par inhibition des voies métaboliques principales, dans les cellules transfectées.

## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2.1 Culture cellulaire

### 2.1.1 Lignées cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires sont utilisées tout au long de ce projet :

- 1) Lignée cellulaire de glioblastoma de souris : C6 (ATCC # CCL-107;
- 2) Lignée cellulaire de neuroblastome humain : IMR32 (ATCC # CCL-127) et
- 3) Lignée cellulaire de neuroblastome de souris : Neuro2A obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC # CCL-131).

Les lignées cellulaires de N2A, développées dans notre laboratoire, sont transfectées avec : a) un vecteur contenant la Cx43 fusionnée avec la GFP (« green fluorescent protein ») : Cx43W-GFP ; b) un vecteur contenant la Cx43 fusionnée sans GFP exprimée : Cx43Wstop ; c) un vecteur contenant la région C-terminale de la Cx43 fusionnée avec GFP : Cx43CT et d) un vecteur contenant la Cx43 fusionnée avec la séquence inversée de GFP : Anti-Sens (AS)

### 2.1.2 Culture cellulaire

Les cellules IMR32 et les cellules C6 sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen-Gibco BRL Life Technologies, Rockville, Maryland) contenant 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS), 1 % de pénicilline-streptomycine, 1% de L-glutamine, 1 % de nucléosides (adénosine 0,8 g/L; cytidine 0,73 g/L; guanidine 0,85 g/L; thymidine 0,24 g/L; uridine 0,73 g/L de Sigma), 1 % de pyruvate de sodium, 1 % d'acides aminés non essentiels, 0,04% de gentamicine et 3,7 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  (ces produits proviennent tous de Wysent, St-Bruno, Québec).

Les cellules Neuro2A (ainsi que tous les clones transfectés mentionnés ci-dessus) sont cultivées dans du Modified Eagle's Medium (MEM) contenant 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS , Invitrogen-Gibco BRL Life Technologies), 1 % de pénicilline-streptomycine, 1% de L-glutamine, 1 % de nucléosides (adénosine 0,8 g/L; cytidine 0,73 g/L; guanidine 0,85 g/L; thymidine 0,24 g/L; uridine 0,73 g/L de Sigma, Oakville, Ontario), 1 % de pyruvate de sodium, 1 % d'acides aminés non essentiels, 0,04% de gentamicine et 2,2 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  (Wysent).

Les cellules sont maintenues à 37°C dans des flasques T75 (Falcon) dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Le passage cellulaire se fait à tous les 48 à 72 heures lorsque les cellules atteignent une confluence de 85-90%. À ce moment là, le milieu est enlevé, les cellules sont lavées avec un tampon phosphate salin sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (PBS ; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2 – Sigma) et incubées 1 minute à 37°C en présence de 0,5 mL d'une solution de 0,15% de trypsine 0,25% p/v-EDTA 5mM (HyClone, Logan, Utah). La réaction de trypsinisation est arrêtée par l'addition d'un volume équivalent de milieu complet. Les cellules sont ensuite récupérées, à 4°C, dans un tube conique par centrifugation à 1 000 g pendant 5 minutes (Baxter Megafuge 1,0 R, Henaues Instruments). Le culot est resuspendu dans du milieu frais et les cellules comptées avec un hémacytomètre sous un microscope optique par la méthode d'exclusion du Trypan Bleu puis ré-ensemencées à raison de 2x10<sup>4</sup> et/ou 1x10<sup>5</sup> cellules dans des plaques de six puits, des boîtes de Petri de 100 mm ou dans des flasques T75.

### 2.1.3 Traitement cellulaire par les médiateurs

Les cellules IMR32 ou N2A sont traitées avec du 1 mM de 8-Br-AMPC (Sigma), 2,5 mM de Bisindolylmaléimide (BIS) (Sigma), 2,5 mM de Go6979 (Go) (Sigma) ou 10 µM de Gli005 (Gli) et trypsinisées à chaque 24 heures. Les traitements ci-dessus se sont effectués pour une période allant jusqu'à 72 heures.

### 2.1.4 Prolifération cellulaire

Les cellules sont trypsinisées et resuspendues dans du a) DMEM ou b) MEM à 0 % FBS et 0,5 % DiI (un ligand de membrane carbocyanine, Molecular Probes, Burlington, Ontario) pendant 20 minutes dans la noirceur à la température de la pièce. Après 3 lavages consécutifs au PBS, elles sont ensemencées dans des plats de Petri de 10 cm (Sarstedt) à 7,5x10<sup>5</sup> dans a) DMEM or b) MEM contenant 10 % FBS. Les cellules non traitées (CT) ou traitées (voir section 2.1.3 ci-haut), sont remises en suspension après trypsinisation dans du a) DMEM ou b) MEM

ayant 0 % FBS et quantifiées par cytométrie de flux (FACS) avec un cytomètre de flux Beckman Coulter Cytomics FC 500. Finalement, les résultats sont analysés en utilisant le programme ModFit (Verity Software Inc.) pour déterminer l'index de prolifération des cellules tel que décrit par Arnold et al., 2005.

### 2.1.5 Différenciation cellulaire

Les cellules IMR32 sont traitées avec 1 mM 8-Br-AMPC, un analogue perméable de l'AMPC, pendant 48 heures afin d'initier la différenciation cellulaire.

Les cellules N2A transfectées, sont traitées avec un mélange de 1 mM 8-Br-AMPC pendant 48 heures, ce dernier maintenu jusqu'à la fixation pour l'immunocytochimie (voir section 2,4 ci-bas). Les conditions d'induction de la différenciation sont différentes dans les deux lignées puisque les cellules IMR32 sont traitées avec un mélange de 1 mM 8-Br-AMPC pendant 48 heures jusqu'à fixation cellulaire.

## 2.2 Transfection cellulaire et clonage

### 2.2.1 Amorces Gateway® contre la Cx43

Afin d'utiliser la technologie recombinante de clonage Gateway®, des amorces spécifiques sont conçues contenant un site attB1 et obtenues par le service de synthèse Invitrogen (Grand Island, New York). La technologie de clonage Gateway® est basée sur un bactériophage lambda de recombinaison à site-spécifique. La recombinaison d'ADN se produit entre les sites spécifiques d'attachement (att) (Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20). Ainsi, les amorces sont conçues afin d'inclure des sites d'attachement attB et faciliter le transfert et l'insertion dans un vecteur donneur contenant aussi les sites att, attP.

Les séquences des amorces sont les suivantes :

- 1) - Cx43WT+GFP sens : 5'-ATG GGT GAC TGG AGT GCC TT-3' et  
Cx43WT+GFP anti-sens : 5'-CGG TTC AAA TCT CCA GGT CA-3' ;

- 2) - Cx43 sans GFP sens: 5'-ATG GGT GAC TGG AGT GCC TT-3' et  
Cx43 sans GFP anti-sens: 5'-CGG TTT AAA TCT CCA AGG TCA-3' ;
- 3) - Cx43CTerminal sens : 5'-TTC ATG CTG GTG GTG TCC TT-3'et  
Cx43CTerminal anti-sens : 5'-TTA AAT CTC CAG GTC ATC AG-3'.

### **2.2.2 Traitement à l'ADNase et précipitation par l'éthanol**

Une quantité de 4 µg d'ARN est suspendue dans une solution d'ADNase 1X avec 2 U ADNase (Invitrogen), dans un tampon TE, pour un volume total de 20 µL et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Un volume de 50 µL de phénol chloroforme a été ajouté, puis soumis à Vortex et centrifugé à 10 000 g pendant 5 minutes. La couche supérieure est transférée dans un nouveau tube. Un volume de 5 µL de la solution d'acétate de sodium à 3M et 200 µL d'éthanol 100% sont ajoutés aux échantillons. Cette étape est suivie d'une incubation de 30 minutes à -70°C et d'une centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes. Par la suite, le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 75%, centrifugé à 14 000 g pendant 30 minutes et séché par aspiration. L'ARN est redissout dans un volume approprié d'eau distillée stérile.

### **2.2.3 PCR – Réaction de la polymérase en chaîne**

Lors de nos expériences, nous avons optimisé les conditions expérimentales suivante : La réaction de la polymérase en chaîne (PCR) s'est déroulée par des cycles successifs (35 cycles) de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes. L'étape d'appariement s'est faite à 62,5°C pendant 1 minute et celle d'extension d'amorce à 72°C pendant 1 minute. L'extension finale s'est déroulée à 72°C pendant 7 minutes. Ainsi, une quantité de 3 µL du produit-RT est ajouté à 3 µL d'amorce-sense, à 3 µL d'amorce-anti-sense, à 1,5 µL dNTPs, à 33 µL ddH<sub>2</sub>O, à 5 µL du tampon de PCR (10X) et à 1,5 µL de la Taq polymérase. L'analyse est réalisée par migration des échantillons sur un gel d'agarose.

#### 2.2.4 Synthèse du premier brin pour la RT

Basé sur le protocole de New England BioLabs (Etats-Unis, Massachusetts), 4 µL d'ARN total sont mis en présence de 2 µL PdN<sub>6</sub> et de 4 µL dNTPs. Le volume total est amené à 16 µL avec de l'eau distillée stérile. Par la suite, le tout est chauffé à 70°C pendant 5 min, centrifugé et placé sur glace. Un volume de 2 µL du Tampon RT (inclus dans le kit du manufacturier, New England BioLabs – # E5100S (10X) est ajouté avec 1 µL d'inhibiteur de ARNase et 1 µL de Transcriptase Réverse. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 42°C et finalement, afin d'inactiver les enzymes, la solution est réchauffée à 95°C pendant 5 minutes.

#### 2.2.5 Réaction de la transcriptase reverse

Une quantité de 4 µg d'ARN sont traités à l'ARNase et incubés avec les quatres nucléotides (dNTPs) à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite brièvement centrifugés et placés immédiatement sur glace. Après l'ajout de la solution RT (1X) et d'un µL d'inhibiteur d'ARNase, les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à 42°C. Pour la réaction de synthèse de l'ADNc, les échantillons sont incubés à 50°C pendant 50 minutes et finalement à 85°C pendant 5 minutes.

#### 2.2.6 Vecteurs plasmidiques

Le vecteur plasmidique TOPO (Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20) est linéarisé avec un seul 3' thymidine (T) surplombant pour le système « TA Cloning® ». La Taq polymérase possède une activité transférase non-matrice dépendante qui ajoute un seul désoxyadenosine (A) à l'extrémité 3' du produit PCR. Le vecteur linéarisé fourni dans le kit possède donc un résidu thymidine (T) surplombant au 3' permettant au produit PCR de se lier efficacement à ce dernier. La recombinaison a été facilitée par la réaction LR selon les explications fournies par le manufacturier ((Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20) et les cellules compétentes d'E. Coli TOP10 ont été transformées.

### **2.2.7 Préparation des milieux LB sur les plaques d'agar**

Pour atteindre un volume total de 1L, il faut dissoudre 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl dans environ 950 mL d'eau déionisée. La solution est ensuite ajustée à pH de 7,0 et complétée à 1 litre avant autoclavage pendant 20 minutes. Par la suite, avant de déposer l'agar dans les plaques de Petri, l'antibiotique (50-100 µg/mL d'ampicilline (Sigma - # A1953) est ajouté.

### **2.2.8 Préparation et sélection des colonies**

Une quantité de 50 µL de la solution TOPO Cloning Reaction Solution, tel que décrit dans les explications fournies par le manufacturier (Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20), a été étalée sur les plaques d'agar contenant l'antibiotique. Le tout a été incubé pendant 24 heures à 37°C.

Nous avons sélectionné 10 colonies sur les plaques d'agar et les avons propagées dans la solution LB ((Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20) contenant 100 µg/ml spectinomycine fourni par le fournisseur selon les directives ((Invitrogen, CR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit – # K2500-20).

Les plasmides ont été isolés (2.2.7 ci-bas) et l'insertion du vecteur ayant la bonne direction ont été vérifiés par digestion d'enzyme de restriction avec NheI (voir section 2.2.10 ci-bas)

### **2.2.9 Isolement des plasmides**

Les plasmides sont isolés en utilisant le kit Genelute Plasmid Mini-Prep (Sigma - # PLN10) selon les recommandations du manufacturier. Les cellules sont ensuite centrifugées à 12 000 g pendant 1 minutes, resuspendues dans 200 µL de la solution de resuspension, lysées par addition de 200 µL de la solution de lyse et agitées doucement pendant 5 minutes. Nous avons suivi à la lettre le protocole suggéré par le manufacturier de ce kit (Sigma)

### **2.2.10 Digestion Enzymatique et enzyme de restriction**

Pour la digestion aux sites spécifiques de restriction, 3 µL d'ADN est incubé dans une dilution à 1X de la solution appropriée selon l'enzyme utilisée



(voir ci-dessous) et 2U d'enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA). La digestion (Tableau 5) s'est déroulée à 37°C pendant 1 heure. Les fragments de restriction sont analysés par séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour Cx43W+GFP, les bonnes longueurs de fragments recherchées après digestion avec Nhe I sont de 7016 pb (Cx43W+GFP : NheI<sub>2898</sub> – NheI<sub>2604</sub>) et de 294 pb Cx43W+GFP : NheI<sub>2604</sub>– NheI<sub>2898</sub>). Pour Cx43Wstop, les bonnes longueurs de fragments recherchées après digestion avec Nhe I sont de 6383 pb (CTGFP-Cx43Wstop: NheI<sub>2261</sub> – NheI<sub>1971</sub>) et de 294 pb Cx43Wstop: NheI<sub>1971</sub>– NheI<sub>2261</sub>).

### 2.2.11 Extraction sur gel

Les bandes d'intérêts séparées par électrophorèse sur gel d'agarose sont excisées et purifiées grâce à un kit d'extraction QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN (# 27104 -Mississauga, Canada) en suivant les directives du fabricant. Les bandes excisées sont pesées pour y ajouter ensuite 3X leur volume en Tampon QG (composition selon le kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » du fabricant) et chauffées à 50°C pendant 10 minutes pour les faire fondre. Un volume identique d'isopropanol y a été ajouté. L'échantillon est passé à travers une colonne « QIAquick spin » (composition selon le kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » du fabricant) par centrifugation à 13 000 g pendant 1 minute. 500 µL du Tampon QG a aussi passé à travers la colonne par centrifugation. La colonne est lavée avec 750 µL du Tampon PE (composition selon le kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » du fabricant), et centrifugée à 10 000 g après 2-5 minutes.

### 2.2.12 Transfection dans les N2A et caractérisation des clones

La lignée de neuroblastome de souris, les Neuro2A (N2A), ayant aucune expression endogène de la connexine 43 ont été choisies pour la transfection à la

**Tableau 5 – Diverses enzymes et leur site de restriction respectif**

Enzyme	Site de Restriction	Tampon
ApaI I	GGGCC▼C	Tampon 4 + BSA
BamH I	G▼GATCC	Tampon BamHI + BSA
Bgl I	GCCNNNN▼NGGC	Tampon 3
Bgl II	A▼GATCT	Tampon 3
Fsp I	TGC▼GCA	Tampon 4 + BSA
Hind III	A▼AGCTT	Tampon 2
Nco I	C▼CATGG	Tampon 4
Nhe I	G▼CTAGC	Tampon 2 + BSA
Pvu II	CAG▼CTG	Tampon 2
Sca I	AGT▼ACT	Tampon 3

**Composants des tampons1X :** Tampon 1 BamHI (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol), Tampon 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol), Tampon 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol), Tampon 4 (50 mM d'acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM d'acétate de magnésium, 1 mM Dithiothreitol).

lipofectamine (Invitrogen - # 18324-012). La tolérance à l'antibiotique G418 (Sigma - # G1868) a été déterminée. Une concentration de maintien a été maintenue à 200 µg/ml G418.

Suite à la transfection des clones de Neuro2A avec les vecteurs contenant la connexine 43, les cellules ont été sélectionnées avec G418. Dix clones ont été choisis et propagés pour les analyses suivantes : des expériences d'immunobuvardage de type Western ont été utilisées pour quantifier l'expression de la connexine 43. Les clones exprimant un haut niveau d'expression de la protéine ont été sélectionnés pour la suite des expériences. Les images en immunocytochimie des clones ont démontré aussi la sous-localisation de la connexine. De plus, nous avons basé notre sélection sur la morphologie des clones.

### 2.3 Extraction protéique

Une quantité de  $1 \times 10^6$  cellules a étéensemencées 24 heures avant l'expérience dans des plaques de Petri de 100 mm contenant soit du a) DMEM ou du b) MEM, dépendant de la lignée cellulaire étudiée. Après 48 heures, les cellules sont traitées avec du milieu frais contenant l'inhibiteur choisi, aux concentrations détaillées dans le paragraphe 2.1.3 ci-haut. Après une période d'exposition de 48 heures à ces composés, les cellules sont lavées avec du PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . Les cellules sont ensuite lysées avec 0,5 mL de tampon RIPA (PBS, 1% NP40, 0,5% de déoxycholate de sodium, 0,1% SDS, pH 7,2) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (0,57 mM Phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1mM d'aprotinine, 1mM de leupeptine, 1mM d'orthovanadate de sodium) et déposées sur glace pendant 5 minutes. À l'aide d'une mini-spatule caoutchoutée les cellules sont ensuite transférées dans un tube Eppendorf. Les cellules lysées sont passées une dizaine de fois à travers une seringue 26G (Becton Dickinson) puis laissées sur glace pendant 30 minutes. Les cellules extraites sont centrifugées à 14 000 g pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. La quantité totale de protéines cellulaires est quantifiée en utilisant

la méthode de Bradford (Sapan et al., 1990) (BioRad Laboratories, California, Etats-Unis - # 500-0007) avant les analyses en immunobuvardage décrite dans la section 2.4 ci-dessous.

## **2.4 Immunobuvardage**

### **2.4.1 Électrophorèse des protéines (SDS-PAGE)**

Un quantité de 30-50 µg de lysats normalisés en concentration protéique, sont portés à ébullition dans le 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) pendant 3 minutes. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Sigma). 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 avec 0,03% (v/v) TEMED et 0,07% (p/v) persulfate d'ammonium. Les échantillons sont chargés sur le gel de compaction (5% de polyacrylamide dans 0,5 M Tris pH 6,8 avec 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 avec 0,2 M glycine et 0,1% (p/v) SDS pendant une période de 60 minutes à 100 mVolts.

### **2.4.2 Électrotransfert**

Après séparation des protéines, les gels de polyacrylamide sont transférés sur une membrane de nitrocellulose en utilisant Trans-Blot (Trans-Blot mini transfert Bio-Rad). Le transfert de protéine est effectué sous un voltage de 100 Volts pendant 60 minutes dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% MeOH) de pH 8,2 selon une méthode classique (Burnette, 1981).

### **2.4.3 Immunodétection**

La membrane de nitrocellulose est incubée à la température ambiante pendant 30 minutes dans une solution de 1% d'albumine bovine dans du TBST (150 mM NaCl , 10 mM Tris-HCl, 0,05% Tween-20 – tous de Sigma). Cette

solution de blocage est ensuite remplacée par la solution d'anticorps primaire diluée dans un tampon TBST et incubée avec la membrane pendant une heure à la température de la pièce. Après 3 lavages de 5 minutes avec du TBST, afin d'enlever l'excès d'anticorps primaire, la membrane est exposée à l'anticorps secondaire anti-IgG conjugué à la phosphatase alcaline, diluée 1 : 5000 dans du TBST, puis incubée à la température ambiante durant 1 heure avec agitation. La membrane a été ensuite lavée 3 fois pendant 5 minutes 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-indolulphosphate) (Sigma) dans 2,0 mL de tampon de réaction (100 mM Tris-HCl pH 9,5 avec 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02% sodium azide) pour la révélation. Après une incubation de 4 à 10 minutes à la température ambiante la réaction est arrêtée par immersion dans une solution d'acide acétique à 5%. L'analyse densitométrique a été réalisée avec le logiciel Image-Pro Plus 3 (Minneapolis, MN). La détection colorimétrique a été quantifiée en utilisant GelPro system (Media Cybernetics).

## 2.5 Immunofluorescence

Un nombre total de  $1 \times 10^4 / 20 \text{ mm}^2$  de cellules sont cultivées dans des plaques de 6 puits de 35 mm de diamètre (Sarstedt) sur des lamelles en verre (Bellco Glass Inc.) dans le milieu approprié a) DMEM ou du b) MEM. Les lamelles ont été préalablement traitées au NaOH 1M pendant 4 heures. Après neutralisation avec une solution de HCl 1N et lavage à l'eau distillées courante pendant 30 minutes, 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 24 heures, le milieu est enlevé et les cellules sont traitées avec du milieu frais contenant un des effecteurs suivant : 1 mM 8-Br-AMPC, 2,5 mM BIS, 2,5 mM Go6976 et 10  $\mu\text{M}$  Gli005 aux concentrations détaillées dans le paragraphe 2.1.3 ci-haut ou 10 mM de Gli-PTD (PharmaGap). Après 48 heures, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées deux fois avec un tampon phosphate salin (PBS contenant du Ca<sup>2+</sup> et du Mg<sup>2+</sup>) et incubées avec 4% de paraformaldéhyde (Sigma) dans du PBS à la température de la pièce pendant

30 minutes. Après deux lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 10 minutes avec une solution de 0,01 % de Triton X-100 (Sigma) dans du PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$ . Les lamelles sont incubées dans une solution de 1 % (p/v) de sérum d'albumine bovin (BSA) (HyClone) également dans du PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  pendant 1 heures à la température de la pièce afin de bloquer les sites non spécifiques. Les cellules sont exposées à une solution d'anticorps primaire, diluée aux concentrations adéquates dans du PBS (Tableau 2), pendant la nuit à 4°C. Après deux lavages, les cellules sont exposées à l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin couplé à un fluorochrome Alexa 488 (SantaCruz, SC-2040) (1: 500) dans du PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  pour la durée d'une heure à 37°C. Après 2 lavages et séchages, les lamelles sont déposées sur une goutte de PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$ . Les images ont été capturées en utilisant les filtres appropriés pour la détection du fluorochrome utilisé, avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics).

## **2.6 Analyse des communications intercellulaires par la technique de chargement par grattage, « Scrape Loading »**

Les cellules sub-confluentes sur lamelles ont été traitées (voir ci-haut) et ensuite lavées deux fois au PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . L'évaluation directe de la perméabilité des jonctions lacunaires de type « gap » a été effectuée à l'aide d'un colorant fluorescent de faible poids moléculaire, le jaune de Lucifer (Sigma) auquel les cellules sont imperméables. Une quantité de 2,5 µg/mL du jaune de Lucifer a été diluée dans du PBS et mis en présence des cellules.

La monocouche confluite de cellules est égratinée par une fine entaille faite avec une aiguille de type 26. Un volume de 50 µL du jaune de Lucifer est ajoutée sur la lamelle suivie de trois minutes d'incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière ambiante. Les cellules lésées se chargent de colorant fluorescent qui ne peut se propager aux cellules avoisinantes qu'à travers les canaux intercellulaires de type « gap ». Après avoir lavé quatre fois au PBS 1X,

**Tableau 6 – Les différents types d'anticorps utilisés, leurs provenances et leurs dilutions pour l'immunofluorescence et l'immunobuvardage**



<b>Nom</b>	<b>Dilutions</b>	<b>Provenance</b>
Anti-Cx43 (H150)	1 : 250	SantaCruz SC-9059
Anti-Cx43 (S255)	1 : 250	SantaCruz SC-12899-R
Anti-Cx43 (S262)	1 : 250	SantaCruz SC-1719-R
Anti-Cx43 (S279/282)	1 : 250	SantaCruz SC-12900
Anti-Cavéoline 1	1 : 250	SantaCruz SC-894
Anti-pERK (N-18)	1 : 250	SantaCruz SC-9479
Anti-ERK 1 (K-23)	1 : 250	SantaCruz SC-94
Anti-NF (H-100)	1 : 250	SantaCruz SC-20112
Anti-NGFR p75 H92	1 : 250	SantaCruz SC-5634
Anti-NGFR p75 H137	1 : 250	SantaCruz SC-8317

les lamelles sont observées au microscope à épifluorescence Olympus muni d'une caméra DAGE-MTI à l'aide du filtre FITC (IMT2-DMG) et analysées avec ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics). Le nombre de rangées dans lesquelles le colorant se propage est proportionnel au degré d'ouverture des canaux jonctionnels.

## **2.7 L'analyse des biopsies**

Les biopsies ont été obtenues de « Children Oncology Group, Children's Hospital à Philadelphia, » Etats-Unis suite à l'approbation du projet auprès du Comité scientifique et du Conseil d'éthiques. Les biopsies ont été immédiatement congelées et conservées à -80°C après prélèvement. Elles ont été ensuite extraites par le milieu RPMI, exactement comme dans les conditions utilisées pour les cultures cellulaires (voir section 2.1 ci-haut) excepté qu'elles ont été broyées à l'homogénéisation (Potter) maintenu dans de la glace sèche. Une quantité 25 µg d'extrait protéique des cellules ces patients est soumis à une électrophorèse dénaturante, transférée sur une membrane de nitrocellulose, révélée par immunobuvardage (section 2.4 ci-haut) avec des anticorps polyclonal de lapin spécifique à la PKCα (Santa Cruz, SC-8393), PKCβI (Santa Cruz, SC-8049), PKCβII (Santa Cruz, SC-210), PKCδ (Santa Cruz, SC937) et un anticorps polyclonal de chèvre reconnaissant la PKCζ. La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans la section 2.4.3 ci haut.

