

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE
ÉCOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2012



**RÔLE DE LA CONNEXINE 43 DANS L'OSTÉOGENÈSE
ET DANS LE DÉVELOPPEMENT TUMORAL
DES SARCOMES D'EWING**

THÈSE DE DOCTORAT

Biologie – Médecine – Santé
Biologie Cellulaire et Moléculaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Julie TALBOT

Le 25 Octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Président

Mme REDINI Françoise

Directrice de recherche, INSERM, Nantes

Rapporteurs

M. MARIE Pierre
M. MESNIL Marc

Directeur de recherche, CNRS, Paris
Professeur des Universités, Poitiers

Examineurs

M. LECANDA Fernando
M. LEZOT Frédéric

Docteur en Pharmacie, Pampelune, Espagne
Chargé de recherche, INSERM, Nantes

Directeur de thèse

M. VERRECCHIA Franck

Directeur de recherche, INSERM, Nantes

Ce travail a été réalisé dans le :



**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie
des Tumeurs Osseuses Primitives
INSERM UMR 957**



Sommaire

ABREVIATIONS.....

Introduction Générale

I. LE TISSU OSSEUX	1
I.1. L'organisation macroscopique du tissu osseux	1
<i>I.1.1. L'os cortical</i>	2
<i>I.1.2. L'os trabéculaire</i>	3
I.2. L'organisation microscopique du tissu osseux	3
<i>I.2.1. La matrice extracellulaire</i>	3
I.2.2. L'ostéoblaste	5
<i>a) La différenciation ostéoblastique</i>	5
<i>b) La formation osseuse</i>	7
I.2.3. L'ostéoclaste	10
I.3. Le remodelage osseux	12
II. LE SARCOMES D'EWING	15
II.1. Les tumeurs osseuses primitives	15
II.2. Le sarcome d'Ewing	15
II.2.1. Épidémiologie	15

II.2.2. Étiologie	16
II.2.3. Origine de la tumeur	16
a) Origine neuroectodermique	17
b) Origine mésodermique	17
II.2.4. Diagnostic	18
a) Tableau clinique	18
b) Caractéristiques cellulaires	19
II.2.5. Le gène de fusion EWS-FLI1	19
a) Le gène EWS	19
b) Le gène FLI1	19
c) Le gène de fusion EWS-FLI1	20
d) Les cibles d'EWS-FLI1	20
II.2.6. Les traitements actuels	21
a) Traitement des sarcomes d'Ewing localisés	22
b) Traitement des sarcomes d'Ewing métastatiques ou récidivants	22
c) Protocole Euro-EWING 99	22
d) Limites des traitements actuels	23
II.2.7. Nouvelles approches thérapeutiques en cours d'étude	23
a) Inhibition d'EWS-FLI1	23
b) Inhibition de la voie de l'IGF-1	24
c) Autres voies d'étude	24
III. LES JONCTIONS COMMUNICANTES	26
III.1. La découverte des jonctions communicantes	26
III.2. La structure des jonctions communicantes	27
III.3. Les connexines	28
III.3.1. Les gènes des connexines	28
III.3.2. La topologie des connexines	29
III.3.3. La distribution tissulaire	30
III.3.4. Compatibilité entre connexines	30
III.3.5. Le turn-over des connexines	31
III.3.6. Les partenaires protéiques des connexines	32
III.4. La communication jonctionnelle	34
III.4.1. Le couplage électrique	34
III.4.2. Le couplage métabolique	34
III.4.3. La perméabilité jonctionnelle	35
III.4.4. Régulation de la perméabilité jonctionnelle	35
a) Régulation de la conductance unitaire	36
b) Régulation du nombre de canaux	38
III.5. Rôles des jonctions communicantes	38
III.5.1. Rôle des jonctions communicantes au cours du développement	39
III.5.2. Rôles des jonctions communicantes dans la différenciation cellulaire	39
III.5.3. Rôles des jonctions communicantes dans la prolifération cellulaire	40
III.5.4. Rôles des jonctions communicantes dans la mort cellulaire	43