## **2.8 Hoechst**

Par cette méthode, nous pouvons visualiser les noyaux des cellules. Les cellules contrôles ou traitées avec les différents effecteurs sont rincées avec du PBS, et fixées par 4% paraphormaldéhyde dans du PBS pendant 20 minutes. 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 minutes à l'obscurité. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS pendant 5 minutes et

examinées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence et contraste de phase (Microscope à épifluorescence Olympus) équipé du filtre approprié et associé à un programme d'imagerie (Image-Pro-Plus 3).

### **3. ANALYSES DES RÉSULTATS**

Le but de ce projet étant d'étudier les jonctions lacunaires dans deux lignées de neuroblastomes, nous avons commencé par la recherche d'une connexine, la Cx43 déjà identifiée comme la plus exprimée dans les cellules humaines de IMR32 (Arnold et al., 2005), et les cellules de neuroblastome de souris N2A, afin de déterminer l'importance de cette connexine dans la tumorigénicité des cellules de neuroblastomes murins.

Dans des travaux précédents, des extraits de la Cx43 provenant de cellules de mammifères ont été séparés par SDS-PAGE et démontrent plusieurs bandes correspondant aux différentes formes phosphorylées (Arnold et al.; 2005). Une bande, typiquement sous la forme non phosphorylée (NP ~ 42 kDa), migre plus bas sur le gel comparativement aux autres phospho-isoformes les plus communes (P1 et P2, de ~ 44 kDa et ~ 46 kDa respectivement) qui migrent plus lentement (Wong et al., 2007). L'ensemble de ces trois isoformes de Cx43 fait l'objet des travaux décrits dans cette section. Avec une analyse en immunobuvardage, un anticorps reconnaissant la forme non-phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées (P1 et P2) de la Cx43 dans les cellules de C6 (Figure 5 A) et N2A (Figure 5 B) (contrôle positif) a été utilisé pour détecter le niveau d'expression protéiques tout au long de nos expériences.

De plus, nous avons effectué des contrôles négatifs pour toutes nos analyses en immunofluorescence en incubant nos cellules en présence d'anticorps secondaire sans anticorps primaire afin de déterminer la fluorescence intrinsèque. Aucune des images ne démontre de la fluorescence de façon constitutive.

(Nous utiliserons le terme « expression constitutive » tout au long de cette analyse. Cette terminologie est souvent appliquée à l'expression d'une enzyme qui est dérégulée soit par phosphorylation constante due à une kinase mutée soit à une enzyme qui perd sa partie régulatrice tout en gardant une activité catalytique. Toutefois, nous utiliserons ce terme dans un sens différent : expression ou non-expression intrinsèque.)

### **3.1 L'expression endogène de la Cx43 dans les cellules de Neuro2A (N2A)**

L'analyse par immunobuvardage (Figure 5 B) et par immunofluorescence (Figure 5 C et D) de la Cx43 (masse moléculaire ~ 43 kDa) d'un extrait cellulaire des N2A en prolifération démontre que ces cellules ne semblent pas exprimer de connexine de façon endogène (Jordan et al., 1999 ; Moory et al., 2001). Ainsi, la lignée cellulaire de neuroblastome murin, N2A, est déficiente en communication intercellulaire. Ces cellules sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des transfectants stables exprimant diverses connexines à des fins d'étude structurale et fonctionnelle.

### **3.2 Transfection des cellules de N2A**

Le premier objectif de ce projet a été de transfecter et caractériser les aspects biologiques des cellules de N2A transfectées avec des vecteurs contenant la Cx43, la Cx43 fusionnée avec la GFP et la partie C-terminale de la Cx43. Les méthodes classiques de clonage telles que décrites dans la section 2.2 de Matériel et Méthode nous ont permis d'entreprendre cette caractérisation. Nous avons aussi utilisé un clone anti-sense, ayant l'insert du gène de la Cx43 fusionné avec la molécule de GFP, à l'orientation inversée, comme contrôle tout au long de nos expériences. Nous avons obtenu et sélectionné 10 clones contenant chacun de ces quatre vecteurs et analysé l'expression de la Cx43 par immunofluorescence et par immunobuvardage. Le meilleur de ces clones a été utilisé pour la suite de nos expériences.

### **3.3 L'expression et la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de N2A transfectées avec divers vecteurs**

Nous avons analysé la sous-localisation de la Cx43, par immunofluorescence, au sein des cellules de N2A transfectées avec les trois différents vecteurs : fusionné avec GFP (Figure 6 A) (m.m 72,17 kDa), sans GFP (Figure 6 B) (m.m 42,91 kDa) et le C-terminal (Figure 6 C) (m.m 18,76 kDa). Comme déjà mentionné, nous avons aussi étudié, en tant que contrôle pour nos

**Figure 5 – Profil d'expression et sous-localisation de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes N2A de souris.**

**(A) Expression de la Cx43 dans les extraits de cellules gliales C6 transfectées par la Cx43 (contrôle positif) et (B) de cellules de neuroblastome murins N2A**

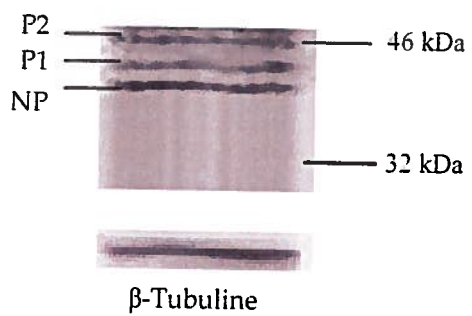
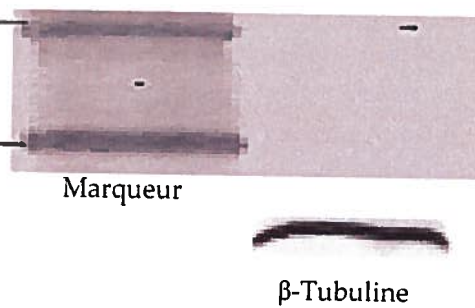
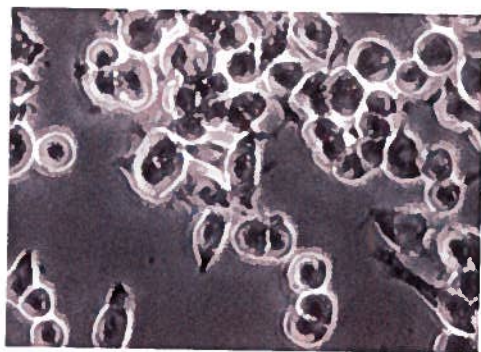
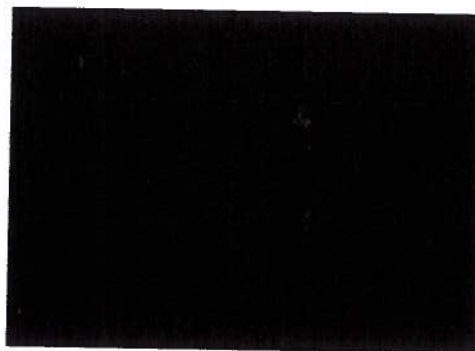
A) Une quantité 30 µg d'extrait protéique C6 (A) est soumise à une électrophorèse dénaturante. Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, révélée par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique à la Cx43 reconnaissant la forme non phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées P1 et P2 indiquées ci-dessus. La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 2.3 et 2.4). La  $\beta$ -Tubulin est un composant des microtubules et représente un « house keeping gene ». Elle a été utilisée comme contrôle positif lors de cette expérience.

B) L'analyse par immunobuvardage de la Cx43 dans les extraits de cellules de neuroblastomes N2A s'est faite en appliquant la même technique décrite dans Matériel et Méthode (section 2.3) sauf que 60 µg de protéine des lysats de N2A ont été chargés au lieu de 30µg.

L'utilisation d'une quantité plus importante (comparativement à la Figure 5 A) de protéines extraites des cellules de N2A (Figure 5 B) ne permet d'observer aucune des 3 formes de la Cx43.

**(C et D) Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A.**

Les cellules N2A sontensemencées à une densité de  $1 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. Après 24 heures, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.5 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI en (C) contraste de phase et en (D) épifluorescence. Grossissement 200x.

**A****B****C****D**



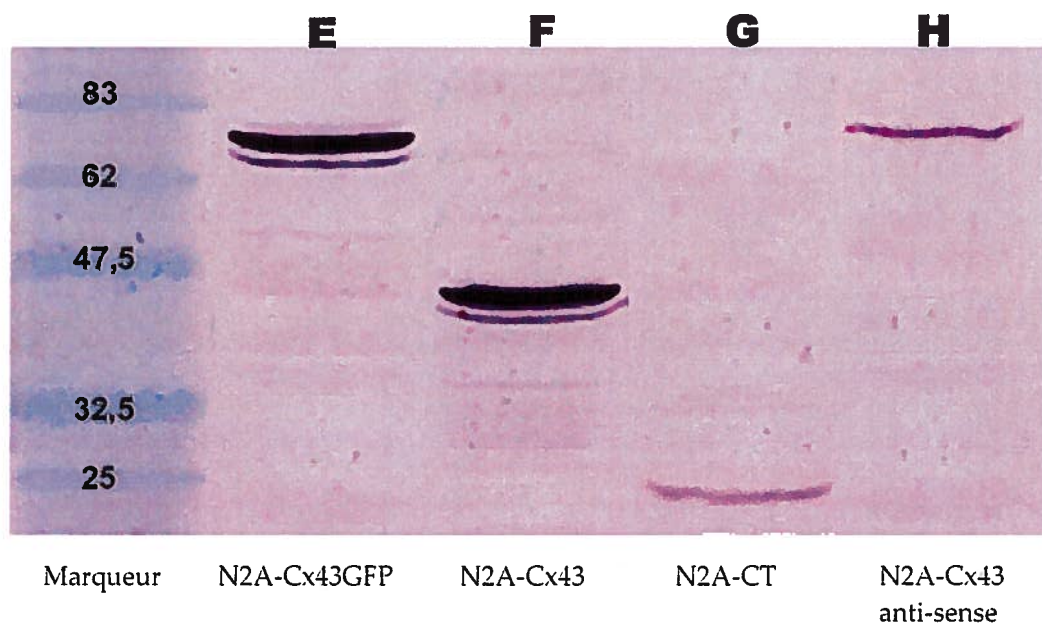
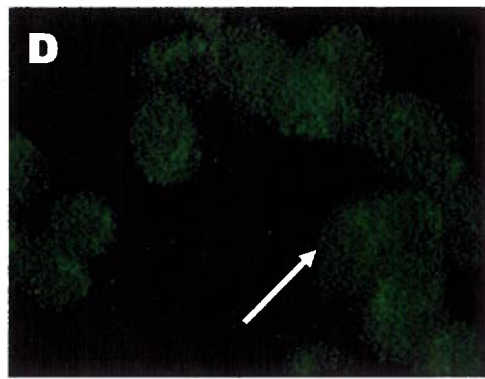
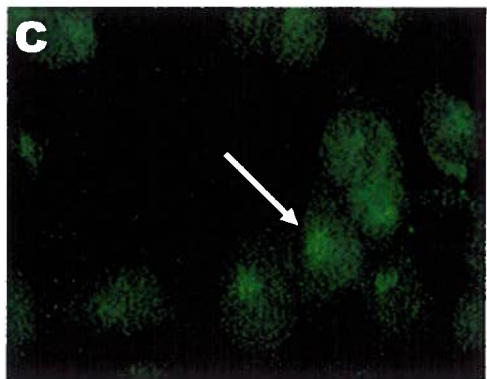
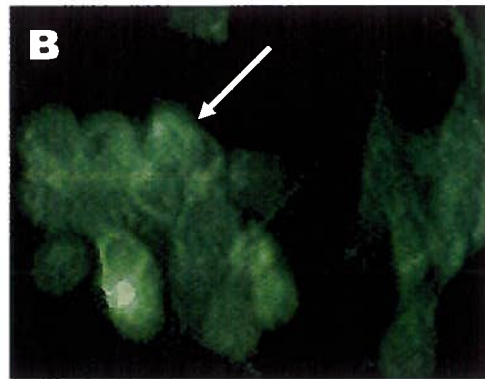
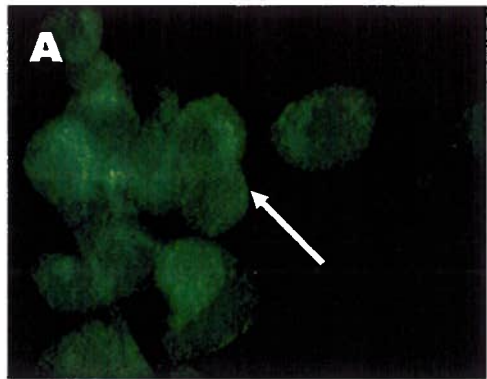
**Figure 6 – Mise en évidence de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A transfectées avec divers vecteurs.**

**Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de (A) la Cx43 fusionnée avec le vecteur de GFP, (B) la Cx43 seul, (C) de la partie C-Terminale de la Cx43 et (D) de l'insert inverse de la Cx43 fusionnée avec le vecteur de GFP – anti sense.**

Les cellules de N2A transfectées sontensemencées à une densité de  $0,5 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. Après 24 heures, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.3 et 2.4 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro.4,5 Software System (Media Cybernetics) en épifluorescence. Grossissement 200x.

**Mise en évidence par immunobuvardage du profil d'expression de (E) la Cx43 fusionnée avec le vecteur de GFP, (F) la Cx43 seul, (G) de la partie C-Terminale de la Cx43 et (H) de l'insert inverse de la Cx43 fusionnée avec le vecteur de GFP – anti sense.**

Une quantité de 30  $\mu\text{g}$  d'extraits protéiques des cellules N2A transfectées est soumise à une électrophorèse dénaturante. Les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose, sont révélés par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique à la Cx43 reconnaissant la forme non phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées P1 et P2. La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrite dans Matériel et Méthode (section 2.4) La  $\beta$ -Tubuline a été utilisée en tant que contrôle lors de cette expérience.



expériences, un clone transfecté avec le vecteur de la Cx43 fusionné à la GFP mais dans le sens inverse (Figure 6 D) (m.m 72,17 kDa).

Nous pouvons remarquer que les clones possédant le gène de la Cx43 dans la bonne orientation (fusionné avec ou sans GFP) (Figure 6 A et B) démontrent une répartition cytoplasmique et périnucléaire. Toutefois, les deux autres images, celles de la partie C-terminale et du gène inversé (Figure 6 C et D) démontrent une distribution pointillée très diffuse à travers la cellule, mais l'expression du gène inversé est plus faible.

Pour les analyses en immunobuvardage, un anticorps reconnaissant la forme non-phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées (P1 et P2) de la Cx43 dans les cellules de N2A a été utilisé pour détecter le niveau d'expression dans les N2A (Figure 6 E à H) dans chaque clone. La Figure 6 E (Cx43 fusionnée à la molécule de GFP : m.m 72,17 kDa) et la Figure 6 F (Cx43 ne possédant pas d'attache protéique : m.m 42,90 kDa) démontre le même patron de phosphorylation, notamment à des masses moléculaires différentes. En effet, la Figure 6 E montre deux bandes aux alentours de 72 kDa représentant les deux isoformes NP et P2. Les deux mêmes formes sont visibles pour la Figure 6 F aux alentours de 43 kDa.

Des études préalables par micro-injection ont démontré que la protéine de fusion n'inhibe pas la communication intercellulaire et peut promouvoir des jonctions lacunaires fonctionnelles. En effet, le vecteur de la Cx43 fusionné ou non avec la GFP détient des propriétés natives concernant le trafic intracellulaire et le ciblage aux organelles spécifiques (Laird et al, 2006 ; Falk 2001; Jordan et al. 1999). Dans notre modèle expérimental, nos résultats en immunocytochimie (Figure 6 A et B) et en immunobuvardage (Figure 6 E et F), à l'aide d'un anticorps contre la Cx43, concordent avec ces observations. Puisque la Cx43-GFP possède les caractéristiques de la Cx43 sauvage, nous avons décidé, à des fins pratiques, d'illustrer uniquement les résultats obtenus avec les N2A transfecté avec le vecteur de la Cx43-GFP pour la suite de notre projet. Ainsi, ce marqueur

de suivi, le GFP, nous permet d'étudier les effets biologiques de la Cx43 au même temps que la sous-localisation de la protéine. Nos critères de sélections étaient basés sur le niveau d'expression protéique et la sous-localisation de la Cx43 au sein de la cellule (Figure 6 A). Dans cette figure, il est aisé de constater que la Cx43 a une sous-localisation diffuse dans le cytoplasme.

La transfection de la partie C-terminale de la Cx43 se justifie du fait que tout processus, de la transcription à l'ouverture du pore, dépend de la phosphorylation de différents sites sur cette extrémité (Hervé et al., 2007 ; Laird, 2005; Solan et Lampe, 2005 ; Moreno, 2005). Nous nous sommes intéressés à l'étude des cellules de N2A n'exprimant que la partie C-terminale de la Cx43 (Figure 6 C et G) (18,76 kDa) afin de pouvoir examiner les mécanismes responsables du cycle de transport des connexines à la membrane plasmique. Ce clone, de 514 paires de bases, ne contient que les acides aminés 211 à 382 de la partie carboxy-terminale de la Cx43. Nous avons remarqué que la distribution de la Cx43 tronquée se trouve de façon pointillée et diffuse (Figure 6 C) à travers la cellule et qu'une seule et faible bande d'une masse moléculaire d'environ 18 kDa est détectable par immunobuvardage de type Western (Figure 6 G).

Curieusement, le clone anti-sense (72,17 kDa) possède le même profil de sous-localisation (Figure 6 D) et d'expression protéique (Figure 6 H) que les clones transfectés avec le vecteur de la partie C-terminale de la connexine (Figure 6 C et G).

### **3.4 Les voies de signalisations impliquées au niveau de la régulation des Cx**

Une fois la caractérisation des clones achevée, nous avons tenté d'élucider les voies métaboliques qui contrôlent le couplage jonctionnel et la régulation des phénomènes qui leur sont associés. L'objectif était d'étudier les voies métaboliques de la PKA et de la PKC, deux régulateurs principaux des voies de signalisation des connexines, et d'évaluer leur implication au niveau de la fonction des connexines ainsi qu'au niveau de la formation des jonctions lacunaires dans les cellules de N2A.

### **3.4.1 L'effet de l'activation de la PKA sur les Cx43 des cellules N2A**

Dans le système nerveux central, le principal effecteur de la voie de traduction de l'AMPc est la protéine kinase activée par l'AMPc (PKA). La régulation de l'activité de la PKA ainsi que son activation spatiale et temporelle sont des paramètres indispensables à la compréhension des mécanismes cellulaires. Elle dépend du messenger secondaire, AMPc, qui circule au travers des canaux jonctionnels. La PKA est importante pour la régulation des jonctions lacunaires (Conklin et al, 2007 ; Solan et Lampe, 2005; Stagg et Fletcher, 1990; Kanno, 1985; Loewenstein, 1985).

#### **3.4.1.1 La sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de N2A**

Grâce à la technique d'immunofluorescence, nous avons analysé la sous-localisation de la Cx43 dans une population cellulaire de N2A. Ces cellules ont un phénotype normal et expriment la Cx43 suite à la transfection (Figure 7 A et B). Nous avons remarqué que l'incubation avec 1 mM de 8-Br-AMPc (Figure 7 C et D), un analogue perméable de l'AMPc, qui mime son action endogène n'engendre aucun effet remarquable au niveau de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules N2A (Figure 7 D). Dans ces deux cas (Figure 7 B et D), la distribution de la Cx43 est difficilement attribuable à un compartiment cellulaire puisqu'elle est répartie partout dans la cellule (Figure 7 B et D). Cependant, après 48 heures de traitement au 8-Br-AMPc, une baisse marquée (environ la moitié après 2 jours) de la prolifération cellulaire est observée (Figure 7 E) et il y a apparition d'un début du processus d'émission de neurites (Figure 7 C).

#### **3.4.1.2 Le profil d'expression de la Cx43 dans les cellules de N2A**

L'analyse par immunobuvardage de la Cx43 d'un extrait cellulaire de N2A en prolifération a démontré que ces cellules expriment la Cx43 sous la forme non-phosphorylée (NP) et la forme phosphorylée P2 (Figure 8 A). D'après ces résultats, même si la forme non-phosphorylée, NP, y est aussi retrouvée, la forme phosphorylée P2 est prédominante (Figure 8 C).

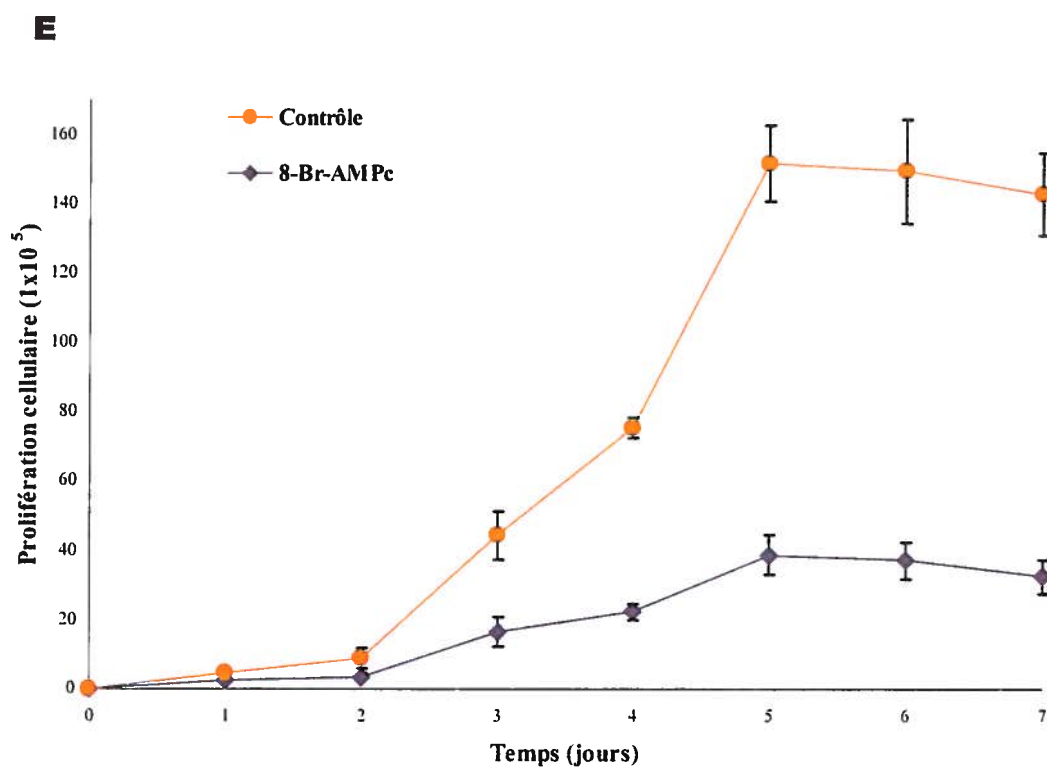
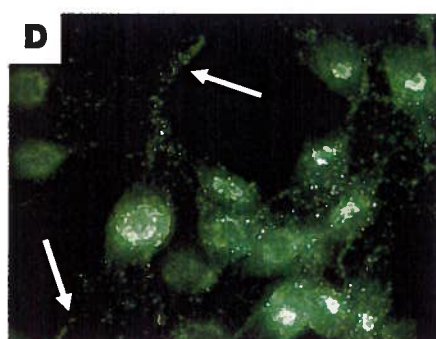
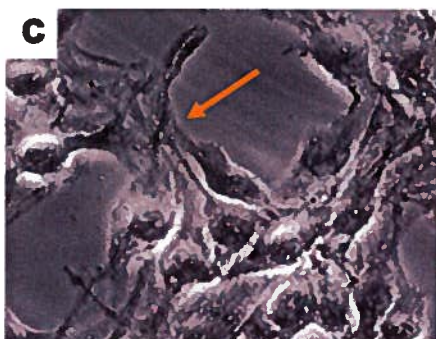
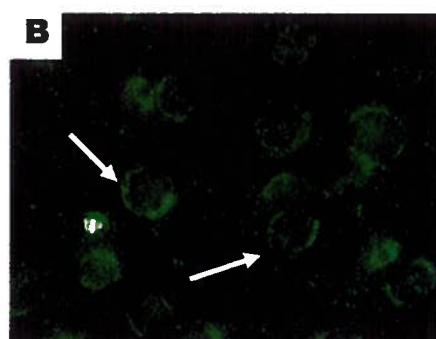
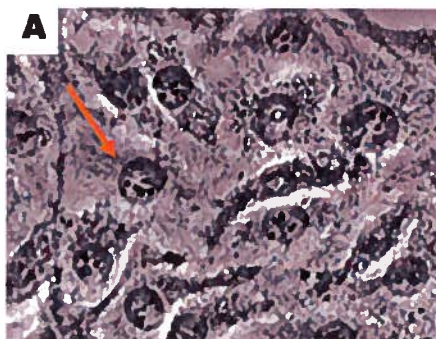
**Figure 7 – Effet du 8-Br-AMPC sur la sous-localisation de la Cx43 et sur la prolifération des cellules de neuroblastomes murins, les N2A.**

**Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A transfectées avec le vecteur de la Cx43 (N2A-Cx43) non traitées (A et B) et traitées avec 1mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (C et D).**

Les cellules N2A-Cx43 sontensemencées à une densité de  $0,5 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. 24 heures après, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.5 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics) en (A) contraste de phase et en (B) épifluorescence pour les N2A-Cx43 non traitées ; et en (C) contraste de phase et en (D) épifluorescence pour les N2A-Cx43 traitées avec 1mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures. Grossissement 200x.

**(E) Analyse de la prolifération des cellules de N2A transfectées avec le vecteur de la Cx43 (N2A-Cx43) non traitées (bleu) et traitées avec 1mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (rose).**

L'évolution de la croissance des cellules de neuroblastomes N2A est estimée ainsi qu'indiqué dans la section 2.1.4 de Matériel et Méthode.



**Figure 8 – Profil d’expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes N2A de souris.**

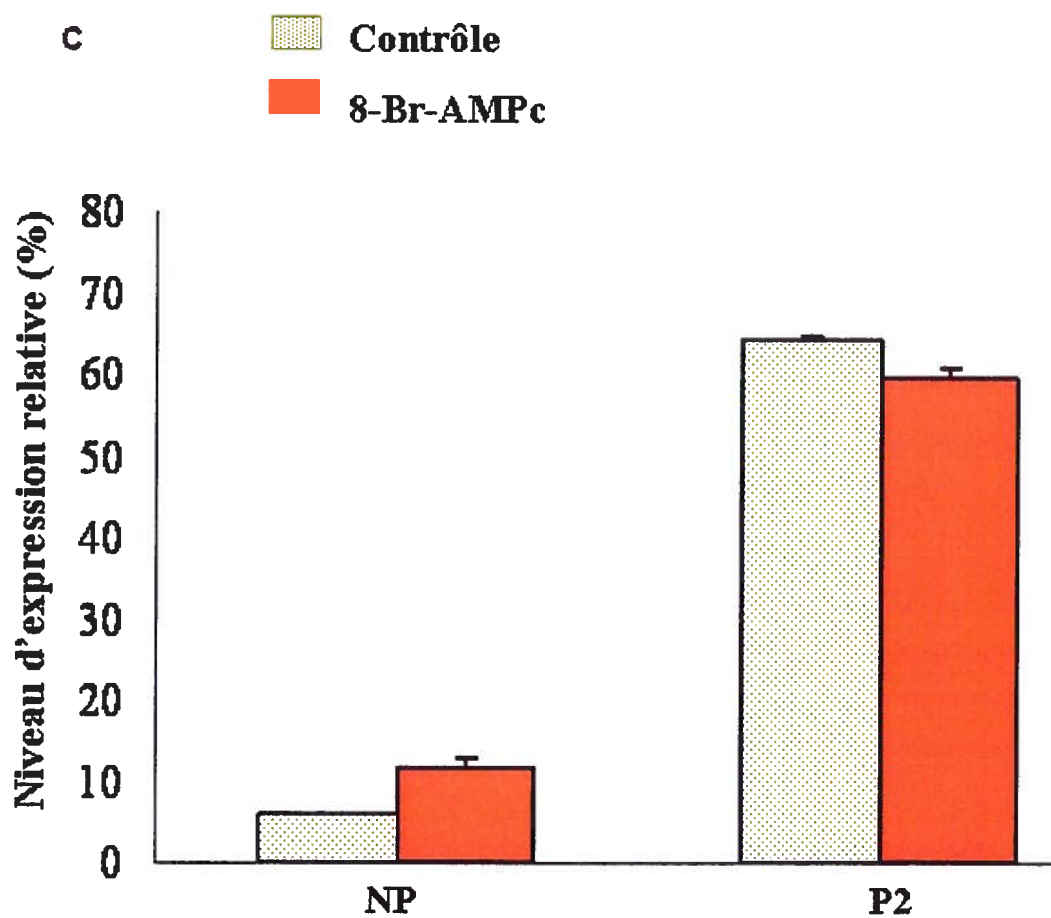
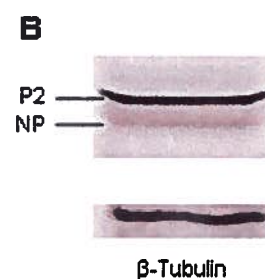
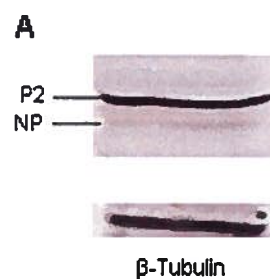
**(A) Expression de la Cx43 dans les extraits de cellules de neuroblastome murins N2A non traitées (A) et traitées avec 1 mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (B).**

Une quantité 30 µg d’extraits protéiques des cellules de N2A non traitées (A) et traitées avec 1 mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (B), sont soumis à une électrophorèse dénaturante, transférées sur une membrane de nitrocellulose, révélés par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique à la Cx43 reconnaissant la forme non phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées P1 et P2. La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 2.4). La  $\beta$ -tubuline a été utilisée en tant que contrôle lors de cette expérience.

**(C) Analyse de l’expression protéique de la Cx43 avant (vert) et après 48 heures de traitement avec le 8-Br-AMPC (orange).**

La détection colorimétrique et quantification du niveau relatif d’expression protéique ont été possible par le programme GelPro (tel que décrit dans Matériel et Méthode section 2.4.3).





Suite au traitement de 48 heures à 1mM de 8-Br-AMPC chez les N2A, nous avons remarqué qu'il existe une régulation positive (environ le double) de l'expression de l'isoforme NP de la Cx43 tel que démontré par immunobuvardage (Figure 8 B) ; l'intensité de la bande P2 étant largement supérieure (environ 6 fois) à celle de la bande NP (Figure 8 C).

### **3.4.2 Le profil d'expression des isoformes de PKC dans des biopsies humaines et l'effet de l'inhibition des isoformes de la PKC dans les cellules de neuroblastome murin (N2A)**

La protéine kinase C (PKC) est considérée comme un médiateur classique de nombreux agonistes extracellulaires qui produisent divers seconds messagers lipidiques jouant un rôle considérable dans les processus de signalisations métaboliques (Mochly-Rosen, 2007; Podar et al., 2007). Toutefois, puisqu'il existe une douzaine d'isoformes de la PKC différenciées par leur expression tissulaire, ceci suggère qu'il existe divers mécanismes de contrôle pour un large spectre de réponses physiologiques (Redig et Platanias, 2007; Kheifets et Carter 2000 ; Toker, 1998). Cependant, nous nous sommes particulièrement intéressés au groupe des cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ) puisque ces isoformes se trouvent de façon majoritaire dans les biopsies que nous avons obtenues de 10 patients atteints de neuroblastom (Children's Oncology Group, Children Hospital Philadelphia, Etats-Unis) (Figure 9) ainsi que dans les cellules de N2A constitutivement (avant même la transfection) (Figure 10). Les profils d'expression relatifs des isoformes testées se ressemblent chez les deux types de neuroblastomes excepté pour l'expression des isoformes PKC betaI et betaII dont les proportions relatives sont inversées. Les formes betaI et betaII proviennent d'un même gène et sont issues de l'épissage.

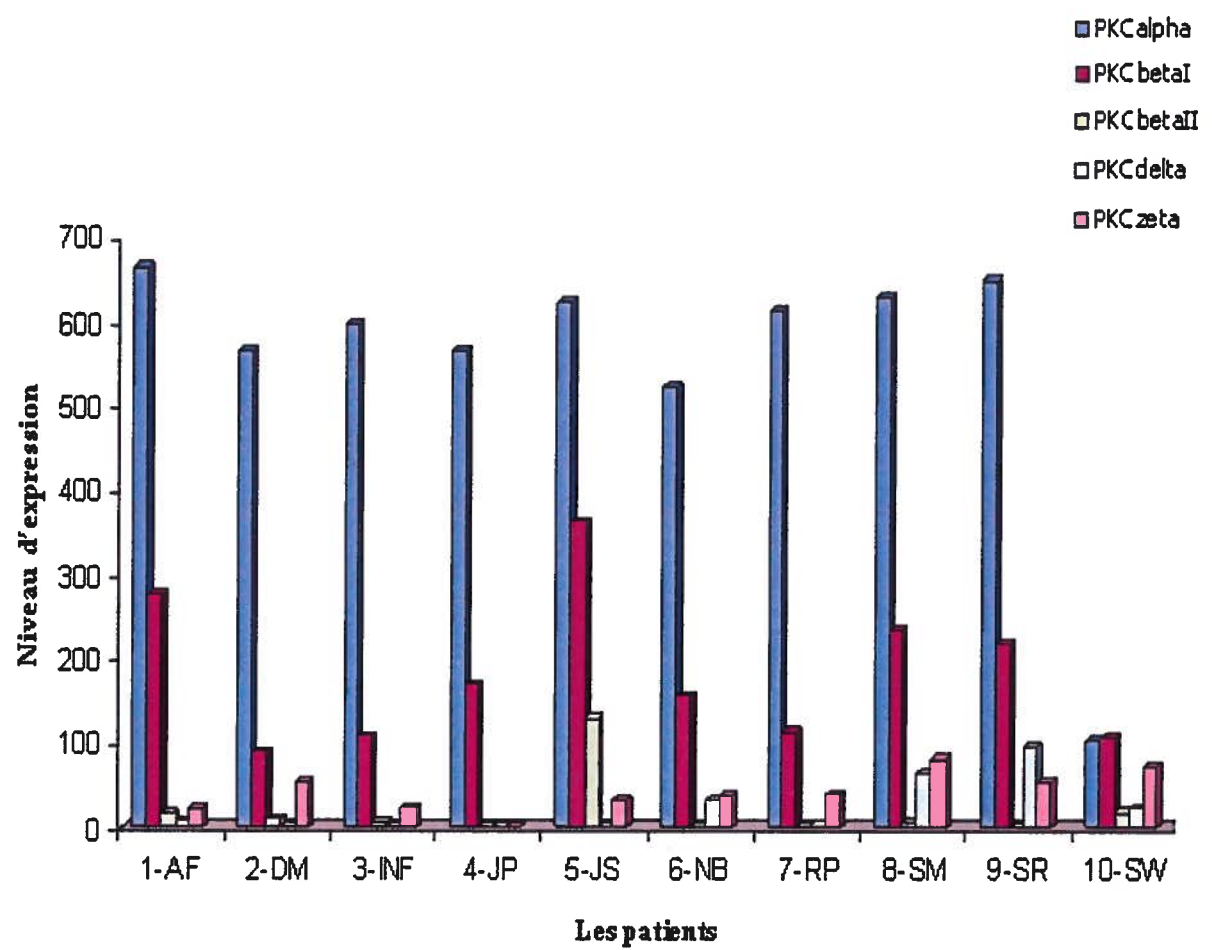
#### **3.4.2.1 L'inhibition générale des PKCs**

Dans le cadre de ce projet, notre approche consistait à vérifier l'effet de plusieurs inhibiteurs classiques sur différentes voies métaboliques des PKC afin d'identifier celles qui sont impliquées dans la régulation des jonctions lacunaires

**Figure 9 – Profil d'expression relative des différentes isoformes de la PKC chez les enfants atteints de neuroblastome.**

Ces biopsies ont été obtenues du « Children Oncology Group » du « Children's Hospital » (Philadelphie, États-Unis) après approbation du projet auprès du Comité scientifique et du Conseil d'éthiques.

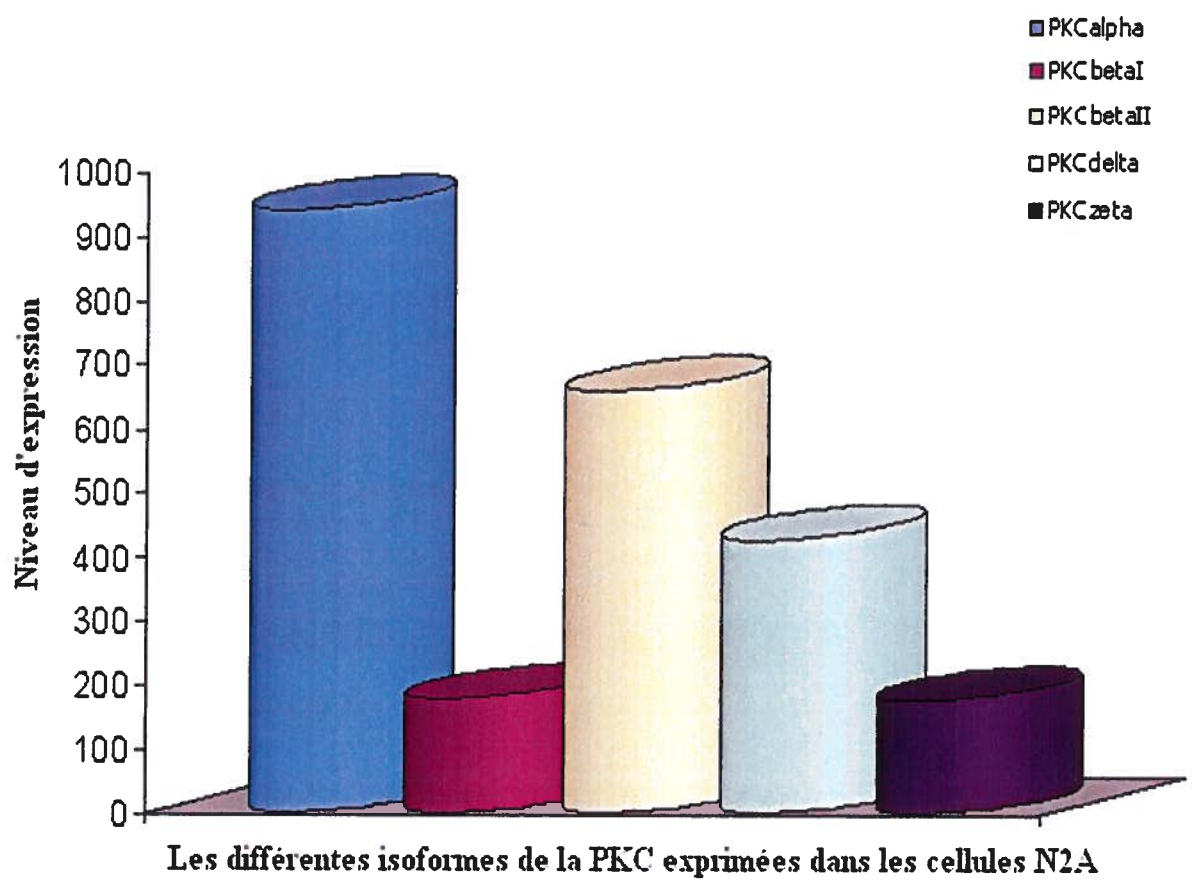
Les biopsies ont été immédiatement congelées et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Une quantité de 25  $\mu\text{g}$  d'extrait protéique des cellules de ces patients a été soumise à une électrophorèse dénaturante. Après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, révélées par immunobuvardage avec des anticorps polyclonal de lapin spécifique à la PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\delta$  et un anticorps polyclonal de chèvre pour reconnaissant la PKC $\zeta$ . La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 2.7).



**Figure 10 – Profil d’expression relative des différents isoformes de la PKC chez les cellules N2A**

Une quantité 25 µg d’extrait protéique des cellules de N2A est soumise à une électrophorèse dénaturante. Après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, révélées par immunobuvardage avec des anticorps polyclonal de lapin spécifique à la PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\delta$  et un anticorps polyclonal de chèvre pour reconnaissant la PKC $\zeta$ . La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 2.4).

La détection colorimétrique et quantification du niveau relatif d’expression protéique grâce au programme GelPro (tel que décrite dans Matériel et Méthode section 2.4.3).



dans les neuroblastomes. Nous avons utilisé des inhibiteurs de plus en plus spécifiques afin d'essayer d'identifier le rôle des sous groupes de ces iso-enzymes dans les processus de différenciation et de prolifération.

Le bisindolylmaléimide (BIS), un inhibiteur général des PKC, a été utilisé en premier lieu. Un traitement de 48 heures avec ce composé a entraîné la formation de petites vacuoles dans le cytoplasme et engendré une morphologie cellulaire plus allongée ainsi que l'émission de neurites (Figure 11 C versus Figure 11 A) ce qui dénote un début de différenciation. En outre, la distribution cellulaire de la Cx43 apparaît encore plus dissipée dans le cytoplasme (Figure 11 D versus Figure 11 B) et la Cx43 semble envahir le noyau. De plus, la taille de la population cellulaire a diminué considérablement (Figure 12) après 24 heures démontrant que les PKC sont à la fois des médiateurs nécessaires à la prolifération ou à la survie. Leur inhibition promouvoit l'induction de la différenciation cellulaire des N2A. Ce résultat est conforme à l'observation générale que la différenciation cellulaire est inversement proportionnelle à la prolifération.

#### **3.4.2.2 L'inhibition des PKC classiques (cPKC)**

Après ces résultats, nous nous sommes particulièrement intéressés au sous groupe des PKC $\alpha$  puisque cette isoforme est retrouvée majoritairement dans les biopsies (Figure 9) ainsi qu'exprimée chez les N2A (Figure 10).

Les images d'immunofluorescence obtenues suite à l'inhibition des cPKC (Figure 11 E et F) démontrent une apparence plus différenciée des cellules et un arrêt de la croissance cellulaire après 24 heures de traitement (Figure 12). Ainsi, les cPKC semblent être indispensables à la prolifération et/ou la survie des N2A. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle ces enzymes sont surexprimées constitutivement dans les cellules de N2A (Figure 10) et dans les tumeurs humaines (Figure 9). La connexine se trouve plus concentrée dans le noyau après traitement avec l'inhibiteur des cPKC (Go6976). Une localisation similaire a été montrée par Jordan et al., 1999 (Figure 4). Ces résultats suggèrent que la localisation cytoplasmique dépend des PKC classiques, cPKC.

**Figure 11 – Sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A**

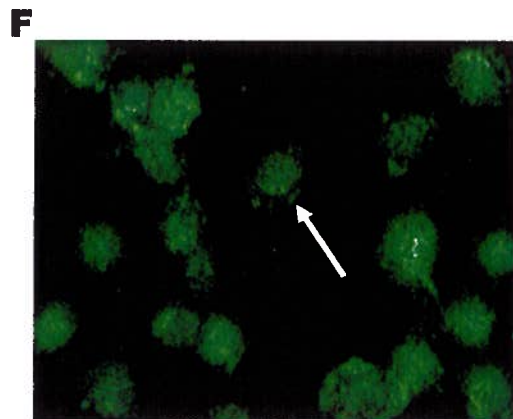
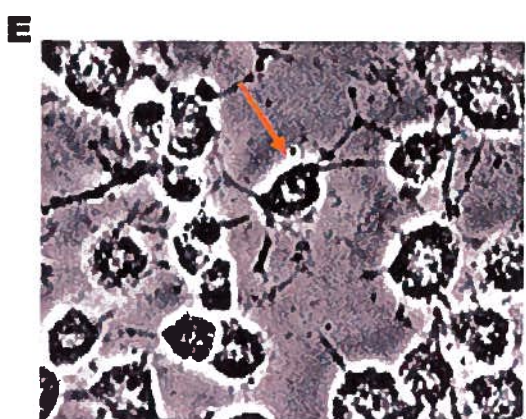
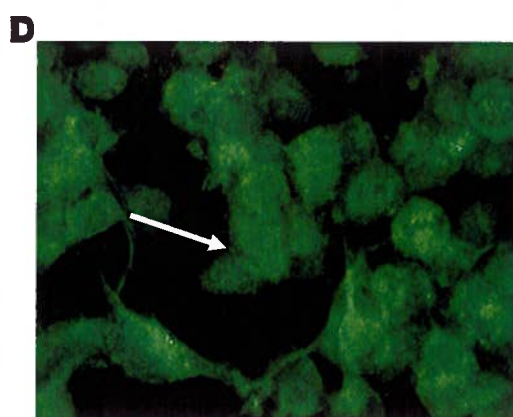
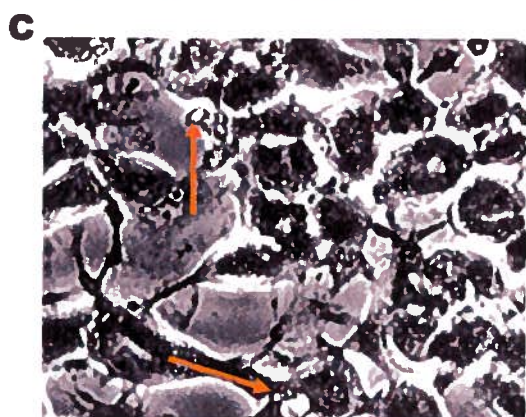
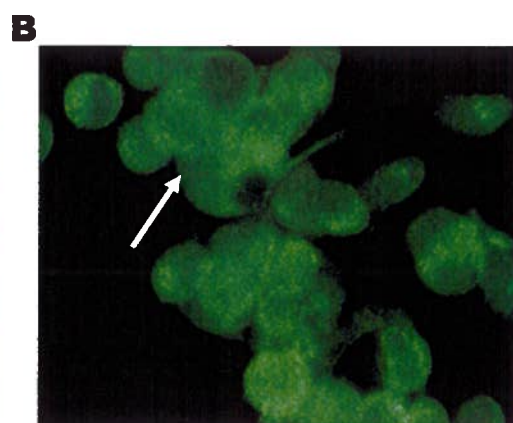
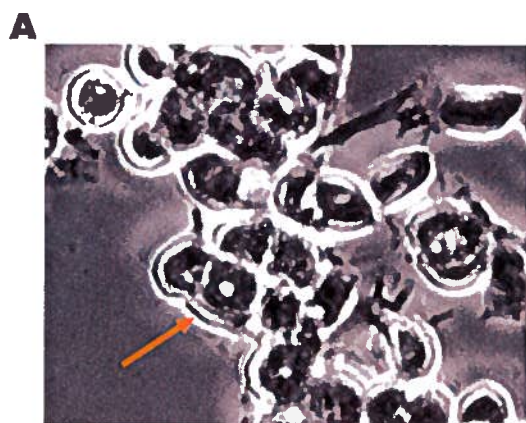
**(A,C et E) Mise en évidence de la morphologie des cellules de neuroblastomes N2A suite à divers traitements inhibant les isoformes de la PKC**

Les cellules N2A sontensemencées à une densité de  $1 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. Après 24 heures, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.5 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI. Grossissement 200x.

**(B, D et F) Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 en réponse à divers traitements inhibant les isoformes de la PKC .**

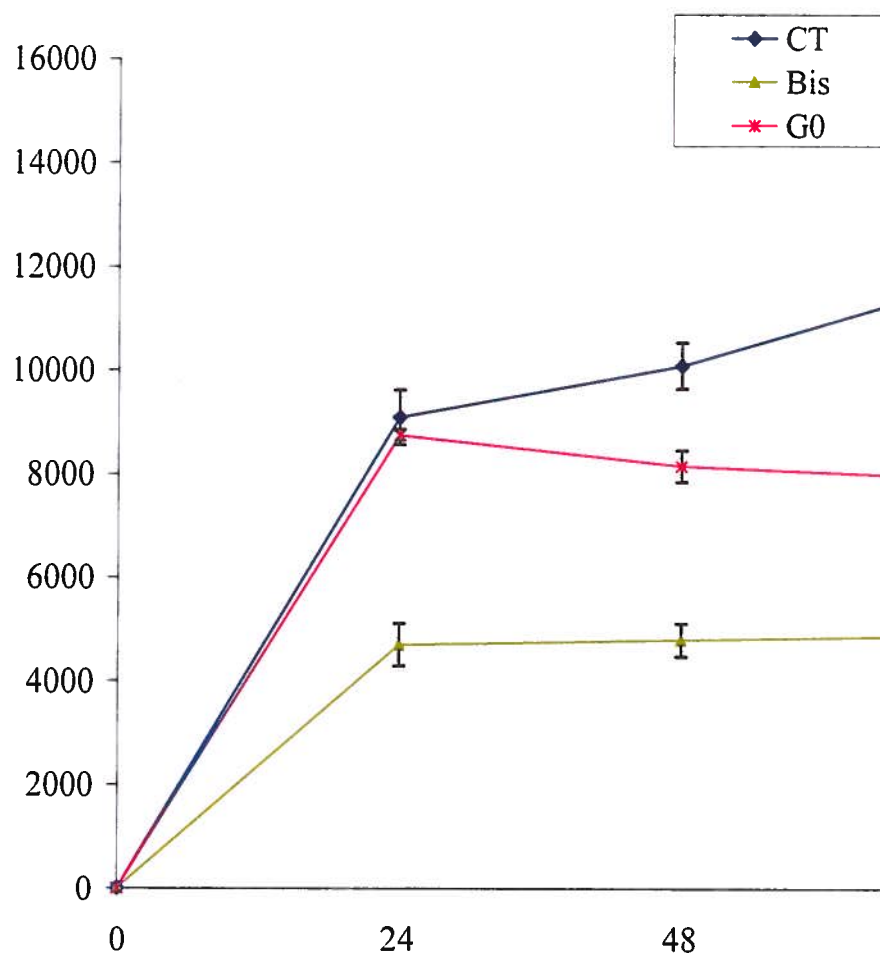
Les cellules ont été transfectées par le vecteur de la Cx43 (N2A-Cx43) selon les indication de la partie Matériel et Méthode section 2.2. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics) en (A) contraste de phase et en (B) épifluorescence pour les N2A-Cx43 non traitées ; en (C) contraste de phase et en (D) épifluorescence pour les N2A-Cx43 traitées avec 2,5 mM de Bisindolylmaléimide pendant 48 heures ; en (E) contraste de phase et en (F) épifluorescence pour les N2A-Cx43 traitées avec 2,5 mM de Go6979 pendant 48 heures. Grossissement 200x.





**Figure 12 – Analyse de la prolifération des cellules de N2A transfectées avec le vecteur de la Cx43 (N2A-Cx43) non traitées (bleu), traitées avec 2,5 mM de Bisindolylmaléimide (vert) et 2,5 mM de Go6979 (rouge).**

L'évolution de la croissance des cellules de neuroblastomes N2A est estimée selon les explications mentionnées dans la partie Matériel et Méthode dans la section 2.1.4. Les cellules sont traitées avec ces divers composés jusqu'à 96 heures.