III.5.5. Le rôle des hémicanaux	43
III.5.6. Physiopathologies liées aux jonctions communicantes	44
IV. OBJECTIFS	46
Partie 1 : Rôle de la Cx43 dans la différenciation des hMSC en ostéoblastes	
I. ROLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE TISSU OSSEUX	47
I.1. Rôle des jonctions gap dans les cellules osseuses	47
I.1.1. Les ostéoblastes	47
I.1.2. Les ostéocytes	49
I.1.3. Les ostéoclastes	50
I.2. Les jonctions gap et le développement du squelette	50
I.3. Rôle des hémicanaux dans le tissu osseux	51
I.4. Objectifs de l'étude	51
II. ARTICLE 1	53
III. COMPLEMENTS DE DISCUSSION DE L'ARTICLE 1	55
Partie 2 : Rôle de la Cx43 dans le développement du sarcome d'Ewing	
I. JONCTIONS COMMUNICANTES ET CANCER	61
I.1. Jonctions gap et tumeurs primaires	61
I.2. Jonctions gap et progression tumorale	65
I.3. Implication des connexines dans les tumeurs osseuses primitives	66
I.4. Objectifs de l'étude	67
II. ARTICLE 2	69
III. COMPLEMENTS DE DISCUSSION DE L'ARTICLE 2	71
Conclusion Générale et Perspectives	
Références Bibliographiques	

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	ORGANISATION STRUCTURALE D'UN OS LONG	1
FIGURE 2 :	STRUCTURE MICROSCOPIQUE DE L'OS CORTICAL	1
FIGURE 3 :	JONCTION ENTRE L'OS TRABECULAIRE ET L'OS CORTICAL	2
FIGURE 4 :	OSTEOBLASTE OBSERVE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.....	4
FIGURE 5 :	DIFFERENCIATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	4
FIGURE 6 :	LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE	5
FIGURE 7 :	LES DIFFERENTS STADES DE LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE	8
FIGURE 8 :	OSTEOCYTES OBSERVES PAR	8
FIGURE 9 :	LA DIFFERENCIATION OSTEOCLASTIQUE	9
FIGURE 10 :	VUE D'UN OSTEOCLASTE RESORBANT LA MATRICE OSSEUSE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	9
FIGURE 11 :	SCHEMA D'UN OSTEOCLASTE ACTIF	10
FIGURE 12 :	LES DIFFERENTES ETAPES DU REMODELAGE OSSEUX.....	11
FIGURE 13 :	FREQUENCE DE LA LOCALISATION DES SITES PRIMAIRES DE SARCOME D'EWING ET DE METASTASES .	14
FIGURE 14 :	LA PROTEINE DE FUSION EWS-FLI1	20
FIGURE 15 :	STRUCTURE D'UNE JONCTION COMMUNICANTE	27
FIGURE 16 :	STRUCTURES DES GENES DES CONNEXINES.....	29
FIGURE 17 :	STRUCTURES DES CONNEXINES	29
FIGURE 18 :	ILLUSTRATION DES DIFFERENTES CONFORMATIONS DE CONNEXONS POSSIBLES	31
FIGURE 19 :	CYCLE DE VIE DES CONNEXINES	32
FIGURE 20 :	LES PARTENAIRES PROTEIQUES DES CONNEXINES	33
FIGURE 21 :	LES DIFFERENTS SITES DE PHOSPHORYLATIONS LOCALISES AU NIVEAU DE L'EXTREME C-TERMINALE DE LA Cx43.....	37
FIGURE 22 :	CONNEXINE ET CYCLE CELLULAIRE.....	40
FIGURE 23 :	CONNEXINES ET REGULATION DE L'EXPRESSION DE GENES	41
FIGURE 24 :	MODELE DU MECANISME D'ACTION DES JONCTIONS GAPS DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES OSTEOBLASTIQUES	48
FIGURE 25 :	EFFET DE L'ABLATION DU GENE DE LA Cx43 SUR LE DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE AXIAL DE LA SOURIS	50
FIGURE 26 :	LE BAPTA, UN CHELATEUR DU Ca^{2+} , INHIBE LA DIFFERENCIATION DES HMSC EN OSTEOBLASTES ...	58
FIGURE 27 :	IMPLICATION DES JONCTIONS COMMUNICANTES DURANT LA CANCEROGENESE.....	61
FIGURE 28 :	ILLUSTRATION DE DIFFERENTS MECANISMES POUVANT MENER A L'INHIBITION DE GJIC AU COURS DE LA CANCEROGENESE	62
FIGURE 29 :	EWS-FLI1 REPRIME L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE LA Cx43.....	71
FIGURE 30 :	ALTERATION DE LA COMMUNICATION HOMOLOGUE ET HETEROLOGUE DANS LES CELLULES DE SARCOME D'EWING	72
FIGURE 31 :	LA SUREXPRESSON DE LA Cx43 INHIBE LA MIGRATION ET L'INVASION DES CELLULES DE SARCOMES D'EWING TC71	77
FIGURE 32 :	ILLUSTRATION DU ROLE DES JONCTIONS GAP DANS L'EFFET BYSTANDER.....	81
FIGURE 33 :	LA SUREXPRESSON DE LA Cx43 DANS DES CELLULES DE SARCOME D'EWING TC71 AUGMENTE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LE CISPLATINE	82