### 3.4.2.3 L'inhibition des PKC $\alpha$

L'inhibition de la PKC $\alpha$ , a été réalisée avec un inhibiteur spécifique de l'isoforme PKC $\alpha$ : Gli005 (Gli) (courtoisie de PharmaGap Inc., Ottawa). Nous avons remarqué une dispersion plus prononcée de la sous-localisation des connexines (Figure 13 B) en comparaison des cellules non traitées (Figure 13 A) similaire de la distribution obtenue après inhibition générale (Figure 10 D). Il semble donc que parmi les cPKC, la PKC $\alpha$  ne soit pas responsable de la concentration de Cx43 dans le noyau (Figure 11F et Figure 13B).

De plus, les cellules de N2A ayant reçu l'insert du vecteur de la partie C-terminale de la Cx43 n'ont pas survécu à ce traitement même après 24 heures, ce qui suggère une contribution particulière de ce peptide (le C-terminal) à la survie, peut-être indépendante de la fonction des jonctions lacunaires.

### 3.4.3 L'effet combiné de l'activation de la PKA et de l'inhibition de la PKC $\alpha$ sur les cellules N2A

Il a été préalablement remarqué qu'en activant la PKA et en inhibant simultanément la PKC $\alpha$ , la fonctionnalité des jonctions lacunaires était restaurée dans les cellules de neuroblastomes humains, les IMR32 (Arnold et al., 2005). Nous voulions confirmer cette observation en nous servant de la technique d'immunofluorescence afin d'étudier l'implication possible de ces deux médiateurs dans la régulation des jonctions lacunaires des N2A transfectées.

La Figure 13 C démontre que la morphologie est très arrondie et qu'il y a formation de neurites chez certaines cellules, ce qui dénote un début de différenciation.

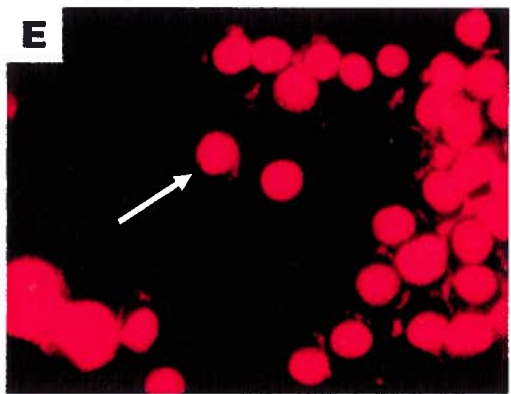
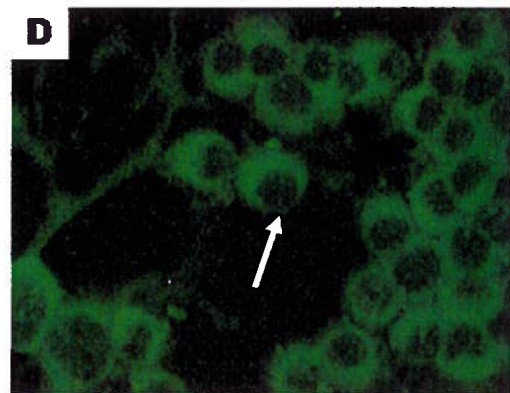
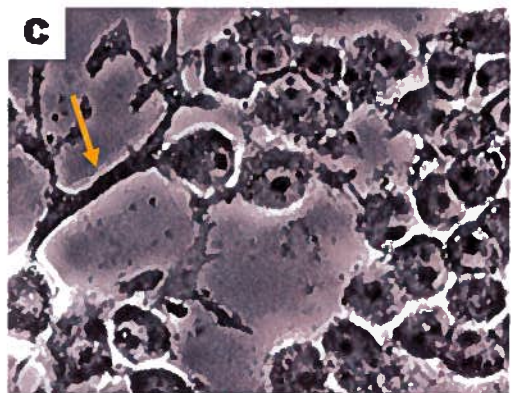
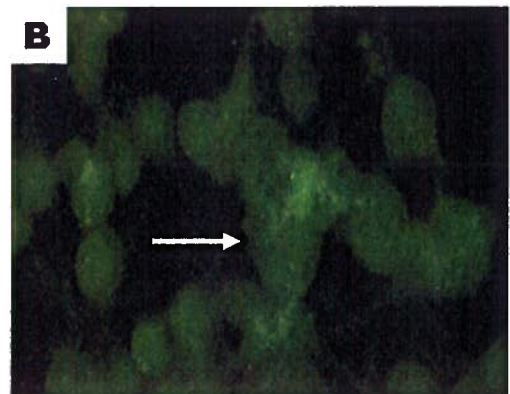
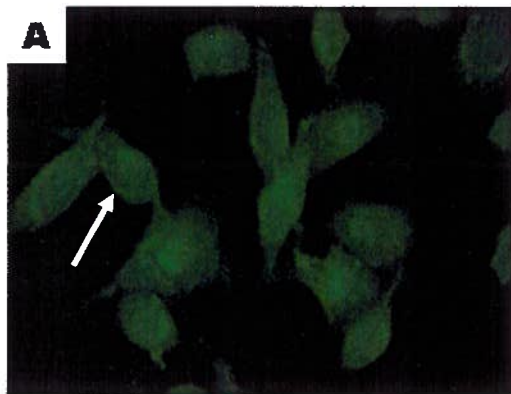
En analysant l'image en contraste de phase (Figure 13 D), nous pouvons remarquer que la localisation de la Cx43 est devenue cytoplasmique dans les cellules N2A. Grâce au réactif de Hoechst étiquetant l'ADN nucléaire, nous avons pu déceler les noyaux. Ce composé est excité par la lumière ultraviolette (autour de 350 nm) et émet de la fluorescence à 460 nm. Grâce au programme ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics), nous avons électroniquement substitué la couleur rouge à la fluorescence bleue émise par le réactif de Hoechst pour ce

**Figure 13 – Sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes N2A transfectées en réponse au traitement par Gli005.**

Les cellules N2A-Cx43 sontensemencées à une densité de  $0,5 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. Après 24 heures, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.4.

Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics) en (A) épifluorescence pour les N2A-Cx43 non traitées, en (B) épifluorescence pour les N2A-Cx43 traitées avec  $10 \mu\text{M}$  de Gli pendant 48 heures. L'image en (C) illustre la morphologie des cellules, en contraste de phase, suite à un traitement simultané de 48 heures au 8-Br-AMPC et à Gli et en (D) celle de l'épifluorescence. L'image en (D) prise après utilisation du colorant Hoechst 33258, a été utilisée en (E) pour marquer l'ADN (des noyaux). Ce composé est excité par la lumière ultraviolette (autour de 350 nm) et émet de la fluorescence à 460 nm. Grâce au programme ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics), nous avons électroniquement substitué la couleur rouge à la fluorescence bleue émise par le réactif de Hoechst pour ce marquage. La superposition de la fluorescence verte (D) et rouge (E) donne lieu à une coloration orange (F) indiquant la présence résiduelle de la Cx43 dans le noyau. Grossissement 200x.





marquage. La Figure 13 E montre que la Cx43 des cellules traitées au 8-Br-AMPC et au Gli ont une localisation cytoplasmique. La superposition de la fluorescence verte et rouge donne lieu à une coloration orange.

La Figure 13 F représente la superposition de la Figure 13 D (les Cx43 sont marquées en vert électroniquement) et Figure 13 E (l'ADN nucléaire marqué en rouge électroniquement) ; la superposition des deux couleurs donnant une coloration orange ou jaune. Si, suite à la superposition des images, le noyau était entièrement vide la coloration resterait rouge. La Figure 13 F indique la présence résiduelle de la Cx43 dans le noyau même s'il y a eu migration importante des connexines hors du noyau. La Figure 13 F représente la superposition de la Figure 13 D (les Cx43 marquées en vert) et Figure 13 E (l'ADN nucléaire marqué en rouge). Donc, en dépit d'un transfert massif de la Cx43 du noyau vers le cytoplasme après le double traitement, il reste quelques sites de Cx43 dans le noyau, également visibles dans la Figure 13 D sous forme de fin pointillé. Ni l'activation de la PKA (Figure 7 D) ni l'inhibition de la PKC $\alpha$  par Gli n'avait altéré la sous-localisation de la Cx43. Il est donc intéressant de noter que l'action combinée des 2 modulateurs pratiquement vide le noyau de la Cx43. Ceci pourrait être très important puisque la localisation nucléaire de la Cx43 est souvent associée à l'oncogénicité.

Comme les cellules de N2A ne sont pas très adhérentes, elles se soulèvent facilement et il est pratiquement impossible de faire des expériences de « scrape loading » afin de déterminer la fonctionnalité jonctionnelle. Toutefois, il existe d'autres protocoles expérimentaux qui nous permettraient de vérifier si les jonctions lacunaires formées sont ouvertes ou fermées – tel que « *dye transfer technique: fluorescence-recovery after photobleaching* » - auxquels nous n'avons malheureusement pas eu recours par manque de temps et de moyens.

### **3.5 Expression et fonctionnalité des connexines dans les cellules de neuroblastomes humains, les IMR32**

Finalement, notre dernier objectif consistait à confirmer la contribution des différentes voies métaboliques explorées ci-dessus, sur la perméabilité jonctionnelles dans les IMR32, préalablement démontrée (Arnold et al. 2005), et ceci afin de déterminer si les mêmes voies de signalisations, en particulier celles de la PKA et des isoformes de PKC, sont empruntées pour la régulation des jonctions lacunaires dans les phénotypes humains et murins.

#### **3.5.1 La Cx43 endogène des cellules IMR32**

L'analyse par immunobuvardage de la Cx43 d'un extrait cellulaire d'IMR32 en prolifération a montré que ces cellules expriment de manière constitutive deux formes de la Cx43 soit la NP et la P2 (Figure 14 A). D'après les résultats obtenus, même si la forme phosphorylée P2 y est aussi retrouvée, la forme non-phosphorylée (NP) est celle prédominante. De plus, la forme P1 est difficilement détectable chez les cellules humaines IMR32.

### **3.6 Les voies de signalisation restaurant la fonctionnalité jonctionnelle des cellules IMR32**

#### **3.6.1 L'effet de l'activation de la PKA sur les Cx43 dans les cellules IMR32**

L'établissement d'un modèle de différenciation cellulaire de neuroblastome, nous a permis d'analyser la communication jonctionnelle au cours de la différenciation. Ces cellules sont connues pour récapituler *in vitro* la différenciation des cellules du système nerveux périphérique. Les jonctions lacunaires sont régulées durant la différenciation cellulaire du système nerveux périphérique (Trosko et al., 2000).

En effet, nous avons remarqué que l'incubation de 48 heures avec 1mM de 8-Bromo-AMP cyclique (8-Br-AMPC), un analogue perméable de l'AMPC qui mime son action endogène (Arnold et al., 2005; Schwartz et al., 2001), induit une



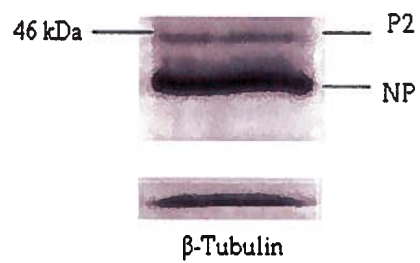
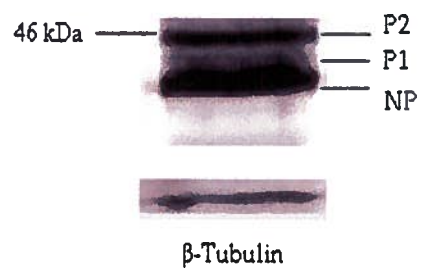
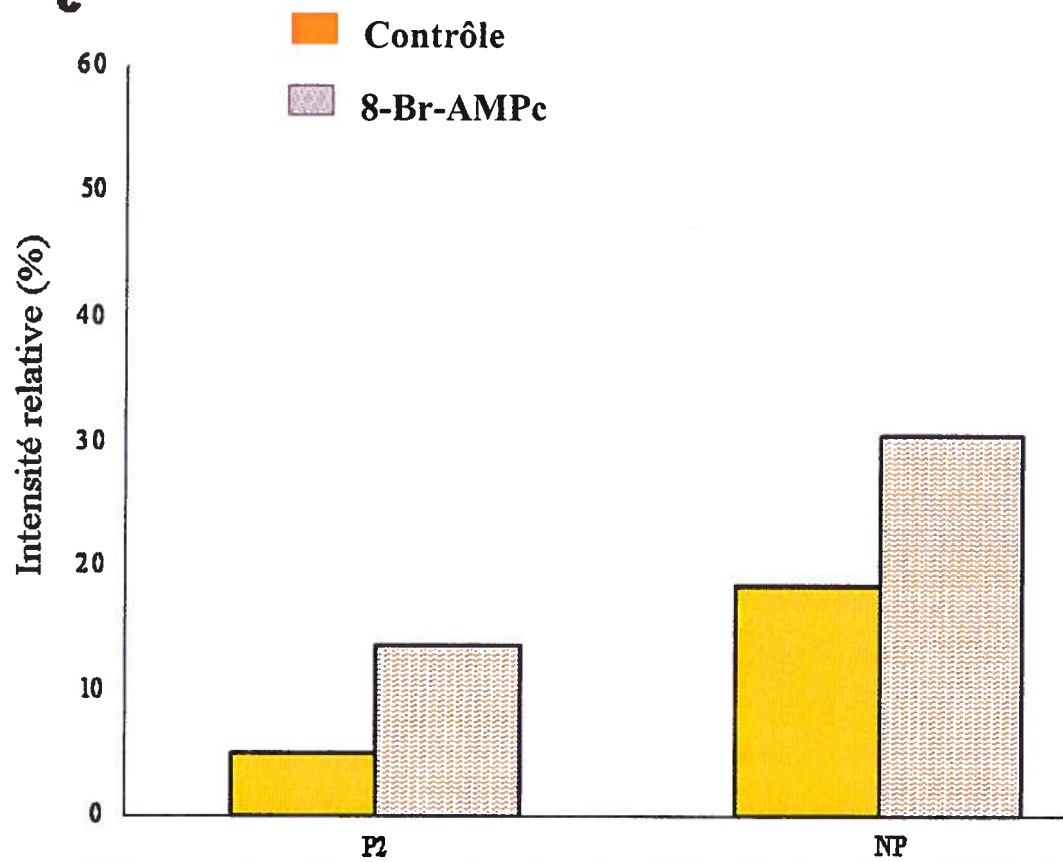
**Figure 14 – Profil d'expression de la connexine 43 dans les cellules de neuroblastomes humains : IMR32.**

**(A) Expression de la Cx43 dans les extraits de cellules humaines de neuroblastome non traitées (A) et traitées avec 1 mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (B).**

Une quantité 30 µg d'extraits protéiques des cellules d'IMR32 non traitées (A) et traitées avec 1 mM de 8-Br-AMPC pendant 48 heures (B), est soumise à une électrophorèse dénaturante, transfectées sur une membrane de nitrocellulose, révélés par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique à la Cx43 reconnaissant la forme non phosphorylée (NP) et les deux formes phosphorylées P1 et P2. La détection a été faite avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 2.3 et 2.4). La  $\beta$ -Tubuline a été utilisée en tant que contrôle lors de cette expérience.

**(C) Analyse de l'expression protéique de la Cx43 avant (vert) et après 48 heures de traitement avec le 8-Br-AMPC (orange).**

Détection colorimétrique et quantification du niveau relatif d'expression protéique avec le programme GelPro (tel que décrite dans Matériel et Méthode section 2.4.3). La ligne rouge représente le degré d'expression protéique relative.

**A****B****C**

régulation positive de l'expression de la Cx43 tel que visualisé par immunobuvardage (Figure 14 B). Le traitement à l'analogue de l'AMPC induit une augmentation de l'expression de NP et de P2 tel que visualisé dans le graphique (Figure 14 C). Cette augmentation de l'expression, des bandes P2 et NP, pourrait se faire au niveau de la traduction ou de la transcription du gène spécifique de la Cx43 et des modifications post-traductionnelles (phosphorylations).

### **3.6.1.1 La sous-localisation des Cx43 dans les cellules IMR32**

En utilisant la technique d'immunofluorescence nous avons déterminé la localisation intracellulaire de la Cx43 dans les cellules IMR32 en prolifération. La Figure 15 B indique que la Cx43 est absente de la membrane plasmique et se localise dans le cytoplasme au niveau de la partie périnucléaire. La prolifération s'accompagne toujours de l'arrêt des échanges intercellulaires par les jonctions lacunaires (Laird, 2006) mais ceci peut suggérer que les jonctions lacunaires sont défectueuses dans les cellules IMR32 à cause d'une altération de la sous-localisation de la Cx43.

Toutefois, suite à un traitement par analogue de l'AMPC, nous avons observé l'élongation des neurites (Figure 15 C) et une diminution de la croissance cellulaire d'après les résultats obtenus par cytométrie en flux à partir de 3 jours après le traitement (Figure 15 E).

L'utilisation de la technique d'immunofluorescence, nous a permis de visualiser la localisation intracellulaire de la Cx43. En effet, la Figure 15 E montre que la Cx43 est retrouvée à la membrane plasmique tout en étant présente dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules IMR32 suite à un traitement de 48 heures à l'AMPC. De plus, la Figure 15 C démontre une morphologie différente (début de différenciation) des cellules IMR32.

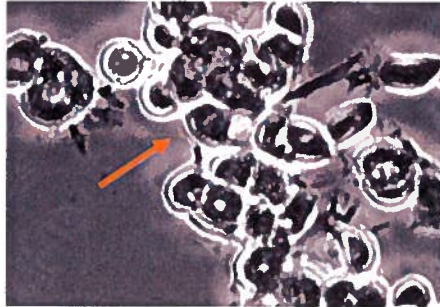
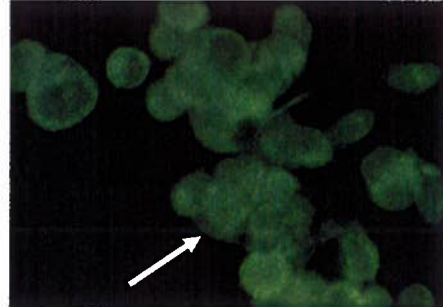
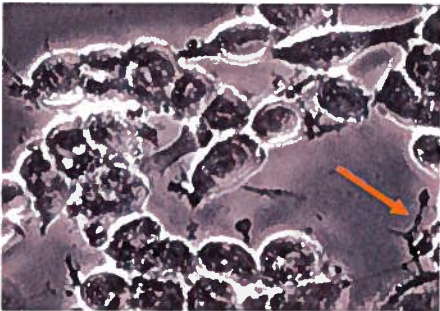
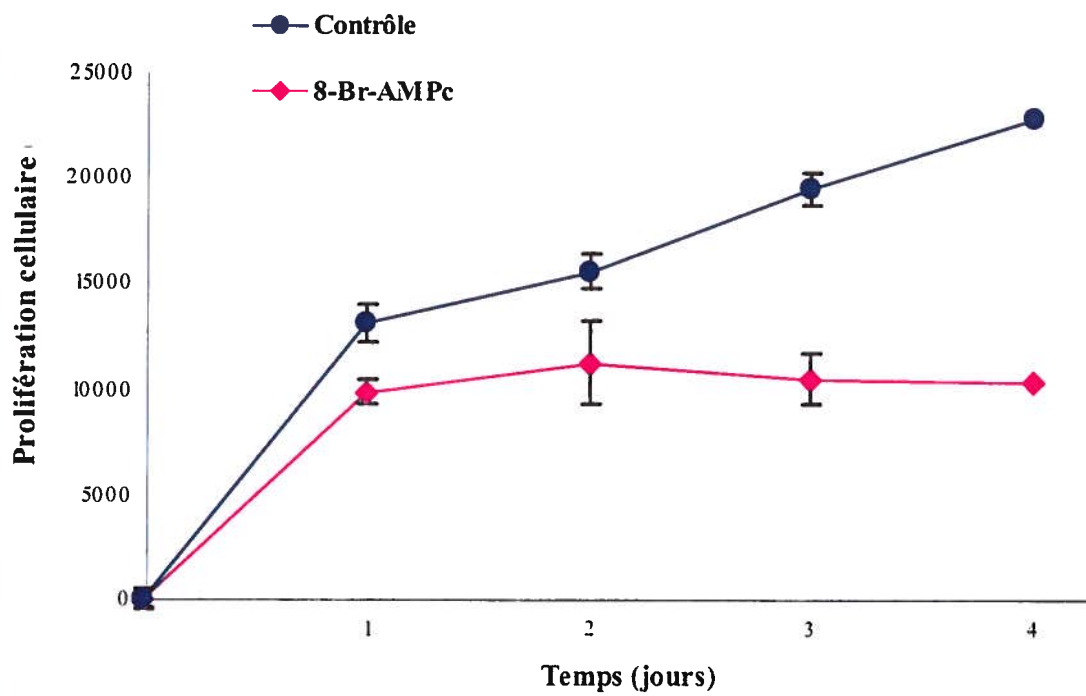
**Figure 15 – Effet du 8-Br-AMPc sur la sous-localisation de la Cx43 et sur la prolifération des cellules de neuroblastomes humains, les IMR32.**

**Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules d'IMR32 non traitées (A et B) et traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 48 heures (C et D).**

Les cellules d'IMR32 sont ensemencées à une densité de  $0,5 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. 24 heures après, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.3 et 2.4 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 Software System (Media Cybernetics) en (A) contraste de phase et en (B) épifluorescence pour les IMR32 non traitées ; et en (C) contraste de phase et en (D) épifluorescence pour les IMR32 traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 48 heures. Grossissement 200x.

**(E) Analyse de la prolifération des cellules d'IMR32 non traitées (bleu) et traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 48 heures (rose).**

L'évolution de la croissance des cellules d'IMR32 est réalisée selon les explications mentionnées dans la partie Matériel et Méthode dans la section 2.1.4 traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 7 jours.

**A****B****C****D****E**

### 3.6.1.2 La fonctionnalité jonctionnelle au sein des cellules IMR32

Afin d'étudier la fonctionnalité des jonctions lacunaires dans les cellules humaines IMR32 non-traitées, nous avons utilisé la technique de chargement par grattage (« scrape loading »). Tel que décrit précédemment, cette technique consiste à égratigner les cellules en culture par un trait d'aiguille et de les incuber dans une solution contenant un colorant fluorescent de bas poids moléculaire (jaune de Lucifer). Ainsi, seules les cellules lésées vont se charger de colorant et émettre une fluorescence provenant du colorant. Le passage du colorant vers les cellules voisines ne peut se faire que par les jonctions lacunaires.

Lors de la réalisation de ces expériences, le chargement par le fluorochrome jaune de Lucifer, par incision des cellules IMR32 en prolifération, a montré que juste les cellules endommagées par l'égratignure deviennent fluorescentes sous le microscope et non les cellules avoisinantes (Figure 16 C). Ces résultats suggèrent alors que les jonctions lacunaires ne sont pas fonctionnelles dans la lignée de neuroblastomes IMR32 malgré l'expression de la Cx43. Dans ce cas, 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, ou à la faible distribution, des connexines formant les canaux au niveau membranaire.

Suite à une exposition de 48 heures à l'analogue de l'AMPC, nous avons observé l'élongation des neurites (Figure 16 D) et une diminution de la croissance cellulaire (Figure 15 E). Ainsi, cet analogue, augmente la présence et intensifie (Figure 16 E) la répartition membranaire des Cx43 (Figure 16 E) tout en promouvant la formation de jonctions lacunaires visualisées par « scrape loading » (Figure 16 F). La localisation membranaire de la Cx43 engendre la formation de jonctions lacunaires dans les cellules IMR32 (Figure 16 F) comparativement à l'absence observée, lorsque les cellules ne sont

**Figure 16 – Évaluation des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastomes IMR32**

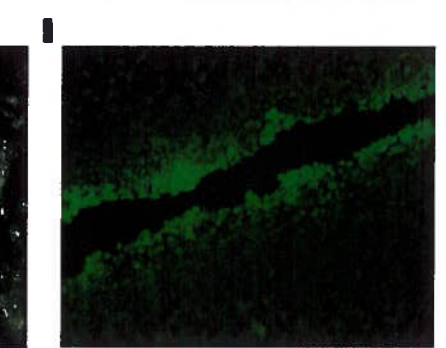
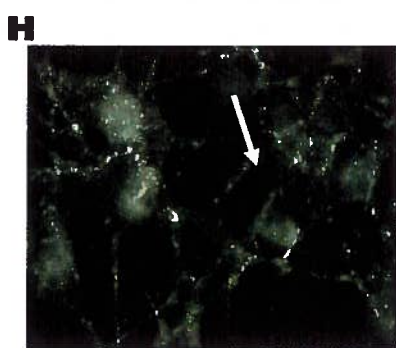
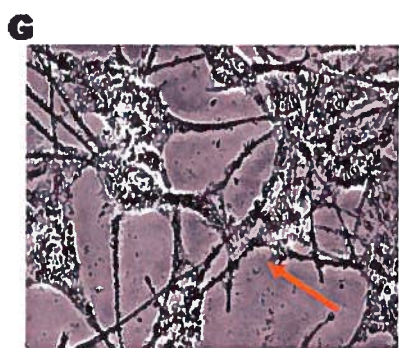
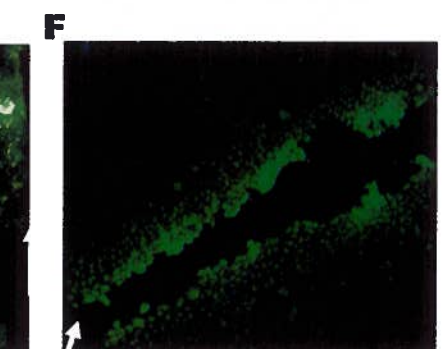
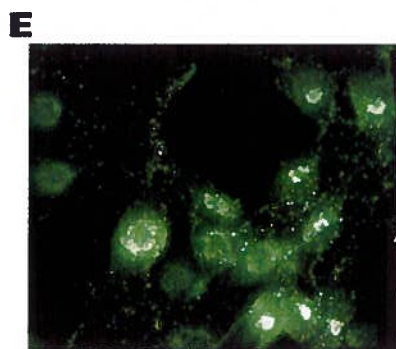
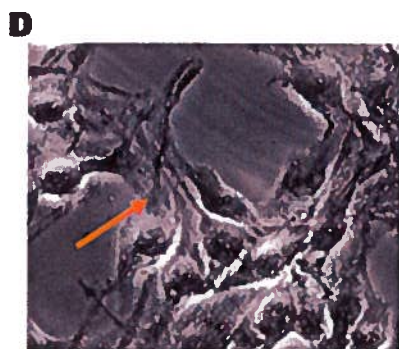
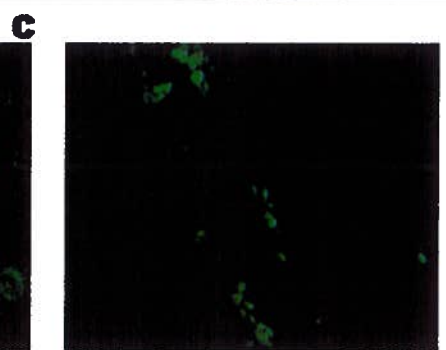
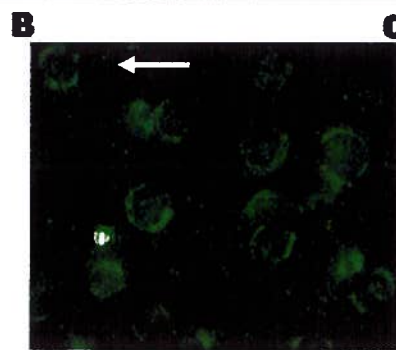
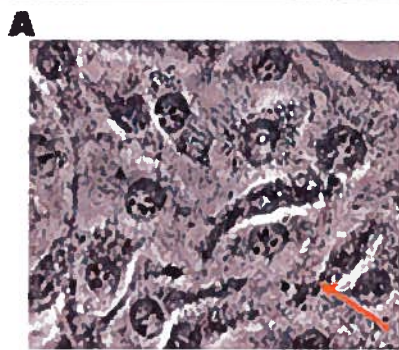
**Mise en évidence par immunofluorescence de la sous-localisation de la Cx43 dans les cellules de neuroblastomes IMR32 non traitées (A et B), traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 48 heures (D et E) et avec 10  $\mu$ M de Gli pendant 48 heures (G et H).**

Les cellules IMR32 sontensemencées à une densité de  $0,5 \times 10^4$  par  $20 \text{ mm}^2$  dans des conditions standard. Après 24 heures, les cellules sont lavées et fixées tel que décrit dans la section 2.5 de Matériel et Méthode. Les cellules fixées sont incubées avec un anticorps primaire anti-Cx43 suivi d'un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa. Les images ont été capturées avec un microscope à épifluorescence Olympus équipé avec une caméra DAGE-MTI à l'aide d'ImagePro 4,5 software system (Media Cybernetics) en contraste de phase (A, D et G) et en épifluorescence (B, E et H). Grossissement 200x.

**Évaluation des communications intercellulaires dans les cellules de neuroblastomes IMR32 en prolifération non traitées (C) ; traitées avec 1mM de 8-Br-AMPc pendant 48 heures (F) et et avec 10  $\mu$ M de Gli pendant 48 heures (I).**

L'évaluation directe du degré d'échange cellulaire est effectuée à l'aide d'un colorant : le jaune de Lucifer. Les cultures cellulaires sont lésées par une entaille et exposées pendant trois minutes à une solution de 0,5% de jaune de Lucifer dans du PBS. Après avoir lavé quatre fois au PBS 1X, les lamelles ont été observées au microscope à épifluorescence Olympus muni d'une caméra DAGE-MTI à l'aide du filtre vert (IMT2-DMG) et analysées avec ImagePro 4,5 Software System (Media Cybernetics). Grossissement 100x.







pas traitées, en Figure 16 A, B et C. La combinaison de l'activation de la PKA et de l'inhibition de PKC $\alpha$  est déterminante dans l'induction de la différenciation des cellules de neuroblastome humain.

### **3.6.2 Confirmation de l'effet combiné de l'activation de la PKA et de l'inhibition de la PKC $\alpha$ sur la communication cellulaire des IMR32**

Il a été préalablement remarqué (Arnold et al., 2005), qu'en activant la PKA et en inhibant simultanément la PKC $\alpha$ , la fonctionnalité des jonctions lacunaires était intensifiée. Nous avons voulu confirmer que l'activation par l'analogue de l'AMPc et l'inhibition de la PKC $\alpha$  donne une meilleure migration (communication des jonctions lacunaires) comparé aux cellules non traitées (Figure 16 B). Effectivement, la Figure 16 H montre que la Cx43 se localise au niveau membranaire et que la formation de neurites (Figure 16 G) est nettement accentuée par rapport aux cellules non traitées, ou traitées avec le 8-Br-AMPc (Figure 16 A et D). De plus, la Figure 16 I par rapport à la Figure C et F démontre, par « scrape loading », le passage du colorant vers les cellules voisines via les jonctions ouvertes lors du traitement combiné avec du 8-Br-AMPc et Gli005.

## **3.7 Les différences existantes entre les cellules de neuroblastomes humains et murins**

### **3.7.1 Expression constitutive de la Cx43**

Comme démontré à la Figure AA B et D, les cellules de neuroblastomes murins, les N2A, n'expriment pas la Cx43 de manière constitutive. En les transfectants avec le vecteur de la Cx43 nous engendrons une altération majeure au niveau de l'équilibre métabolique de ces cellules et nuisons à leur fonctionnement endogène sans toutefois restaurer la fonction des jonctions lacunaires.

Par contre, les IMR32 expriment la Cx43 de façon constitutive (Figure 14 A) et leur fonction peut être restaurée.

### **3.7.2 Le profil protéique de la Cx43**

D'après les (Figures 6 E/F et 14 A), l'expression protéique diffère dans ces deux lignées cellulaires. En effet, les cellules IMR32 expriment majoritairement l'isoforme non phosphorylée (NP) de la Cx43 tandis que les cellules de neuroblastomes murins transfectées expriment celle de la P2.

Suite au traitement avec le composé analogue à l'AMPc, les IMR32 ont une expression accrue de la forme P2 beaucoup plus importante (1,5 X comparé à la forme non phosphorylée) (Figure 14) par rapport à celle des cellules de N2A (Figure 8).

### **3.7.3 Sous-localisation cellulaire de la Cx43 et prolifération des cellules de neuroblastomes**

La combinaison des deux traitements – celui de l'activation de la PKA et de l'inhibition de la PKC $\alpha$  – engendre une fonctionnalité lacunaire remarquable chez les IMR32 (Figure 16 I). Toutefois, suite à un traitement semblable, même s'il est évident que la sous-localisation cellulaire de la Cx43 devient cytoplasmique chez les N2A (Figure 13 D et F), il est impossible de déterminer à cette étape si les jonctions lacunaires sont ouvertes et fonctionnelles dans le cas de cette lignée cellulaire. Il serait plausible d'émettre l'hypothèse que ces deux lignées cellulaires suivent une même voie de signalisation pour la migration d'une grande partie de leurs Cx43 vers le cytoplasme (Figure 13 D/F et 16 H).

#### **4. DISCUSSION**

Le fonctionnement normal de tout organisme multicellulaire dépend de la coordination des cellules qui le composent. Au niveau des organes, cette coordination implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines et règle en conséquence son propre niveau de fonctionnement et fait intervenir des signaux qui sont transmis à des cellules équipées de récepteurs, de canaux, d'enzymes ou de voies métaboliques appropriées. (Pahujaa et al., 2007; Chanson et al., 2007 ; Solan et Lampe, 2005; Meda, 1996)

Dans tous ces cas, le transfert d'information d'un organe à l'autre se fait indirectement *via* la diffusion de l'ion ou de la molécule signal dans l'espace intercellulaire. Cependant, le fonctionnement de nombreux tissus est préservé dans des conditions qui perturbent ou même abolissent le flux de signaux intercellulaires, indiquant ainsi que d'autres mécanismes de communication intercellulaire sont aussi importants – ce qui ajoute à la complexité de ces études (Moreno et Lau, 2007 ; Barbe et al., 2006 ; Trosko, 2003)

Le rôle des jonctions lacunaires est primordial pour assurer la synchronisation des réponses aux stimuli externes, à l'homéostasie et à la différenciation cellulaire (Kovacs et al., 2007). Lorsque cet équilibre jonctionnel est modifié, de nombreuses maladies surgissent (Bilchick et al., 2007; Axelsen et al., 2007; Harris, 2007; Mazereeuw-Hautier et al., 2007; Gropman et Adams, 2007; Sliwińska-Kowalska et al., 2006; Dzhemileva et al., 2006; Boralevi et al., 2005). En effet, les jonctions lacunaires sont altérées et anormalement distribuées dans les cancers humains et les lignées qui en dérivent (Welch et al., 2007). La majorité des cancers présentent une altération au niveau des jonctions lacunaires responsables de la répartition des messagers secondaires, de co-facteurs et des modulateurs des protéines kinases (Laird, 2006 ; Evans et Martin, 2002 ; Trosko and Ruch, 1998).

D'après la littérature, les jonctions lacunaires sont fonctionnelles chez les neuroblastomes durant les premiers stades embryonnaires (Unsworth et al., 2006 ; Carystinos et al., 2001 ; Turco et al., 1991). La perte du couplage cellulaire à

travers les jonctions lacunaires est une caractéristique commune des cellules transformées qui ont perdu le contrôle de la prolifération et les mécanismes du maintien de la différenciation cellulaire comme dans le cas des cellules tumorales rénales et ovariennes où les jonctions lacunaires sont modifiées (Toler et al., 2006 ; Hanna et al., 1999 ; Noguchi et al., 1999).

Selon des nombreux auteurs, ce dysfonctionnement de la communication cellulaire peut être dû soit à un problème au niveau du transport à la membrane cellulaire soit à un blocage au niveau de l'ouverture du canal lui-même ou même à l'absence des protéines (connexines) formant les canaux au niveau membranaire (Laird, 2006 ; Allagnat et al., 2005 ; Van Steensel, 2004 ; Wei et al., 2004 ; Krutovskikh et Yamasaki, 2000 ; Bozhkova et al., 1998 ; Goliger et al., 1996).

À titre d'exemple confirmé par notre travail, les cellules de N2A, provenant d'une tumeur spontanée au cerveau d'une souris n'expriment pas de connexine de façon endogène (Moory et al., 2001 ; Jordan et al., 1999). L'analyse par immunobuvardage (Figure 5 B) et par immunofluorescence (Figure 5 C et D) de la Cx43 (~ 43 kDa) d'un extrait cellulaire des N2A, nous a démontré que ces cellules sont déficientes en Cx43 et en communication jonctionnelle (Moory et al., 2001 ; Jordan et al., 1999). En effet, les N2A sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des transfectants stables exprimant diverses connexines pour l'étude de la communication jonctionnelle (Gemel et al., 2006 ; Laird, 2006 ; Tanmahasamut et al., 2005 ; Zhong et al., 2003, Moory et al., 2001 ; Statuto et al., 1997 ; Zhu et al., 1991 ; Eghbali et al., 1990).

L'intérêt d'exprimer la Cx43 chez les N2A est de pouvoir étudier les voies métaboliques qui contrôlent son expression et sa fonction sans chevauchement avec la Cx43 déjà exprimées dans les cellules (comme ce serait le cas si on transfectait les cellules IMR32). De plus, il est intéressant de pouvoir déterminer si les mécanismes qui les régulent et restaurent la fonction des jonctions lacunaires rétablissent un phénotype quasi normal.

Tel qu'énoncé auparavant, l'objectif du projet a été de transfecter les cellules de Neuro2A avec 4 différents vecteurs afin de tenter d'élucider les voies métaboliques impliquées dans le déficit d'expression de la Cx43, l'altération, la formation et la fonction des jonctions lacunaires ainsi que leur contribution potentielle à la cancérisation des cellules Neuro2A. Notre travail a consisté à étudier les vecteurs contenant la Cx43-GFP, la Cx43 entière, la CT-Cx43 et un clone anti-sense. Le premier et le second pour comparer la distribution intracellulaire et le troisième pour examiner, accessoirement, l'effet des phosphorylations. Le clone anti-sense nous a servi comme contrôle tout au long de ce projet et pour comparer l'importance biologique de l'expression active de la Cx43.

Des études préalables par micro-injection ont démontré que la protéine de fusion, GFP, n'inhibe pas la communication intercellulaire et peut promouvoir des jonctions lacunaires fonctionnelles (Hunter et al., 2005; Murray et al., 2004; Contreras et al., 2003; Evans, 2002). En effet, le vecteur de la Cx43 fusionné ou non avec la GFP détient des propriétés natives concernant le trafic et le ciblage aux organelles spécifiques (Falk, 2001; Laird et al., 2001). Nos résultats en immunocytochimie (Figure 6 A, Figure 7 B et Figure 6 B) et en immunobuvardage (Figure 6 E et F) concordent avec les observations de (Evans et Martin (2002), de Laird et son équipe (2001) et de Jordan et al. (1999). Ainsi, puisque la Cx43-GFP possède les caractéristiques de la Cx43 sauvage, nous avons décidé, à des fins pratiques, d'illustrer uniquement les résultats obtenus pour les N2A transfecté avec le vecteur de la Cx43-GFP pour la suite de notre projet.

La transfection de la partie C-terminale de la Cx43 (Figure 6 G et C) dans les cellules de N2A se justifie du fait que, tout processus, de la transcription au « gating », dépend de la phosphorylation de différents sites sur cette extrémité C-terminale des connexines notamment plusieurs sérine/thréonine, protéines kinases et tyrosine kinases (Moreno et Lau, 2007 ; Laird, 2006; Stagg et Fletcher, 1990;

Meda et al., 1984). Ainsi, afin de déterminer l'importance de cette extrémité, nous avons étudié son rôle lors du processus de phosphorylation.

Plusieurs études ont déjà été exécutées (Gemel et al., 2006 ; Dang et al., 2003; Shin et al., 2001) en utilisant des transfectants similaires afin de mieux comprendre le mécanisme de phosphorylation (Hervé et al., 2007 ; Shin et al., 2001) dans d'autres lignées cellulaires. Tout comme ces auteurs l'ont démontré (Gemel et al., 2006 ; Dang et al., 2003; Shin et al., 2001), nous avons aussi observé qu'il semblerait que la CT-Cx43 existe uniquement sous sa forme non phosphorylée (NP) (Figure 6 G) puisqu'elle est tronquée. Il a été suggéré par Seki et al. (2004) que la région L2, contenant les acides aminés 119 à 144 de la Cx43, semble être nécessaire à la phosphorylation et au maintien du bon fonctionnement des pores jonctionnels. Ces chercheurs ont remarqué que la régulation de la Cx43 implique l'interaction intramoléculaire de son domaine carboxy-terminal avec la région L2 agissant en tant que récepteur (Seki et al., 2004). Leurs résultats suggèrent que la région L2 est essentiel pour le maintien de l'architecture d'un pore fonctionnel impliquant le processus de la phosphorylation (Seki et al., 2004). Cette information est consistante avec la notion que cette région pourrait opérer en tant que récepteur pour le domaine carboxy-terminal. La déletion ou l'absence de la région L2 interférerait avec la formation d'un canal jonctionnel fonctionnel (Seki et al., 2004).

Les cellules de N2A que nous avons étudiées ne contiennent que les acides aminés de 211 à 382 de la partie carboxy-terminale de la Cx43 (Figure 6 C et G). Elles ne possèdent pas la région L2 détenant les acides aminés 119 à 144 nécessaires à la phosphorylation et au maintien du bon fonctionnement des pores jonctionnels (Seki et al., 2004). Ceci expliquerait la raison pour laquelle le clone CT-Cx43 a une distribution diffuse de la Cx43 (Figure 6 C) et n'expose qu'une seule bande (non-phosphorylée) lors des expériences d'immunodétection (Figure 6 G).

Curieusement, le clone anti-sense possède le même profil de sous-localisation (ponctuelle et diffuse) (Figure 6 D) et d'expression protéique (Figure

6 H) que les clones transfectés avec le vecteur de la partie C-terminale de la connexine (Figure 6 C et G). Ces deux clones possèdent donc une sous-localisation pointillée et dispersée au sein de la cellule qui pourrait être liée au fait que, tous les deux, ne possèdent pas de site phosphorylable. D'autres recherches ont montré que le vecteur de la Cx43 anti-sense empêchait la formation de jonction lacunaire et donc de communication cellulaire (Bodi et al., 2004 ; Vander Molen et al., 1996) et que l'adhésion intercellulaire était déficiente chez certains types cellulaires (Malassiné et Cronier, 2005; Tanmahasamut et al., 2005).

Nous avons donc utilisé ces deux clones comme contrôle négatif tout au long de nos expériences pour démontrer subséquemment l'effet de différents inhibiteurs sur le processus de tumorigénicité et de cancérisation.

La caractéristique la plus fascinante des neuroblastomes est leur régression spontanée (Maris et al., 2007). En effet, la plupart des neuroblastomes de ce stade particulier présentent une régression spontanée en ganglioneuroma qui sont des tumeurs ayant une progression bénigne (Howman-Giles et al., 2007). Plusieurs chercheurs ont attribué ce phénomène soit à l'induction de la différenciation ou à l'apoptose (Edsjö et al., 2007 ; Van Noesel et Versteeg, 2004; Teitz et al., 2001 ; Ambros et al., 2001 ; Mao et al., 2000). En effet, l'hypothèse proposée postule que ces tumeurs sont généralement bloquées durant leur processus de différenciation embryonnaire par un mécanisme qui reste à élucider (Nuchtern, 2006). Il a été aussi suggéré (Edsjö et al., 2007) 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 tel que le phénomène se produisant lors de l'élimination, durant le développement embryonnaire, des neuroblastes non essentiels du système nerveux périphérique (Maris et al., 2007 ; Encinas et al., 2000 ; Guarneri et al., 2000).

Encore une fois, les jonctions lacunaires sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie au niveau des tissus et des organes (Meşe et al., 2007; Axelsen



et al., 2007; Laird, 2006 ; Chanson et al., 2005). La perte de communication cellulaire isole les cellules de stimuli externes, mais surtout des messages des cellules avoisinantes qui les maintiennent en état de différenciation. Les cellules isolées sont plus susceptibles de proliférer et subséquemment de former des tumeurs (Conklin et al., 2007 ; Jones et al., 2006 ; Sutor et Hagerty, 2005 ; Phipps et al., 1997). L'induction de la différenciation et/ou de l'apoptose a été souvent étudiée dans les lignées de neuroblastomes (Fulda, 2007; Peng et al., 2007). Il semble donc que l'exploration d'une voie qui régit le maintien de l'homéostasie cellulaire et moléculaire permettant ainsi la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose, serait judicieuse.

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 sa fonction (Leithe et al., 2006). L'implication des jonctions lacunaires dans l'induction de la différenciation a été rapportée par plusieurs groupes de recherche (Moreno et Lau, 2007 ; Laird, 2006 ; Carystinos et al., 2001 ; Trosko et al., 2000 ; Fromaget et al., 1992). En particulier, les jonctions lacunaires se sont révélées importantes dans la régulation de la différenciation lors du développement embryonnaire et cela même avant la formation des synapses dans le système nerveux (Pahujaa et al., 2007 ; Chanson et al., 2007 ; Solan et Lampe, 2005 ; Lo, 1996 ; Bruzzone et al., 1996). En effet, plusieurs composés, tels que l'AMPc et la PKC sont impliqués à la fois dans la différenciation et dans la formation de jonctions lacunaires, les deux processus étant liés (Hervé et al., 2007 ; Redig et Plataniias, 2007 ; Ouyang et al., 2005 ; Marunaka et al., 2003 ; Schwartz, 2001 ; Syin et al., 2001).

Dans le cadre de ce projet, nous avons exploré des mécanismes d'action de certains régulateurs des voies de signalisation, entre autres, la PKA et la PKC, afin d'élucider les voies nécessaires au contrôle du couplage jonctionnel et à la régulation des phénomènes qui leur sont associées (prolifération, différenciation,

etc.). Notre approche consistait à tester l'effet de plusieurs régulateurs des différentes voies métaboliques, dans les cellules de 1) IMR32 et de 2) N2A.

### **1) Les cellules de neuroblastome humain, les IMR32**

Il a été préalablement montré (Arnold et al., 2005) que la restauration des jonctions lacunaires dans les cellules IMR32 est possible d'abord par l'activation de la PKA engendrant a) l'augmentation de la synthèse des Cx43 puis b) un effet positif sur la sous-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique ; et c) le rétablissement de la fonction des jonctions lacunaires via l'inhibition de la PKC $\alpha$  tel que démontré dans nos travaux. Nous allons traiter ci-dessous ces deux aspects :

a) La Cx43 est présente dans toutes les souches embryonnaires dérivées de la crête neurale tel que démontré dans les neuroblastes (cellules souches, d'où dérivent les neuroblastomes) (Unsworth et al., 2006). Durant l'embryogénèse, les neuroblastes du système nerveux périphérique – d'où dérivent les neuroblastomes – expriment la Cx43, la Cx26 et, après la naissance, la Cx32. Le patron cinétique de l'expression de ces connexines ainsi que leurs fonctions est régulé selon le stage embryonnaire (Laird, 2006 ; Rozental et al., 1998 ; Bruzzone et al., 1996). Le patron d'expression varie durant le développement normal du système nerveux périphérique (Otmani et al., 2007 ; Ara et DeClerck, 2006).

En effet, dès la naissance, la Cx43 disparaît et devient absente dans les cellules neuronales adultes du système nerveux périphérique pour être remplacée par la Cx32 (dans les neurones de souris) (Leung et al., 2002). Ainsi, elle est exprimée au début du développement embryonnaire où elle permet la communication cellulaire à travers les jonctions lacunaires avant la formation des synapses (McAllister, 2007).

Les cellules de neuroblastomes humain IMR32 présentent une déficience en communication jonctionnelle (Arnold et al., 2005) (Figure 15 A et B) mais expriment constitutivement la Cx43, qui est caractéristique de l'état embryonnaire

de ces neurones (Figure 14 A) (Mao et al., 2000). Les cellules d'IMR32 que nous et d'autres auteurs ont étudié (Higashi et al., 2007 ; Arnold et al. 2005, Hiyama et al., 2004) nous laissent à croire qu'elles sont probablement bloquées au cours de leurs développements embryonnaires et n'ont pas progressé dans leur différenciation puisqu'elles expriment encore la Cx43 (Figure 15 A et B).

Les études d'immunolocalisation nous ont montré une localisation aberrante de la Cx43 au niveau cytoplasmique (Figure 15 B et 16 B). 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 et plus particulièrement au niveau péri-nucléaire séquestrée dans le Réticulum Endoplasmique ou encore dans l'appareil de Golgi. Ainsi, les cellules présentent une perméabilité cellulaire très réduite comme démontré dans la Figure 16 C, ce qui confirme les travaux antérieurs (Arnold et al., 2005). Ceci est caractéristique des cellules transformées qui ont perdu le mécanisme de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Dang et al., 2003 ; Zeng et al., 2002). Il est aussi plausible de penser que cette localisation anormale de la Cx43 serait liée à un mécanisme de maturation de l'expression tel que rapporté dans des cas similaires par Arnold et al. (2005). Cette même localisation aberrante des Cxs et l'altération des jonctions lacunaires a été confirmée dans une autre lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (Condorelli et al., 2003 ; 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 ; Hossain et al., 1999; Noguchi et al., 1999)

Nous avons confirmé les résultats préalables démontrant que le traitement des cellules avec une forme perméable de l'AMPc augmentait la synthèse des connexines (Figure 14 B et C) et leur transfert à la membrane plasmique (Arnold et al., 2005) (Figure 15 D et 16 E). Néanmoins, les canaux ainsi formés n'étaient pas fonctionnels (Figure 16 F). Dans ce cas précis, la restauration de la fonctionnalité nécessite une seconde étape comprenant l'inhibition spécifique de la PKC alpha (Figure 16 H et I).

Comme nous l'avons déjà indiqué dans notre revue bibliographique, un analogue perméable de l'AMPC, le 8-Br-AMPC, est reconnu comme modulateur des protéines clefs du cycle cellulaire à travers la régulation de l'expression des cyclines et des kinase CDKs (Solan et Lampe, 2005; Shah et al., 2002 ; Niles et al., 2000 ; Kato et al., 1999). 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 (Urschel et al., 2006 ; Kim et al., 2000a ; 2000b). Il semblerait donc que, dans les IMR32, l'activation de la PKA influe l'unité régulatrice RII puisque la prolifération cellulaire est inhibée par le traitement.

Les résultats de la Figure 14 montrent que l'induction de la différenciation par le 8-Br-AMPC engendrent une augmentation de l'expression de la Cx43 dans sa forme non phosphorylée (Figure 14 C) et ses formes phosphorylées P1 et P2 (Figure 14 B et C) durant la progression vers la différenciation. Nous avons aussi remarqué que davantage de connexines étaient exprimées à la surface membranaire (Figure 15 D et 16 E).

À titre comparatif, d'autres recherches suggèrent que la hausse de phosphorylation pourrait se comparer à une augmentation de la communication jonctionnelle (Moreno et Lau, 2007 ; Pitot et al., 1999 et Ruch et al.; 1993). Cette augmentation est probablement due à une régulation positive du niveau d'expression de la PKA puisqu'elle est observée en réponse à l'expression des cellules au 8-Br-AMPC (Arnold et al., 2005 ; TenBroek et al., 2001) (Figure 14 B et C). 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., 2000). Ces résultats ont été confirmés par Carystinos et al. (2001) dans un modèle où les auteurs ont examiné l'effet de dibutyryl- AMP cyclique (db-AMPC) et all-trans-retinoic acid (tRA) sur la Cx43

et les jonctions lacunaires des cellules IMR32. Ils ont remarqué qu'une exposition à db-AMPC engendrait une hausse de la communication jonctionnelle suite à une hausse de la phosphorylation ainsi que de l'expression de la Cx43, ce que nous avons confirmé.

Après avoir démontré que le traitement des cellules IMR32 par le 8-Br-AMPC induit une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 15 E et 16 D), nous avons vérifié si cette limitation de division cellulaire s'accompagne de la différenciation morphologique.

Les cellules traitées avec le 8-Br-AMPC ont une différenciation morphologique plus avancée s'associant à une émission de neurites et à l'apparition d'un phénotype neuronal après 48 heures (Figure 15 C et 16 D). En effet, la morphologie étoilée et la présence de neurites assurant la connexion des cellules apportent une preuve de la différenciation morphologique des cellules de neuroblastomes IMR32 en neurones tel que rapporté (McAllister, 2007 ; Sommer, 2006). Cette émission des neurites est un phénomène réversible (Chenwei, 2006) tant que les cellules n'ont pas définitivement quitté le cycle de division cellulaire (Gomez et al., 1998). Notre modèle expérimental se compare avec les résultats d'autres études qui ont montré que le 8-Br-AMPC provoque une réorganisation du cytosquelette (Kheifets et Mochly-Rosen, 2007; Higashi et Chen, 2004 ; Chen et al., 2003) dans plusieurs lignées cellulaires telles que les fibroblastes de souris, les cellules leucémique humaines et les cellules issues des lignées de neuroblastome humain SH-SY5Y, SK-NSH et NG108-15 (Girgert et al., 2000 Chen et al., 2003 ; Galderisi et al., 1999; Mena et al., 1995). Dans les cellules neurales, le 8-Br-AMPC exerce un contrôle sur l'initiation de neurites (Mena et al., 1995). Dans les cellules PC-12, le traitement par le 8-Br-AMPC induit l'initiation de l'émission des neurites, impliquant une réorganisation du cytosquelette qui est indépendant de la synthèse de l'ARN et de la synthèse de nouvelles protéines (Kheifets et Mochly-Rosen, 2007; Higashi et Chen, 2004 ; Carter 2000).

C'est un fait connu que la progression de la différenciation cellulaire s'accompagne d'une diminution de la prolifération jusqu'à l'arrêt complet associé à la différenciation terminale.

b) Les travaux de Zeidman et al. (1999a et 1999b) montrent que la suppression de la croissance par la PKC est due à l'inhibition des isoformes classiques et particulièrement celle de la PKC alpha et Beta (Redig et Platanias, 2007). Le mécanisme d'action de ces isoformes de PKC sur la prolifération reste encore inconnu. Toutefois, au cours de notre travail nous avons montré le déclin de la prolifération, induit par les inhibiteurs des PKC : le BIS et le Go6979, confirmant les résultats de Zeidman. Nous avons aussi confirmé des résultats précédents (Arnold et al., 2005) en observant que l'activation de la PKA induit à une re-localisation de la Cx43 (Figure 16 H) à la membrane puis l'inhibition spécifique de l'isoforme alpha l'inhibition de la prolifération cellulaire reliée et une restauration de la perméabilité des canaux jonctionnels (Figure 16 I). Un lien entre l'activation de la PKA et l'inhibition de certaines formes de PKC est ainsi démontré à la fois dans le contrôle de la croissance, la restauration de fonction des canaux jonctionnels et le début de la différenciation dans les neuroblastomes humains.

Les recherches présentées dans le cadre de ce mémoire constituent donc, à différents niveaux, une contribution expérimentale et théorique à l'identification des diverses voies de signalisation impliquées dans la modulation des jonctions lacunaires dans les cellules de neuroblastomes humains et murins.

Pour ce faire, il est important de déterminer si ces mêmes mécanismes (étudiés ci-haut), régulant la fonction des jonctions dans les IMR32, restaurent un phénotype similaire dans les N2A.

## **2) Les cellules de neuroblastome murin, les N2A**

Chez les neuroblastomes, nous avons choisi le même analogue perméable de l'AMPC, le 8-Br-AMPC (Arnold et al., 2005; Schwartz et al., 2001; Bevans et

al., 1999; Skalhegg et al., 1997; Butt et al., 1996; Burghardt et al., 1995), reconnu pour sa capacité d'activer la PKA (Howman-Giles et al., 2007).

L'étude du 8-Br-AMPC sur l'induction de la différenciation des cellules de neuroblastomes N2A a montré un effet synergique avec la régulation négative de la croissance cellulaire (Figure 7 E). Ce phénomène s'explique par une activation de l'arrêt de la prolifération ce qui est confirmé dans nos travaux (Figure 7 E).

Après avoir démontré que le traitement des cellules N2A par le 8-Br-AMPC induit une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 7 E), nous avons vérifié si cette limitation de division cellulaire s'accompagne d'effets analogues sur la différenciation morphologique.

Les cellules traitées avec le 8-Br-AMPC montrent une différenciation morphologique peu prononcée après un traitement de 48 heures (Figure 7 C) comparé aux cellules non traitées (Figure 7 A). Ainsi, contrairement à nos attentes sur une période de 48 heures d'exposition, ce composé ne semblerait pas engendrer la différenciation morphologique des cellules de neuroblastomes N2A.

L'analyse par immunobuvardage de la Cx43 d'un extrait cellulaire de N2A a démontré que ces cellules expriment majoritairement la Cx43 sous sa forme phosphorylée P2 (Figure 8 A) plutôt que sous sa forme non-phosphorylée (NP). Les travaux de Van Veen et de son équipe (2006) corroborent nos observations.

Suite à un traitement au 8-Br-AMPC, une régulation positive (d'environ deux fois) de l'expression de l'isoforme NP de la Cx43 a été visualisée par immunobuvardage (Figure 8 B); l'intensité de la bande P2 étant toujours supérieure à celle de la bande NP (Figure 8 C). Ceci semble nous indiquer que cet analogue de l'AMPC engendre une déphosphorylation de la Cx43 favorisant sa forme native (NP). Dans des travaux similaires (Lau, 2005), une déphosphorylation est généralement associée à une inhibition métabolique et par un manqué d'oxygène au sein du cerveau (*in vivo*) et *in vitro*. (Yamasaki et al., 1999; Wygoda et al., 1998; Ruch et al., 1993, Meda et al., 1987).

La sous-localisation de la Cx43 de ces cellules N2A semble être plus ou moins dispersée mais plus présente hors du noyau (Figure 7 D). Des expériences préalables en immunomarquage (« immunolabeling ») d'astrocytes ont démontré que la sous-localisation des formes non phosphorylées de la Cx43 était diffuse dans le Golgi et dans le Réticulum-Endoplasmique (Trosko et al., 2001). Ainsi, la déphosphorylation de la Cx43 dans les culture d'astrocyte est associée avec une réduction de la communication jonctionnelle (Ruch et al., 1993) et à une inhibition métabolique d'ATP intracellulaire empêchant la phosphorylation de la Cx43 (Yamasaki et al., 1999). De plus, une élévation de  $[Ca^{2+}]_i$  peut aussi activer la protéine  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dépendente phosphatase, la calcineurine, engendrant une déphosphorylation protéique (Pitot et al., 1999 et Ruch et al., 1993). Il nous semble plausible de penser que la phosphorylation joue un rôle circonstanciel dans différentes situations liées à l'état de différenciation cellulaire dépendant des lignée et de leur niveau d'activité cellulaire ; ce qui a été aussi soulevé par Fulda (2007), Peng et al. (2007) et Yang et al. (2003).

Afin d'étudier l'effet combiné de l'inhibition de PKC avec l'activation de la PKA, nous avons étudié les différents isoformes des PKC dans les N2A :

Tel que cité dans la revue bibliographique, les protéines kinases C sont, elles aussi, impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques de la cellule en participant aux événements de transduction de signaux en réponse aux stimulus hormonaux, neuronaux ou encore aux facteurs de croissance des processus liés aux jonctions lacunaires (Shindo et al., 2001). L'activation de ces protéines engendre la phosphorylation des connexines et permet l'ouverture de voies conduisant à l'apoptose, à la différenciation ou à la prolifération cellulaire suivant l'isoforme activée ou inhibée (Carter, 2000). Elle est, de ce fait, une cible thérapeutique intéressante dans le cas de cancers, de syndromes inflammatoires, de désordres du système immunitaire ou du système nerveux central ou de dysfonctionnements cardiovasculaires (Toker, 1998).



Nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier la distribution des différentes isoformes prédominantes de PKC dans les tissus cancéreux chez 10 patients atteint de neuroblastome (Figure 9) (Children Oncology Group, Children Hospital Philadelphia, États-Unis). Les isoformes appartenant à la catégorie des cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ) se trouvaient de façon majoritaire dans les biopsies ainsi que dans notre modèle expérimental utilisé (les cellules de N2A) qui expriment ces mêmes isoformes constitutivement avant transfection (Figure 10) (Children Oncology Group, Children Hospital, Philadelphie, États-Unis. D'après Zeidman et al (1999a et 1999b), les cellules IMR32 expriment-elles aussi, les PKC Alpha, Béta et Mu entre autre. D'autres cellules cancéreuses, telles que les cellules cancéreuses du sein, MDA MB (Ali et al., 2005) ainsi que celles du poumon, A549, H460 et H661 (Niermann et al., 2007) démontrent , elles aussi, une surexpression de ces PKC.

Afin d'étudier l'implication des PKCs dans la régulation des mécanismes transductionnels des jonctions lacunaires, nous avons évalué différents inhibiteurs de PKC montrant différents degrés de spécificité. Les inhibiteurs utilisés sont la Bisindolylmaléimide (BIS), le Go6976 et Gli005 (Gli), que nous allons analyser séparément dans les paragraphes suivants.

Le BIS est un inhibiteur de la PKC et est utilisé dans le but d'étudier l'effet de l'inhibition spécifique des kinases impliquées (Anderson et al., 2007). Suite à l'utilisation de BIS, dans les conditions décrites dans la section 2.1.3 de Matériel et Méthode, nous avons observé l'apparition d'une morphologie atypique marquée par la formation de petites vacuoles (Figure 11 C versus Figure 11 A) ainsi que la diminution de la croissance cellulaire (Figure 12) et une dispersion plus prononcée de la Cx43 au sein de la cellule (Figure 11 D versus Figure 11 B). Cet effet du BIS se compare avec celui rapporté par Hanauske et al. (2004) ainsi que Lahn et al., (2004) qui ont aussi observé que les cellules tumorales sont plus susceptibles à un arrêt de la croissance et à l'apoptose.

Le Go6976 est un inhibiteur qui montre une bonne sélectivité pour les PKC et permet une discrimination entre les isoformes conventionnelles (cPKC) et les nouvelles (nPKC). En effet, le Go6976 inhibe de façon spécifique les isoformes de la PKC Alpha, Beta et Mu. L'analyse des résultats des figures (Figure 11 E et F), suggère que les cPKC semblent être indispensables à la survie cellulaire des N2A ou des modèles similaires (Mackay et al., 2007; Mackay et Twelves, 2007; Bright et Mochly-Rosen, 2005). Ceci pourrait alors expliquer la raison pour laquelle ces isoformes sont beaucoup plus exprimées constitutivement que les autres au sein des cellules de N2A (Figure 10). De plus, les résultats de prolifération cellulaire (Figure 12) démontrent une limitation de la croissance chez les cellules N2A traitées par le Go6976. Un même phénomène n'est pas relié à l'apoptose mais plutôt à un ralentissement des divisions cellulaires d'après les travaux de Wu et al. (2007).

Avec l'inhibition de la PKC $\alpha$ , nous avons remarqué une dispersion plus prononcée de la sous-localisation des Cxs (Figure 13 B) comparé aux cellules non traitées (Figure 13 A). Toutefois, en combinant ce traitement avec l'activation de la PKA, nous avons observé une morphologie plus allongée des cellules N2A (Figure 13 C) ainsi qu'une répartition quasi cytoplasmique de la Cx43 (Figure 13 D,E et F).

Ces observations démontrent l'implication de l'isoforme alpha de la PKC dans la modulation de la prolifération cellulaire comme cela a été démontré pour d'autres isoformes de PKC (Mackay et Twelves, 2007; Jao et al., 2001; Mandil et al., 2001; Wagner et al., 2001 ; Dempsey et al., 2000) Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que la re-localisation de la Cx43 sur la membrane plasmique ainsi que l'ouverture des canaux jonctionnels sont conditionnés par l'inhibition de la PKC alpha et par l'activation de la PKA dans la lignée cellulaire humaine de IMR32 et peut-être dans la lignée cellulaire murine de N2A.

L'ensemble de nos résultats (Figure 16) montre que la différenciation (Figure 16 G) va de pair avec le rétablissement du couple jonctionnel dans les cellules IMR32 (Figure 16 I). En effet, notre étude de transfection du gène de la Cx43 dans les cellules de neuroblastome de souris N2A a montré que la présence de la Cx43 dans les cellules N2A n'est pas suffisante (Figure 16 A), 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 du 8-Br-AMPC et du Gli (Figure 16 D, E, F). Ceci confirme, ce que nous avons constaté chez les cellules IMR32, où l'expression de la Cx43 à elle seule ne permet pas la diminution de la croissance cellulaire.

Il est possible 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 l'activation de la PKC simultanément l'inhibition de l'isoforme alpha de la PKC.

L'identification des kinases clefs capables d'induire rapidement le transfert de la Cx43 du noyau vers la membrane serait un atout pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire dans la pathologie des neuroblastomes.

## **5. CONCLUSION**

L'étude de la communication cellulaire, et des mécanismes biochimiques impliqués, a été souvent rendue possible par l'étude des anomalies des cancers humains et surtout expérimentaux. La communication intercellulaire est un point critique du développement embryonnaire, de la différenciation tissulaire, et des réponses aux agressions physiques ou infectieuses. Les observations précédentes soulignent l'intérêt d'envisager des moyens thérapeutiques permettant, soit d'agir de façon ciblée sur les jonctions lacunaires, soit de profiter de leur présence pour améliorer l'efficacité de traitements pharmacologiques ou génétiques.

A ce jour, 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 compris. De même, nous savons encore peu de choses sur les rapports hiérarchiques qui existent entre les communications jonctionnelles et les nombreux autres mécanismes qui coordonnent le fonctionnement des systèmes pluricellulaires.

Tel que nous avons remarqué lors de nos expériences, les observations récentes réalisées sur des animaux transgéniques et dans certaines maladies humaines suggèrent cependant déjà qu'une synthèse adéquate de connexines et du couplage jonctionnel est fondamentale, sinon vitale, et pourrait, lorsqu'elle est perturbée, contribuer à la pathogénie de dysfonctionnements importants.

En effet, les observations réalisées sur les neuroblastomes suggèrent qu'une localisation adéquate des connexines est nécessaire pour l'obtention de l'homéostasie cellulaire résultant du rétablissement des jonctions lacunaires. Cette étude a permis d'orienter les recherches destinées à élucider des mécanismes qui régulent les jonctions lacunaires afin de pouvoir cibler les voies métaboliques qui conduisant au contrôle de la prolifération des cellules de neuroblastome via les communications intercellulaires.

Ces considérations soulignent l'intérêt de reconsidérer un certain nombre de situations cliniques, dont la pathogénie est encore peu comprise, sous l'angle d'une désorganisation du réseau de communications cellulaires normales. Elles

lancent également le défi d'élaborer des stratégies thérapeutiques utilisant la synthèse des connexines et les communications jonctionnelles qu'elles permettent, pour agir sélectivement sur certaines populations cellulaires. Des essais encourageants en oncologie et en thérapie génique permettent d'envisager qu'il s'agit là d'une possibilité réalisable dans un avenir, espérons, pas trop éloigné.

## **6. LISTE DES RÉFÉRENCES**

- About, I.; Proust, J. P.; Raffo, S.; Mitsiadis, T. A.; Franquin, J. C. (2002). *In vivo* and *in vitro* expression of connexin 43 in human teeth. *Connective Tissue Research*. 43: 232–237.
- Ali, MB.; Hahn, E.J.; Paek, K.Y. (2005). Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 213–223.
- Allagnat, F.; Krattinger, N.; Nicod, P.; Meda, P.; Haefliger, J.A. (2005). Gap functions and diseases. *Revue Medical de la Suisse*. 17: 1126–1130.
- Anderson, P.W.; McGill, J.B.; Tuttle, K.R. (2007). Protein kinase C beta inhibition: the promise for treatment of diabetic nephropathy. *Current Opinion Nephrology and Hypertension*. 5: 397–402.
- Ara, T.; DeClerck, Y.A. (2006). Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Review*. 4: 645–657.
- Araya, R.; Eckardt, D.; Riquelme, M. A.; Willecke, K.; Saez, J. C. (2003). Presence and importance of connexin43 during myogenesis. *Cell Communication and Adhesion*. 10: 451–456.
- Arensbak, B.; Mikkelsen, H. B.; Gustafsson, F.; Christensen, T.; Holstein-Rathlou, N. H. (2001). Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochem. Cell Biology*. 115: 479–487.
- Arnold, J. M.; Phipps, M. W.; Chen, J.; Phipps, J. (2005). Cellular Sub-localization of Cx43 and the Establishment of Functional Coupling in IMR-32 Neuroblastoma Cells. *Molecular Carcinogenesis*. 42: 159–169.
- Axelsen, L.N.; Haugan, K.; Stahlhut, M.; Kjølbye, A.L.; Hennan, J.K.; Holstein-Rathlou, N.H.; Petersen, J.S.; Nielsen, M.S. (2007). Increasing gap junctional coupling: a tool for dissecting the role of gap junctions. *Journal of Membrane Biology*. 1: 23–35.
- Azzi, A.; Boscoboikik, D.; Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *European Journal of Biochemistry*. 208: 547–557.
- Bannerman, P.; Nicholas, W.; Puhalla, S.; Oliver, T.; Berman, M.; Pleasure, D. (2000). Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *Journal of Neuroscience Research*. 61: 605–615.
- Bao, X.; Altenberg, T.A.; Reuss, L. (2004). Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *American Journal of Cell Physiology*. 28: 647–654.
- Barbe, M.T.; Monyer, H.; Bruzzone, R. (2006). Cell-Cell Communication Beyond Connexins: The Pannexin Channels Physiology. *Physiology*. 21: 103–114.



- Barry, H. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems. *American Journal of Medicine*. 91: 145-149.
- Basu, A.; Sivaprasad, U. (2007). Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signaling*. 8: 1633-1642.
- Beby, F.; Morle, L.; Michon, L.; Edery, P.; Burillon, C.; Denis, P. (2003). The genetics of hereditary cataract. *Journal Français d'Ophtalmologie*. 4: 400-408.
- Belbaraka, L. (2002). Growth, differentiation and cell-cell coupling in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Thèse de doctorat présentée à l'Université d'Ottawa.
- Bennett, M.V.; Barrio, L.C.; Bargiello, T.A.; Spray, D.C.; Hertzberg, E.; Saez, J.C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*. 6: 305-320.
- Bennett, M.V.; Zheng, X.; Sogin, M.L. (1994). The connexins and their family tree. *Society of General Physiology*. 49: 223-233.
- Bennett, M.V.; Zukin, R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*. 4: 495-511.
- Bermudez-Fajardo, A.; Ylihärsilä, M.; Evans, W.H.; Newby, A.C.; Oviedo-Orta, E. (2007). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of physiology*. 576: 653-658.
- Berthoud, V. M.; Ledbetter M. L.; Hertzberg E.; Saez J. (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulations by a tumor-promoting phorbol ester  $Ca^{2+}$ . *European Journal of Cell biology*. 57: 40-50.
- Berthoud, V.M.; Minogue, P.J.; Laing, J.G.; Beyer, E.C. (2004). Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovascular Research*. 6: 256-267.
- Bevans, C.; Harris, A. (1999). Direct High Affinity Modulation of Connexin Channel Activity by Cyclic Nucleotides. *The journal of Biological Chemistry*. 6: 3720-3725.
- Bilchick, K.C.; Helm, R.H.; Kass, D.A. (2007). Physiology of biventricular pacing. *Current Cardiology Reports*. 5: 358-365.
- Black, C.T.; Haase, G.M. (1999). Neuroblastoma and other adrenal tumors. *In the surgery of childhood tumors*. 2:140-177.
- Bodi, E.; Hurtado, S.P.; Carvalho, M.A.; Borojevic, R.; Carvalho, A.C. (2004). Gap junctions in hematopoietic stroma control proliferation and differentiation of blood cell precursors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 4: 743-756.
- Boralevi, F.; Haftek, M.; Vabres, P.; Lepreux, S.; Goizet, C.; Leaute-Labreze, C.; Taieb, A. (2005). Hereditary mucoepithelial dysplasia: clinical, ultrastructural and genetic study of eight patients and literature. *British journal of Dermatology*. 2: 310-318.

- Bozhkova, V.P.; Rozanova, N.V. (1998). Current status of the gap junction problems and views on their role in development. *Ontogenez*. 1: 5-20.
- Bright, R.; Mochly-Rosen, D. (2005). The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke*. 12: 2781-2790.
- Britz-Cunningham, S.H.; Shah, M.M.; Zuppan, C.W.; Fletcher, W.H. (1995). Mutations of the connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *New England journal of Medicine*. 33: 133-1329.
- Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews*. 3: 203-211.
- Brodeur, G.M. (2000). Meeting summary for advances in neuroblastoma research. *Medical and Pediatric Oncology*. 35: 727-728.
- Brown, J.; O'Prey, J.; Harrison, P.R. (2003). Enhanced sensitivity of human oral tumors to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis*. 24: 171-177.
- Brushia, R.J.; Walsh, D.A. (1999). Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Frontiers in Bioscience*. 15: 618-41.
- Bruzzone, R.; White, T.W.; Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*. 15: 1-27.
- Burghardt, R.C.; Barhoumi, R.; Sewall, T.C.; Bowen, R. (1995). Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *The Journal of Membrane Biology*. 148: 243-253.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112: 195-203.
- Butt, E.; Walter, U. (1996). Cyclic nucleotides: Measurement and function. *A Practical Approach*. 1: 259-278.
- Buzhynskyy, N.; Hite, R.; Walz, E.; Scheuring, S. (2007). The supramolecular architecture of junctional microdomains in native lens membranes. *The European Molecular Biology Organization reports*. 8: 51-55.
- Campos de Carvalho, A.C.; Roy, C.; Hertzberg, E.L.; Tanowitz, H.B. (1998). Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. *Science*. 280: 304-314.
- Cascio, W.E.; Yang, H.; Muller-Borer, B.J.; Johnson, T.A. (2005). Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *Journal of Electrocardiology*. 38: 55-59.

- Castel, V.; Grau, E.; Noguera, R.; Martínez, F. (2007). Molecular biology of neuroblastoma. *Clinical Translational Oncology*. 8: 478-483.
- Castleberry, R.P. (1997). Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatric Clinics of North America*. 44: 919-937.
- Carter, C.A. (2000). Protéine kinase C as a drug target : implications for drug or diet-prevention and treatment of cancer. *Current Drug Targets*. 1: 163-183.
- Carystinos, G.D.; Alaoui-Jamali, M.A.; Phipps, J.; Yen, L.; Batist, G. (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 Chemotherapy Pharmacology*. 47: 126-132.
- Cellek, S.; Rodrigo, J.; Lobos, E.; Fernandez, P.; Serrano, J.; Moncada, S. (1999). Selective nitroergic neurodegeneration in diabetes mellitus a nitric oxide-dependent phenomenon. *British Journal of Pharmacology*. 128: 1804-1812.
- Chanson, M.; Derouette, J.P.; Roth, I.; Foglia, B.; Scerri, I.; Dudez, T.; Kwak, B.R. (2005). Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1711: 197-207.
- Chanson, M.; Fishman, G.; Hertzberg, E.; Jongsma, H.; Kwak, B.; Saez, J.; Wilders, R.; Spray, D. (1995). Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *European Journal of Physiology*. 430: 770-778.
- Chanson, M.; Kotsias, B.A.; Peracchia, C.; O'Grady, S.M. (2007). Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 4: 113-117.
- Charpentier, E.; Cancela, J.; Meda, P. (2007). Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. *Diabetologia*. 50: 2332-2341.
- Chaytor, A.T.; Evans, W.H.; Griffith, T.M. (1997). Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *The Journal of Physiology*. 503: 99-110.
- Chen, N.; Furuya, S.; Shinoda, Y.; Yumoto, M.; Ohtake, A.; Sato, K.; Doi, H.; Hashimoto, Y.; Kudo, Y.; Higashi, H. (2003). Extracellular carbohydrate-signal triggering cAMP-dependent protein kinase-dependent neuronal actin-reorganization. *Neuroscience*. 122: 985-995.
- Chen, Z.Q.; Lefebvre, D.; Bai, X.; Reaume, A.; Rossant, J.; Lye, S.J. (1995). Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin43 gene. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 3863-3868.
- Chenwei, L.; David, G.; Heidt, P.D.; Charles, F.; Burant, L.; Volkan, A.; Wicha, M.; Clarke, M.; Simeone, D. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*. 67: 1030-1037.

- Condorelli, D.F.; Trovato-Salinaro, A.; Mudò, G.; Mirone, M.B.; Belluardo, N. (2003). Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *European Journal of Neuroscience*. 18: 1807-1827.
- Conklin, C.; Huntsman, D.; Yorida, E.; Makretsov, N.; Turbin, D.; Bechberger, J.F.; Sin, W.C.; Naus, C.C. (2007). Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Cancer Letters*. 255: 284-294.
- Contreras, J.E.; Sáez, J.C.; Bukauskas, F.; Michael, V.L. (2003). Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 11388-11393.
- Cooper, C.; Solan, J.L.; Dolejsi, M.K.; Lampe, P.D. (2000). Analysis of Connexin Phosphorylation Sites. *Cardiovascular Research*. 62: 378-387.
- Crow, D.S.; Beyer, E.C.; Kobe, S.S.; Lau, A.F. (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Molecular Cell. Biology*. 10: 1754-1763.
- Cruciani, V.; Mikalsen, S.O. (2006). The vertebrate connexin family. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: 1134-1139.
- Cruciani, V.; Mikalsen, S. (2002). Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biology of the Cell*. 13: 433-443.
- Dang, X.; Doble, B.W.; Kardami, E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 242: 35-38.
- De Feijter, A.W.; Matesic, D.F.; Ruch, R.J.; Guan, X.; Chang, C.C.; Trosko, J.E. (1996). Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. *Molecular Carcinogenesis*. 16: 203-212.
- Defamie, N.; Mograbi, B.; Roger, C.; Cronier, L.; Malassine, A.; Brucker-Davis, F.; Fenichel, P.; Segretain, D.; Pointis, G. (2001). Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis*. 22: 1537-1542.
- Delaune, A.; Corbière, C.; Benjelloun, F.D.; Legrand, E.; Vannier, J.P.; Ripoll, C.; Vasse, M. (2007). Promyelocytic leukemia-nuclear body formation is an early event leading to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 9: 33-39.
- Dhein, S. (2006). Cardiac ischemia and uncoupling: gap junctions in ischemia and infarction. *Advanced Cardiology*. 42: 198-212.

- Doble, B.W.; Dang, X.; Ping, P.; Fandrich, R.R.; Nickel, B.E.; Jin, Y.; Cattini, P.A.; Elissavet, K. (2004). Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *Journal of Cell Science*. 117: 507-514.
- Dubourg, O.; Tardieu, S.; Birouk, N.; Gouider, R.; Leger, J.M.; Maisonobe, T.; Brice, A.; Bouche, P.; LeGuern, E. (2001). Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*. 124: 1958-1967.
- Duffy, H.S; Fort, A.G.; Spray, D.C. (2006). Cardiac connexins: genes to nexus. *Advanced Cardiology*. 42: 1-17.
- Dzhemileva, L.U.; Grinberg, E.R.; Khabibullin, R.M.; Khusnutdinova, E.K. (2006). Genes of connexin proteins participating in sound perception. *Vestn Otorinolaringol*. 4: 15-20.
- Eckert, R. (2002). pH gating of lens fibre connexins. *Pflügers Archiv*. 443: 843-851.
- Edsjö, A.; Holmquist, L.; Pählman, S. (2007). Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology*. 17: 248-256.
- Eiberger, J.; Degen, J.; Romualdi, A.; Deutsch, U.; Willecke, K.; Sohl, G. (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Communication and Adhesion*. 8: 163-165.
- Elcock, F.J.; Deag, E.; Roberts, R.A.; Chipman, J.K. (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. *Toxicological Sciences*. 56: 86-94.
- Elenes, S.; Martinez, A.D.; Delmar, M.; Beyer, E.C.; Moreno, A.P. (2001). Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophysical Journal*. 81: 1406-1418.
- Eghbali, B.; Kessler, J.A.; Spray, D.C. (1990). Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 1328-1331.
- Evans, H.W.; Martin, P. (2002). Gap Junctions: Structure and function (review). *Molecular Membrane Biology*. 19: 121-136.
- Evans, W.H.; Martin, P.E. (2002). Lighting up gap junction channels in a flash. *Bioessays*. 24: 876-880.
- Evan, G.I.; Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 411: 342-348.
- Evans, A.E. (1980). Staging and treatment of neuroblastoma. *Cancer*. 45: 1799-1802.

- Falk, M.M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal Cell Science*. 113: 4109-4120.
- Falk, M.M.; Lauf, U. (2001). High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells. *Microscopy Research and Technique*. 52: 251-262.
- Fishman, G.I.; Eddy, R.L.; Shows, T.B.; Rosenthal, L.; Leinwand, L.A. (1991). The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structure. *Genomics*. 10: 250-256.
- Fromaget, C.; Aoumari, A.; Gros, D. (1992). Distribution pattern of connexin 43, a gap junction protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 51: 9-20.
- Fulda, S. (2007). Inhibitor of apoptosis proteins as targets for anticancer therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 7: 1255-1264.
- Galderisi, U.; Di Bernardo, G.; Cipollaro, M.; Peluso, G.; Melone, M.A. (1999). Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *Journal of Cellular Biochemistry*. 73: 97-105.
- Gemel, J.; Lin, X.; Veenstra, R.D.; Beyer, E. (2006). N-terminal residues in Cx43 and Cx40 determine physiological properties of gap junction channels, but do not influence heteromeric assembly with each other or with Cx26. *Journal of Cell Science*. 119: 2258-2268.
- Gilula, N.B. (1997). Topology of gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 7: 2967-2975.
- Girgert, R.; Schweiser, P.; Schwable, J. (2000). Neuroblastoma: induction of differentiation (Part I). Basic science in pediatric surgery. *European Journal of Pediatric Surgery*. 10: 79-82.
- Gold, M.G.; Barford, D.; Komander, D. (2006). Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Current Opinion in Structural Biology*. 16: 693-701.
- Gomez, J.; Boutou, J.E.; Hurel, C.; Mamalaki, A.; Kentroti, A.; Vernadakis, A.; Matsas, R. (1998). Overexpression of the neuron-specific molecule BM88; in mouse neuroblastoma cells: altered responsiveness to growth factors. *Journal of Neuroscience Research*. 51: 119-128.
- Goodenough, D.A.; Goliger, J.A.; Paul, D.L. (1997). Connexins, connexons and intercellular communications. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 475-502.
- Green, D.R.; Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*. 1: 19-30.

- Greider, C.W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12: 90-92.
- Gerido, D.A.; White, T.W. (2004). Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1: 159-170.
- Griner, E.M.; Kazanietz, M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 7: 281-294.
- Gropman, A.L.; Adams, D.R. (2007). Atypical patterns of inheritance. *Seminars in Pediatric Neurology*. 14: 34-45.
- Grosfeld, J.L. (1999). Risk-based management: current concepts of treating malignant solid tumors of childhood. *The Journal of Hand Surgery*. 189: 407-419.
- Guarneri, B.; Borgia, F.; Cannavò, S.P.; Vaccaro, M.; Happle, R. (2000). Multiple familial basal cell carcinomas including a case of segmental manifestation. *Dermatology*. 200: 299-302.
- Guldenagel, M.; Sohl, G.; Plum, A.; Traub, O.; Teubner, B.; Weiler, R.; Willecke, K. (2000). Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*. 425: 93-201.
- Gutstein, D.E.; Liu, F.; Meyers, M.B.; Choo, A.; Fishman, G.I. (2003). The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *Journal of Cell Science*. 116: 875-885.
- Haass, N.K.; Smalley, K.S.; Herlyn, M. (2004). The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *Journal Molecular Histology*. 35: 309-318.
- Haefliger, J.A.; Allagnat, F.; Krattinger, N.; Martin, D.; Waeber, G.; Nicod, P.; Meda, P. (2005). Gap junctions and secretion. *Revue de Médecine Suisse*. 1: 1134-1139.
- Hanauske, A.R.; Sundell, K.; Lahn, M. (2004). The role of protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) in cancer and its modulation by the novel PKC- $\alpha$ -specific inhibitor aprinocarsen. *Current Pharmaceutical Design*. 10: 1923-1936.
- Hanna, E.A.; Umhauer, S.; Roshong, S.; Piechocki, M.P.; Fernstrom, M.J.; Fanning, J.D.; Randall J.R. (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.
- Hardie, G.; Hanks, S. (1995). The protein kinase facts book. *The Academic Press of New York*. 12: 134-176.
- Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 94: 120-143.

- Hayashi, T.; Trosko, J.E.; Hamada, K. (2001). Inhibition of gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells with transforming RNA. *FEBS Letters*. 491: 200-206.
- Hervé, J.C. (2007). Gap junction channels: from protein genes to diseases. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 94: 1-4.
- Higashi, M.; Tajiri, T.; Kinoshita, Y.; Tatsuta, K.; Souzaki, R.; Maehara, Y.; Suita, S.; Taguchi, T. (2007). High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*. 29: 551-556.
- Higashi, H.; Chen, N.H. (2004). Ganglioside/protein kinase signals triggering cytoskeletal actin reorganization. *Journal of Biological Chemistry*. 20: 49-58.
- Hirayama, S.; Bujo, H.; Yamazaki, H.; Kanaki, T.; Takahashi, K.; Kobayashi, J.; Schneider, W.J.; Saito, Y. (2000). Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 275: 365-373.
- Hiyama, E.; Hiyama, K.; Yamaoka, H.; Sueda, T.; Reynolds, C.P.; Yokoyama, T. (2004). Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatric Surgery International*. 20: 33-38.
- Hofmann, J. (2004). Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 2: 125-146.
- Hoffman, A.; Gloe, T.; Pohl, U.; Zahler, S. (2003). Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovascular Research*. 60: 421-430.
- Hogarty, G.M. (2005). Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Letters*. 228: 133-141.
- Hossain, M.Z.; Jagdale, A.B.; Ao, P.; Kazlauskas, A.; Boynton, A.L. (1999). Disruption of gap junctional communication by the platelet-derived growth factor is mediated via multiple signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 10489-10496.
- Houghton, F.D.; Barr, K.J.; Walter, G.; Gabriel, H.D.; Grümmer, R.; Traub, O.; Leese, H.J.; Winterhager, E.; Kidder, G.M. (2002). Functional Significance of Gap Junctional Coupling in Preimplantation Development. *Biology of Reproduction*. 66: 1403-1412.
- Houghton, F.D. (2005). Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction*. 129: 129-135.
- Howman-Giles, R.; Shaw, P.J.; Uren, R.F.; Chung, D.K. (2007). Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. *Seminars in Nuclear Medicine*. 37: 286-302.



- Hsiang, C.Y.; Wu, S.L.; Ho, T.Y. (2005). Morin inhibits 12-O-tetradecanophorbol-13-acetate-induced hepatocellular transformation via activator protein 1 signaling pathway and cell cycle progression. *Biological pharmacology*. 69: 1603-1611.
- Hu, G.L.; Chiang, H.; Zeng, Q.L.; Fu, Y.D. (2001). ELF Magnetic Field Inhibits Gap Junctional Intercellular Communication and Induces Hyperphosphorylation of Connexin43 in NIH3T3. *Cells Bioelectromagnetics*. 22: 568-573.
- Huettner, J.E.; Lu, A.; Qu, Y.; Wu, Y.; Kim, M.; McDonald, J.W. (2006). Gap junctions and connexon hemichannels in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 24: 1654-1667.
- Hunter, A.W.; Barker, R.J.; Zhu, C.; Robert, G. (2005). Zonula Occludens-1 Alters Connexin43 Gap Junction Size and Organization by Influencing Channel Accretion. *Nature*. 12: 5686-5698.
- Ihara, A.; Muramatsu, T.; Shimono, M. (2000). Expression of connexin 32 and 43 in developing rat submandibular salivary glands. *Archives of Oral Biology*. 45: 227-235.
- Iino, S.; Asamoto, K.; Nojyo, Y. (2001). Heterogeneous distribution of a gap junction protein, connexin43, in the gastroduodenal junction of the guinea pig. *Autonomic Neuroscience*. 93: 8-13.
- Ilvesaro, J.; Vaananen, K.; Tuukkanen, J. (2000). Bone-resorbing osteoclasts contain gap junctional connexin-43. *Journal of Bone and Mineral Research*. 15: 919-926.
- Imanaga, I.; Hai, L.; Ogawa, K.; Matsumura, K.; Mayama, T. (2004). Phosphorylation of connexin in functional regulation of the cardiac gap junction. *Experimental cardiology*. 9: 161-164.
- Irie, K.; Shimizu, K.; Sakisaka, T.; Ikeda, W.; Takai, Y. (2004). Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 11: 90-97.
- Jaken, S. (1996). Protein Kinase C isoenzymes and substrates. *Current Opinion Cell Biology*. 8: 168-173.
- Jao, H.C.; Yang, R.C.; Hsu, H.K.; Hsu, C. (2001). The decrease of PKC $\alpha$  is associated with hepatic apoptosis at early and late phases of polymicrobial sepsis. *Shock*. 15: 130-134.
- Jones, D.H.; Nakashima, T.; Sanchez, O.H.; Kozieradzki, I.; Komarova, S.V.; Sarosi, I.; Morony, S.; Rubin, E.; Sarao, R.; Hojilla, C.V.; Komnenovic, V.; Kong, Y.Y.; Schreiber, M.; Dixon, S.J.; Sims, S.M.; Khokha, R.; Wada, T.; Penninger, J.M. (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 22: 445-449.
- Johnson, L.N.; Noble, M.E.; Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinase : structural basis for regulation. *Cell*. 85: 149-158.

- Jordan, K.; Solan, J.L.; Dominguez, M.; Sia, M.; Hand, A.; Lampe, P.A.; Laird, D.W. (1999). Trafficking, assembly and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells. *Molecular Biology of the cell*. 10: 2033-2050.
- Kalvelyte, A.; Imbrasaitė, A.; Bukauskienė, A.; Verselis, V.K.; Bukauskas, F. (2003). Connexins and apoptotic transformation. *Biochemical pharmacology*. 66: 1661-1672.
- Kaneko, M.; Yang, W.; Matsumoto, Y.; Watt, F.; Funa, K. (2006). Activity of a novel PDGF beta-receptor enhancer during the cell cycle and upon differentiation of neuroblastoma. *Experimental Cell Research*. 24: 6-12.
- Kanno, Y. (1985). Modulation of cell communication and carcinogenesis. *Journal Physiology*. 35: 693-707.
- Kato, M.; Yamaguchi, T.; Tachibana, A.; Kimura, H. (2005). Differential role of an atypical protein kinase C, PKC zeta, in regulation of human eosinophil and neutrophil functions. *International Archives of Allergy and Immunology*. 137: 27-34.
- Kavasseri, G.R.; Nagarajan, R. (2006). Synchronization in Electrically Coupled Neural Networks. *Science*. 37: 64-69.
- Kelsell, D.P.; Dunlop, J.; Hodgins, M.B. (2001). Human diseases: clues to cracking the connexine code? *Trends in cell Biology*. 11: 2-6.
- Kenna, M.A.; Wu, B.L.; Cotanche, D.A.; Korf, B.; Rehm, H.L. (2001). Connexin26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. 127: 1037-1042.
- Kheifets, V.; Mochly-Rosen, D. (2007). Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *The British Journal of Pharmacology*. 55: 467-76.
- Kim, J.; Lu, J.; Quinn, P.G. (2000a). Distinct 8-Br-cAMP response element-binding protein (CREB) domains stimulate different steps in a concerted mechanism of transcription activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 11292-11296.
- Kim, K.S.; Tinti, B.; Song, J.F.; Cubells, F.; Joh, T.H. (2000b). Cyclic adenosine monophosphate inhibits quinolone alkaloid evocarpine-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemia HL-60 cells. *Pharmacological Toxicology*. 87: 1-5.
- King, T.J.; Fukushima, L.H.; Hieber, A.D.; Shimabukuro, K.A.; Sakr, W.A.; Bertram, J. S. (2000). Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis*. 21: 1097-1109.

- King, T.J.; Lampe, P.D. (2005). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 67: 54-59.
- Kishimoto, A.; Takai, Y.; Mori, T.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipids dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *Journal of Biochemical Chemistry*. 225: 2273-2276.
- Kjaer, K.W.; Hansen, L.; Eiberg, H.; Leicht, P.; Opitz, J.P.; Tommerup, N. (2004). Novel Connexin 43 (GJA1) mutation causes oculo-dento-digital dysplasia with curly hair. *American Journal of Medical Genetics*. 127: 152-157.
- Kobari, M.; Irie, J.; Takizawa, K.; Yoshihara, T.; Sobue, G. (2000). X-Linked Charcot-Marie-Tooth disease with a new mutation (Thr191Ala) in the connexin32. *Rinsho Shinkeigaku*. 40: 896-899.
- Koppen, A.; Ait-Aissa, R.; Hopman, S.; Koster, J.; Haneveld, F.; Versteeg, R.; Valentijn, L.J. (2007). Dickkopf-1 is down-regulated by MYCN and inhibits neuroblastoma cell proliferation. *Cancer Letters*. 256: 218-228.
- Kovacs, J.A.; Baker, K.A.; Altenberg, G.A.; Abagyan, R.; Yeager, M. (2007). Molecular modeling and mutagenesis of gap junction channels. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 94: 15-28.
- Koval, M.; Harleu, J.E.; Hick, E.; Steinbert, T.H. (1997). Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartments of the osteoblastic cells. *Journal of Cell Biology*. 277: 20911-20918.
- Krutovskikh, V.; Yamasaki, H. (2000). Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutation Research*. 48: 166-169.
- Kumar, M.N.; Gilul, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*. 84: 381-388.
- Komuro, T. (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology*. 576: 653-658.
- Kurata, W.E.; Lau A.F. (1994). p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src. *Oncogene*. 9: 329-335.
- Kwak, B.; Saez, J.; Wilders, R.; Chanson, M.; Fishman, G.; Hertzberg, E.L.; Spray D.C.; Jongsma, H.J. (1995). Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Journal Physiology*. 430: 770-778.
- Lahn, M.M.; Sundell, K.L.; Paterson, B.M. (2004). The role of protein kinase C-alpha in malignancies of the nervous system and implications for the clinical development of the specific PKC-alpha inhibitor aprinocarsen (Review). *Oncology Reports*. 11: 515-522.

- Laing, J.G.; Tadros, P.N.; Westphale, E.M.; Beyer, E.C. (1997). Degradation of Connexin43 Gap Junctions Involves both the Proteasome and the Lysosome. *Experimental Cell Research*. 236: 482-492.
- Laird, W.D. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*. 394: 527-543.
- Laird, W.D. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1711: 172-182.
- Laird, D.W.; Jordan, K.; Thomas, T.; Qin, H.; Fistouris, P.; Shao, Q. (2001). Comparative analysis and application of fluorescent protein-tagged connexins. *Microscopy Research and Technique*. 52: 263-272.
- Laird, W.D.; Jordan, K.; Thomas, T.; Qin, H. (1999). Deficiency of Cx43 gap junctions is an independent marker for breast tumours. *Cancer Research*. 59: 4104-4110.
- Laird, D.W. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2: 98-103.
- Lampe, P.D.; Cooper, C.D.; King, T.J.; Burt, J.M. (2006). Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *Journal of Cell Science*. 119: 3435-3442.
- Lampe, P.D.; Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 1171-1186.
- Lampe, P.D.; Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384: 205-215.
- Lampe, P.D.; TenBroeck, E.M.; Burt, J.; Kurata, W.; Johnson, R.; Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase C regulates Gap Junctional Communication. *The journal of Cell Biology*. 149: 1503-1512.
- Latour, P.; Fabreguette, A.; Ressot, C.; Blanquet-Grossard, F.; Antoine, J.C.; Calvas, P.; Chapon, F.; Corbillon, E.; Ollagnon, E.; Sturtz, F.; Boucherat, M.; Chazot, G.; Dautigny, A.; Pham-Dinh, D.; Vandenberghe, A. (1997). New mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *European Neurology*. 37: 38-42.
- Lau, A.F. (2005). c-Src: bridging the gap between phosphorylation- and acidification-induced gap junction channel closure. *Science Signaling, the Signal Transduction Knowledge Environment*. 33: 291-298.
- Lau, A.F.; Warn-Cramer, B.; Lin, R. (2000). Regulation of connexin43 by tyrosine protein kinases. *Current topics in membranes*. 49: 315-341.

- Lau, A.F.; Kurata, W.E.; Kanemitsu, M.Y.; Loo, L.W.; Warn-Cramer, B.J.; Eckhart, W.; Lampe, P.D. (1996). Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases. *Journal of Bioenergy Biomembrane*. 28: 359-368.
- Lee, P.J.; Pogwizd, S.M. (2006). Micropatterns of propagation. *Advanced Cardiology*. 42: 86-106.
- Leithe, E.; Sirnes, S.; Omori, Y.; Rivedal, E. (2006). Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 12: 225-256.
- Leung, D.S.; Unsicker, K.; Reuss, B. (2002). Expression and developmental regulation of gap junction connexins cx26, cx32, cx43 and cx45 in the rat midbrain-floor. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 20: 63-75.
- Li, S.; Beheshti, M. (2005). The radionuclide molecular imaging and therapy of neuroendocrine tumors. *Current Cancer Drug Targets*. 5: 139-148.
- Li, Z.; Thiele, C.J. (2007). Targeting Akt to increase the sensitivity of neuroblastoma to chemotherapy: lessons learned from the brain-derived neurotrophic factor/TrkB signal transduction pathway. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 11: 1611-1621.
- Lin, D.; Lobell, S.; Jewell, A.; Takemoto, D.J. (2004). Differential phosphorylation of connexin46 and connexin50 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activation of protein kinase C $\gamma$ . *Molecular Vision*. 10: 688-695.
- Lo, C.W. (1996). The role of gap junction membrane channels in development. *Journal of Bioenergy Biomembrane*. 28: 379-385.
- Lohmann, S.M. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 22: 307-312.
- Loewenstein, W.R. (1985). Regulation of cell-to-cell communication by phospholilation. *Biochemistry*. 50: 43-58.
- Loewenstein, W.R. (1980). Junctional cell-to-cell communication and growth control. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 339: 39-45.
- Lovat, P.E.; Dobson, M.; Kalcolm, A.J.; Pearson, A.D.; Redfern, C.P. (2001). Differential gene reluation by 9-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Medical and Pediatric Oncology*. 36: 135-138.
- Mackay, H.J.; Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature Reviews Cancer*. 26: 90-99.
- Mahoney, G.; Liu, S.; Menacker, M.; Wilson, M.; Hogarty, J.; Maris, M. (2006). Pediatric Horner Syndrome: Etiologies and Roles of Imaging and Urine Studies to Detect Neuroblastoma and Other Responsible Mass Lesions. *American Journal of Ophthalmology*. 142: 651-659.

- Malassiné, A.; Cronier, L. (2005). Involvement of gap junctions in placental functions and development. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1719: 117-124.
- Mao, Y.S.; Yin, H.L. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinases. *Pflügers Archiv*. 455: 5-18.
- Mao, A.J.; Bechberger, J.; Lidington, D.; Galipeau, J.; Laird, D.W.; Naus, C. (2000). Neuronal differentiation and growth control of neuro-2a cells after retroviral gene delivery of connexin43. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 34407-34414.
- Maris, J.M.; Hogarty, M.D.; Bagatell, R.; Cohn, S.L. (2007). *Neuroblastoma*. *Lancet*. 23: 2106-2120.
- Marks, F.; Furstenberger, G.; Muller-Decker, K. (2007). Tumor promotion as a target of cancer prevention. *Recent Results in Cancer Research*. 174: 37-47.
- Martin, P.E.; Blundell, G.; Ahmad, S.; Errington, R.J.; Evans, H.W. (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of Cell Science*. 114: 3845-3855.
- Marunaka, Y.; Niisato, N. (2003). H89, an inhibitor of protein kinase A (PKA), stimulates Na<sup>+</sup> transport by translocating an epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in fetal rat alveolar type II epithelium. *Biochemical Pharmacology*. 66: 1083-1089.
- Matthay, K.K. (1999). Intensification of therapy using hematopoietic stem-cell support for high-risk neuroblastoma. *Pediatric Transplant*. 3: 72-77.
- Martin, P.E.; Evans, W.H. (2004). Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovascular Research*. 62: 378-387.
- Marunaka, Y.; Eaton, D.C. (2003). Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels. *American Journal of Physiology*. 260: 1071-1084.
- Maza, J.; Mateescu, M.; Sarma J.D.; Koval, M. (2003). Differential oligomerization of endoplasmic reticulum-retained connexin43/connexin32 chimeras. *Cell Communication and Adhesion*. 10: 319-322.
- Mazereeuw-Hautier, J.; Bitoun, E.; Chevrant-Breton, J.; Man, S.Y.; Bodemer, C.; Prins, C.; Antille, C.; Saurat, J.H.; Atherton, D.; Harper, J.I.; Kelsell, D.P.; Hovnanian, A. (2007). Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: disease expression and spectrum of connexin 26 (GJB2) mutations in 14 patients. *British Journal of Dermatology*. 156: 1015-1019.
- McAllister, A.K. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annual Reviews Neuroscience*. 30: 425-450.
- Meda, P.; Perrelet, A.; Orci, L. (1984). Gap junctions and cell-to-cell coupling in endocrine glands. *Modern Cell Biology*. 3: 131-196.

- Meda, P. (1996). Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *Médecine/sciences*; 12: 909-920.
- Meda, P.; Bruzzone, R.; Chanson, M.; Bosco, D.; Orci, L. Gap junctional coupling modulates secretion of exocrine pancreas. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 4901-4904.
- Mese, G.; Richard, G.; White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *Journal Investigative Dermatology*. 127: 2516-2524.
- Mesnil, M.; Crespin, S.; Avanzo, J.L.; Zaidan-Dagli, M.L. (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1719: 125-145.
- Mezencev, R.; Kohút, A. (2004). Apoptosis, tumor phenotype and pathogenesis of malignant tumors. *Cesk Fysiol*. 53: 48-65.
- Michon, L.; Nlend, R.; Bavamian, S.; Bischoff, L.; Boucard, N.; Caille, D.; Cancela, J.; Charollais, A.; Charpantier, E.; Klee, P.; Peyrou, M.; Populaire, C.; Zulianello, L.; Meda, P. (2005). Involvement of gap junctional communication in secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*. 13: 164-169.
- Miloso, M.; Villa, D.; Crimi, M.; Galbiati, S.; Donzelli, E.; Nicolini, G.; Tredici, G. (2004). Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *Journal of Neuroscience Research*. 75: 241-252.
- Mitropoulou, G.; Roberto, B. (2003). Modulation of Perch Connexin35 Hemi-Channels by Cyclic AMP Requires a Protein Kinase A Phosphorylation Site. *Journal of Neuroscience Research*. 72: 147-157.
- Mochly-Rosen, D. (2007). Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacological Research*. 55: 467-476.
- Moon Cheil, J.P.; Otto-Bruc, A.; Baehr, W.; Palczewski, K.; Ronnett, G.V. (1996). Calcium-Sensitive Particulate Guanylyl Cyclase as a Modulator of cAMP in Olfactory Receptor Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 18: 3195-3205.
- Moorby, C.; Patel, M. (2001). Dual functions for Connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Experimental Cell Research*. 271: 238-248.
- Moory, M.; Girard, V.; Pingault, N.; Lemort, M. (2001). Connexin expression in neuroblastoma cell lines. *Human Molecular Genetics*. 10: 2783-2795.
- Moreno, A.P.; Lau, A.F. (2007). Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Progress in Biophysical and Molecular Biology*. 94: 107-119.
- Moreno, A.P. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1711: 164-171.

- Moreno, A.P.; Chanson, M.; Elenes, S.; Anumonwo, J.; Scerri, I.; Gu, H.; Taffet, S.M.; Delmar, M. (2002). Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circulation Research*. 90: 450-457.
- Murray, S.A.; Nickel, B.M.; Gay, V.L. (2004). Endocytosis of connexin protein in adrenal cells. *Endocrine Research*. 30: 647-654.
- Musil, L.S.; Goodenough, D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*. 74: 1065-1077.
- Nakamura, S.I.; Nishizuka, Y. (1994). Lipid mediators and protein kinase C for the intracellular signaling network. *Journal of Biochemistry*. 115: 1029-1034.
- Nakanishi, H.; Exton, J. (1992). Purification and characterization of the  $\zeta$  isoform of protein kinase C from bovine kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 16347-16354.
- Neijssen, J.; Pang, B.; Neefjes, J. (2007). Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 94: 207-218.
- Nemeth, L.; Maddur, S.; Puri, P. (2000). Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. *Pediatric Surgery International*. 35: 823-828.
- Neuhaus, J.; Wolburg, H.; Hermsdorf, T.; Stolzenburg, J.U.; Dorschner, W. (2002). Detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig are functionally coupled via gap junctions in situ and in cell culture. *Cell Tissue Research*. 309: 301-311.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 161-167.
- Nicolis, S.K. (2007). Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiology of Disease*. 25: 217-229.
- Niermann, K.J.; Fleischer, A.C.; Huamani, J.; Yankeelov, T.E.; Kim, D.W.; Wilson, W.D.; Hallahan, D.E. (2007). Measuring tumor perfusion in control and treated murine tumors: correlation of microbubble contrast-enhanced sonography to dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 26: 749-756.
- Niles, R.M. (2000). Vitamin A and cancer. *Nutrition*. 16: 573-576.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal*. 9: 484-496.
- Nlend, R.N.; Michon, L.; Bavamian, S.; Boucard, N.; Caille, D.; Cancela, J.; Charollais, A.; Charpantier, E.; Klee, P.; Peyrou, M.; Populaire, C.; Zulianello, L.; Meda, P.



- (2006). Connexin36 and pancreatic beta-cell functions. *Archives of Physiology & Biochemistry*. 112: 74-81.
- Noguchi, M.; Nomata, K.M.; Watanabe, J.I.; Sato, H.; Kanetake, H.; Saito Y. (1999). Disruption of gap junctional intercellular communication in human renal cancer lines. *Urology*. 53: 218-222.
- Nuchtern, J.G. (2006). Perinatal neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery*. 15: 10-16.
- Omori, Y.; Yamasaki, H. (1999). Gap junction proteins connexin32 and connexin43 partially acquire growth-suppressive function in HeLa cells by deletion of their C-terminal tails. *Carcinogenesis*. 20: 1913-1918.
- Otmami, N.; Khattab, M. (2007). Metastatic neuroblastoma to the mandible in a 3-year-old boy: a case report. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 12: 201-204.
- Ouyang, X.; Winbow, V.M.; Patel, L.S.; Burr, G.S.; Mitchell, C.K.; O'Brien, J. (2005). Protein kinase A mediates regulation of gap junctions containing connexin35 through a complex pathway. *Molecular Brain Research*. 135: 1-11.
- Oviedo-Orta, E.; Evans, W.H. (2002). Gap junctions and connexins: potential contributors to the immunological synapse. *Journal of Leukocyte Biology*. 72: 636-642.
- Oyamada, M.; Oyamada, Y.; Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1719: 6-23.
- Pahujaa, M.; Anikin, M.; Goldberg, G.S. (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: Regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Experimental Cell Research*. 12:1-6.
- Panchin, Y.V. (2005). Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative. *Journal of Experimental Biology*. 208: 1415-1419.
- Parker, P.J.; Murray-Rust, J. (2004). PKC at a glance. *Journal Cell Science*. 117: 131-132.
- Paul, D.L. (1999). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *Journal of Cell Biology*. 103: 123-134.
- Pelligrino, D.A.; Wang, Q. (1998). Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilatation. *Progress in Neurobiology*. 56: 1-18.
- Peng, X.H.; Karna, P.; O'Regan, R.M.; Liu, X.; Naithani, R.; Moriarty, R.M.; Wood, W.C.; Lee, H.Y.; Yang, L. (2007). Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin selectively induces apoptosis in breast cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 71: 101-111.

- Peracchia, C.; Wang, X.C. (1997). Connexin domains relevant to the chemical gating of gap junction channels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 3: 577-590.
- Perrini, S.; Henriksson, J.; Zierath, J.R.; Widegren, U. (2004). Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Experimental Biology*. 53: 21-24.
- Phipps, M.; Darozewski, J.; Phipps, J. (1997). How the Neighborhood Coherence Principle (NCP) Can Give Rise to Tissue Homeostasis: a Cellular Automaton Approach. *Journal of Theoretical Biology*. 185: 475-485.
- Phipps, M.; Phipps, J.; Whitfield, J.F.; Ally, A.; Narang, R.L. A (1990). Carcinogenic implications of the neighbourhood coherence principle (NCP). *Medical Hypothesis*. 31: 289-301.
- Pitot, H.C.; Dragan Y.P. (1999). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB Journal*. 5: 2280-2286.
- Podar, K.; Raab, M.S.; Chauhan, D.; Anderson, K.C. (2007). The therapeutic role of targeting protein kinase C in solid and hematologic malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 8: 8797-8804.
- Poggi, A.; Zocchi, M.R. (2006). Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 54: 323-333.
- Pointis, G.; Segretain, D. (2005). Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 1: 19-25.
- Pointis, G.; Fiorini, C.; Defamie, N.; Segretain, D. (2005). Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1719: 102-116.
- Postma, F.R.; Hengeveld, T.; Albas, J.; Giepmas, B.N.G.; Zondag Gerben, C.M.; Jalink, K.; Moolenaar Wouter, H. (1998). Acute loss of Cell-Cell Communication Caused by G Protein-coupled Receptors: A critical Role for c-Src. *The Journal of Cell Biology*. 140: 1199-1209.
- Puisieux, A.; Valsesia-Wittmann, S.; Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *British Journal of Cancer*. 94: 13-17.
- Ren, P.; Mehta, P.P.; Ruch, R.J. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32 liver cells: Cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*. 19: 169-175.
- Redig, A.J.; Platanius, L.C. (2007). The protein kinase C (PKC) family of proteins in cytokine signaling in hematopoiesis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 8: 623-636.
- Reddy, C.S. (2005). Alterations in protein kinase A signalling and cleft palate: a review. *Human and Experimental Toxicology*. 24: 235-242.

- Riley, R.D.; Heney, D.; Jones, D.R.; Sutton, A.J.; Lambert P.C.; Abrams, K.R.; Young, B.; Wailoo, A.J.; Burchill, S.A. (2004). A Systematic Review of Molecular and Biological Tumor Markers in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*. 10: 4-14.
- Rivedal, E.; Opsahl, H. (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-White, A.; Stratakis, C.A. (2002). Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 968: 256-270.
- Roscoe, W.; Veitch, G.; Gong, X.; Pellegrino, E.; Bai, D.; McLachlan, E.; Shao, Q.; Kidder, G.M.; Laird, D.W. (2005). Oculodentodigital Dysplasia-causing Connexin43 Mutants Are Non-functional and Exhibit Dominant Effects on Wild-type Connexin43. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 11458-11466.
- Rozental, R.; Morales, M.; Mehler, M.F.; Urban, M.; Kremer, M.; Dermietzel, R.; Kessler, J.A.; Spray, D.C. (1998). Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Journal of Neuroscience*. 18: 1753-1762.
- Ruch, R.J.; Madhukar, B.V.; Trosko, J.E.; Klaunig, J.E. (1993). Reversal of *ras*-induced inhibition of gap junctional intercellular communication, transformation, and tumorigenesis by lovastatin. *Molecular Carcinogenesis*. 7: 50-59.
- Sáez, J.C.; Spray, D.C.; Naim, A.C.; Hertzberg, E.L.; Greengard, P.; Bennett, M.V.L. (1986). cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83: 2473-2477.
- Salameh, A. (2006). Life cycle of connexins: regulation of connexin synthesis and degradation. *Advanced Cardiology*. 43: 70-78.
- Sano, H.; Bonadio, J.; Gerbing R.B.; London, W.B; Matthay, K.; Lukens, J.; Shimada, H. (2006). International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *The European Journal of Cancer*. 42: 1113-1119.
- Sapan, C.V.; Lundblad, R.L.; Price, N.C. (1990). Colorimetric protein assay techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1: 99-108.
- Schneeberger, E.E.; Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 286: 1213-1228.
- Schwartz, J.H. (2001). The many dimensions of cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24: 13482-13484.

- Segretain, D.; Falk, M.M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1662: 3-21.
- Seki, K.; Komuro, T. (2002). Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anatomy Embryology*. 206: 57-65.
- Seki, A.; Coombs, W.; Taffet, S.M.; Delmar, M. (2004). Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm*. 2: 227-233.
- Severs, N.J.; Dupont, E.; Thomas, N.; Kaba, R.; Rothery, S.; Jain, R.; Sharpey, K.; Fry, C.H. (2006). Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. *Advanced Cardiology*. 42: 228-242.
- Shah, M.M.; Martinez, A.M.; Fletcher, W.H. (2002). The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: *in vivo* and *in vitro* studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 238: 57-68.
- Shibata, Y.; Kumai, M.; Nishii, K.; Nakamura, K. (2001). Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Medical Electron Microscopy*. 4: 65-72.
- Shiels, A.D.; Mackay, A.; Ionides, A.; Berry, V.; Moore, A.; Bhattacharya, S. (1998). A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *The American Journal of Human Genetics*. 62: 526-532.
- Shin, J.L.; Solan, J.L.; Lampe, P.D. (2001). The regulatory role of the C-terminal domain of connexin43. *Cell Communication and Adhesion*. 8: 271-275.
- Shindo, M.; Irie, K.; Nakahara, A.; Ohigashi, H.; Konishi, H.; Kikkawa, U.; Fukuda, H.; Wender, P.A. (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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 8: 2073-2081.
- Signorelli, P.; Luberto, C.; Hannun, A. (2001). Ceramide inhibition of NF- $\kappa$ B activation involves reverse translocation of classical protein kinase C (PKC) isoenzymes: requirement for kinase activity and carboxyl-terminal phosphorylation of PKC for the ceramide response. *The FASEB Journal*. 15: 2101-2414.
- Simon, A.M.; Goodenough, D.A.; Li, E.; Paul, D.L. (1999). Female infertility in mice lacking connexine 37. *Nature*. 385: 525-529.
- Sin, Y.T.; Gaik, J.; Frank Y.T. (2001). Molecular cloning and characterisation of a novel membrane receptor gene from the lobster *Jasus edwardsii*. *The Journal of Experimental Biology*. 204: 3369-3377.

- Singh, S.K.; Clarke, I.D.; Terasaki, M.; Bonn, V.E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P.B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research*. 63: 5821-5828.
- Skalhegg, B.S.; Tasken, K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway, differential expression, regulation, and sub-cellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience*. 2: 331-342.
- Skerrett, I.M.; Aronowitz, J.; Shin, J.H.; Cymes, G.; Kasperek, E.; Cao, F.L.; Nicholson, B.J. (2002). Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junction channel. *Journal of Cell Biology*. 159: 349-360.
- Sliwińska-Kowalska, M.; Pawelczyk, M.; Kowalski, T.J. (2006). Genetic factors in susceptibility to age- and noise-related hearing loss. *Polski merkuriusz lekarski*. 21: 384-388.
- Söhl, G. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*. 62: 228-232.
- Söhl, G.; Nielsen, P.A.; Eiberger, J.; Willecke, K. (2003). Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Communication and Adhesion*. 10: 27-36.
- Söhl, G.; Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Communication and Adhesion*. 10: 173-180.
- Solan, J.L.; Lampe, P.D. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*. 711: 154-163.
- Sosinsky, G.E.; Nicholson, B.J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochimica Biophysica Acta*. 1711: 99-125.
- Stagg, R.B.; Fletcher, W.H. (1990). The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocrine Reviews*. 11: 302-325.
- Statuto, M.; Audebet, C.; Tonoli, H.; Selmi-Ruby, S.; Rousset, B.; Munari-Silem, Y. (1997). Restoration of cell-to-cell communication in thyroid cell lines by transfection with and stable expression of the connexin-32 gene. Impact on cell proliferation and tissue-specific gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 24710-2476.
- Steel, K.P. (1998). One connexin, two diseases. *Nature Genetics*. 20: 319-320.
- Strenger, V.; Kerbl, R.; Dornbusch, H.J.; Ladenstein, R.; Ambros, P.F.; Ambros, I.M.; Urban, C. (2006). Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric Blood & Cancer*. 48: 504-509.
- Sommer, L. (2006). Growth factors regulating neural crest cell fate decisions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 589: 197-205.

- Spray, D.C.; Stern, J.H.; Harris, A.L.; Bennett, M.V. (1982). Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79: 441-445.
- Sui, G. P.; Rothery, S.; Dupont, E.; Fry, C. H.; Severs, N. J. (2002). Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU International*. 90: 118-129.
- Sutor, B.; Hagerty, T. (2005). Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochimica Biophysica Acta*. 1719: 59-68.
- Sutherland, E.W.; Robison, G.A. (1996). The role of cycli-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacological Reviews*. 18: 145-161.
- Syin, C.; Parzy, D.; Traincard, F.; Boccaccio, I.; Joshi, M.; Lin, D.; Yang, X.; Assemet, K.; Doerig, C; Langsley, G. (2001). The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks Plasmodium falciparum development in infected erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*. 268: 4842-4849.
- Tanmahasamut, P.; Sidell, N. (2005). Up-Regulation of Gap Junctional Intercellular Communication and Connexin43 Expression by Retinoic Acid in Human Endometrial Stromal Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90: 4151-4156.
- Tamagawa, T.; Kitamura, T. (1998). Molecular biology and molecular genetics in the field of otorhinolaryngology--isolation of genes responsible for deafness. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 101: 932-935.
- Taylor, E.B.; Cline, T.D.; Greenwood, L.J.; Compton, C.L.; Lamb, J.D.; Winder, W.W. (2005). AMP-activated protein kinase activity and phosphorylation of AMP-activated protein kinase in contracting muscle of sedentary and endurance-trained rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 289: 710-715.
- Teitz, T.; Lahti, J.; Kidd V. (2001). Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *Journal of Molecular Medicine*. 79: 1432-1440.
- Tekin, M.; Duman, T.; Boğuçlu, G.; Incesulu, A.; Cin, S.; Akar, N. (2003). Moderate hearing loss and pseudodominant inheritance due to L90P/35delG mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Journal of Genetic Counseling - Human Genetics*. 4: 379-386.
- TenBroek, E.M.; Lampe, P.D.; Solan, J.L.; Reynhout, J.K.; Johnson, R.G. (2001). Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *Journal of Cell Biology*. 155: 1307-1318.
- Thomas, T.; Jordan, K.; Simek, J.; Shao, Q.; Jedeszko, C.; Walton, P.; Laird, D.W. (2005). Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *Journal of Cell Science*. 118: 4451-4462.

- Thompson, R.J.; Zhou, N.; MacVicar, B.A. (2006). Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*. 312: 924-927.
- Toler, D.; Taylor, C.; Gercel, T. (2006). Loss of communication in ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 194: 27-31.
- Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Frontiers in Bioscience*. 3: 1134-1147.
- Trosko, J.E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 43-48.
- Trosko, J.E.; Chang, C.C. (2000). Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer. *Biofactors*. 12: 259-263.
- Trosko, J. E.; Ruch R. J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 3: 208-236.
- Trosko, J.E. Chang CC, Madhukar BV, Klaunig JE (1990). Chemical oncogene and growth factor inhibition of gap junction intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology*. 58: 265-278.
- Trosko, J.E.; Chang, C.C.; Upham, B.L.; Tai, M.H. (2004). Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1028: 192-201.
- Trosko, J.E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 43-48.
- Tumilowicz, J.J.; Nicholas, W.W.; Cholon, J. J.; Greene A.E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Research*. 30: 2110-2118.
- Unsworth, H. C.; Aasen, T.; McElwaine, S.; Kelsell, D. P. (2007). Tissue-specific effects of wild-type and mutant connexin 31: a role in neurite outgrowth. *Human Molecular Genetics*. 16: 165-172.
- Unsworth, N.; Engle, R.W. (2006). The nature of individual differences in working memory capacity: active maintenance in primary memory and controlled search from secondary memory. *Psychological Review*. 114: 104-132.
- Urschel, S.; Höher, T.; Schubert, T.; Alev, C.; Söhl, G.; Wörsdörfer, P.; Asahara, T.; Dermietzel, R.; Weiler, R.; Willecke, K. (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII amacrine cells. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 33163-33171.
- Van Noesel, M.M.; Versteeg, R. (2004). Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene*. 325: 1-15.

- Van Steensel, M.A. (2004). Gap junction diseases of the skin. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*. 131: 12-19.
- Van Veen, T.A.; Van Rijen, H.V.; Jongsma, H.J. (2006). Physiology of cardiovascular gap junctions. *Advanced Cardiology*. 42: 18-40.
- Vander Molen, M.A.; Rubin, C.T.; McLeod, K.J.; McCauley, L.K.; Donahue, H.J. (1996). Gap junctional intercellular communication contributes to hormonal responsiveness in osteoblastic networks. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 12165-12171.
- Vinken, M.; Vanhaecke, T.; Papeleu, P.; Snykers S, Henkens T, Rogiers V. (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signaling*. 8: 592-600.
- Viken, M.; Vandaecke, T.; Papeleu, P.; Snykers, S.; Henkens, T.; Rogiers, V. (2005). Connexins and their channels in cell growth and death. *Cellular Signaling*. 1: 592-598.
- Wall, E.; Otey, C.; Jie, Q.; Banes, A.J. (2007). Connexin 43 is localized with actin in tenocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 64: 121-130.
- Walsh, M.; German, M.; Singh, M.; Pollock, H.; Hammiche, A.; Kyrgiou, M.; Stringfellow, H.; Paraskevaidis, E.; Martin-Hirsch, P.; Martin F. (2006). IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. *Cancer Letters*. 246: 1-11.
- Wang, H.L.; Lu, Y.; Wang, Z. (2007). Function of cardiac M3 receptors. *Pharmacology*. 27: 1-11.
- Wang, H.L.; Chang, W.T.; Yeh, T.H.; Wu, T.; Chen, M.S.; Wu, C.Y. (2004). Functional analysis of connexin-32 mutants associated with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiology of Disease*. 2: 361-370.
- Wang, H.L.; Day, N.; Valcic, M.; Hsieh, K.; Serels, S.; Brink, P. R.; Christ, G. J. (2001). Intercellular communication in cultured human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*. 281: 75-88.
- Warn-Cramer, B.J.; Lampe, P.D.; Kuarata, W.E.; Kanemitsu, M.Y.; Loo, L.W.M.; Eckhart, W.; Lau, A.F. (1996). Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin 43 gap junction protein. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 9188-9196.
- Warn-Cramer, B.J.; Lau, A.F. (2004). Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1662: 81-95.
- Want, A.M.; Smith, G; Brandon, R. (2004). Diverse functions of vertebrate gap junction. *Trends in Cell Biology*. 8: 477-483.



- Wei, C.J.; Xu, X.; Lo, C.W. (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20: 811-838.
- Welch, K.O.; Marin, R.S.; Pandya, A.; Arnos, K.S. (2007). Compound heterozygosity for dominant and recessive GJB2 mutations: effect on phenotype and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*. 43: 1567-1573.
- Willecke, K.; Eiberger, J.; Degen, J.; Eckardt, D.; Romualdi, A.; Guldenagel, M.; Deutsch, U.; Sohl, G. (2002). Structural and function diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*. 383: 725-373.
- Wong, R.; Pébay, A.; Nguyen, L.T.V.; Koh, K.L.L.; Martin, F. (2004). Presence of Functional Gap Junctions in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 22: 883-889.
- Woods, W.G.; Gao, R.; Shuster, J.J.; Robison, L.; Bernstein, M.; Weitzman, S.; Bunin, G.; Levy, I.; Brossard, J.; Dougherty, G.; Tuchman, M.; Lemieux, B. (2002). Screening of Infants and Mortality Due to Neuroblastoma. *New England journal of medicine*. 346: 1041-1046.
- Wong, R.; Linh, P.; Nguyen, T.V.; Koh, L.L.; Pera, M. F. (2007). Presence of Functional Gap Junctions in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 22: 883-889.
- Wygoda, M.R.; de-Toledo, S.M.; Gooding T.; Little J.B. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiation Research*. 150: 497-504.
- Wu, T.T.; Hsieh, Y.H.; Hsieh, Y.S.; Liu, J.Y. (2007). Reduction of PKC $\alpha$  decreases cell proliferation, migration, and invasion of human malignant hepatocellular carcinoma. *Journal Cell Biochemistry*. 3 : 5980-5987.
- Xiao, N.C.; Willey, T.; Tu, B. (2007). Enzostaurin: Radiosensitization for Lung Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 69: 606-607.
- Yamasaki, H.; Naus C.C.G. (1996). Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis*. 17: 1199-1213.
- Yamasaki, H.; Krutovskikh, V. (1999). Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences*. 322: 151-159.
- Yamasaki, H.; Krutovskikh, V.; Mesnil, M.; Tanaka. T.; Zaidan-Dagli, M.L.; Omori, Y. (1999). Genetic and epigenetic changes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*. 23: 273-279.
- Yang, L.; Cao, Z.; Yan, H.; Wood, W.C. (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Research*. 63: 6815-6824.

- Yen, M.R.; Saier, M.H. (2007). Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 12: 1220-1229.
- Yotsumoto, S.; Hashiguchi, T.; Chen, X.; Ohtake, N.; Tomitaka, A.; Akamatsu, H.; Matsunaga, K.; Shiraishi, S.; Miura, H.; Adachi, J.; Kanzaki, T. (2003). Novel mutations in GJB2 encoding connexin-26 in Japanese patients with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *The British Journal of Dermatology*. 148: 649-653.
- Zeidman, R.; Löfgren, B.; Pählman, S.; Larsson, C. (1999a). PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *Journal of Cell Biology*. 145: 713-726.
- Zeidman, R.; Pettersson, L.; Sailaja, P.R.; Truedsson, E.; Fagerström, S.; Pählman, S.; Larsson, C. (1999b). Novel and classical protein kinase C isoforms have different functions in proliferation, survival and differentiation of neuroblastoma cells. *International Journal of Cancer*. 81: 494-501.
- Zeng, Q.; Hu, G.; Chiang, H.; Fu, Y.; Mao, G.; Lu, D. (2002). Abnormal shift of connexin 43 gap-junction protein induced by 50 Hz electromagnetic fields in Chinese hamster lung cells. *Journal of Biological Chemistry*. 20: 260-262.
- Zhong, G.; Mantel, P.L.; Jiang, X.; Jarry-Guichard, T.; Gros, D.; Labarrere, C.; Moreno, A.P. (2003). LacSwitch II regulation of connexin43 cDNA expression enables gap-junction single-channel analysis. *Biotechniques*. 34: 1034-1039.
- Zhu, D.; Caveney, S.; Kidder, G.M.; Naus, C.C. (1991). Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 1883-1887.