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing	15
TABLEAU 2 : Principales cibles du facteur de transcription EWS-FLI1	20
TABLEAU 3 : Classification des connexines humaines et murines	28
TABLEAU 4 : Profil d'expression tissulaire des connexines chez l'Homme	30

Abréviations

ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ALP :	Alkaline phosphatase
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1 :	Activator protein 1
ARN :	Acide Ribonucléique
ATA :	Aminoterminal Transcriptional Activation
ATP :	Adénosine-5'-triphosphate
BCP :	Biocéramique Phosphocalcique
BMP :	Bone Morphogenic Protein
BSP :	Bone sialoprotein
Cdc25A :	Cell division cycle 25 homolog A
CDK :	Cyclin Dependent Kinase
ChIP :	Chromatin immunoprecipitation
CTA :	Carboxyterminal Transactivation
Cx :	Connexine
CxRE :	Connexin-responsive element
CycB :	Cycline B
DBD :	DNA-binding domain
Dlx5	Distal-less homeobox-5
DMP-1	Dentin Matrix Protein-1
Dnd1 :	Dead end 1
DNMT :	DNA Méthyltransférase
ERAD :	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERGIC :	Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment
ERK :	Extracellular regulated MAP kinase
EZH2 :	Enhancer of Zeste Homolog 2
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FGFR3 :	Fibroblast growth factor receptor 3
FLS :	FLI-1 Specific
GCV :	Ganciclovir
GJ :	Gap Junction
GJIC :	Gap Junctional Intercellular Communication
HDAC :	Histone Déacétylase
Her-2 :	Human Epidermal Growth factor Receptor-2
HSV-tk :	Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase

IGF :	Insulin-like Growth Factor
IGFBP-3 :	IGF-Binding-Protein 3
IL :	Interleukine
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
KO :	Knock-out
MAGUK :	Membrane-associated guanylate kinase
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF :	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDR-1 :	Multidrug Resistance gene-1
MGF-E8 :	Milk fat globule-EGF factor 8
MMP :	Matrix Metalloproteinase
MSC :	Mesenchymal Stem Cell
Msx2	homeobox msh-like-2
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NO :	Oxyde Nitrique
nov :	nephroblastoma overexpressed gene
NSE :	Neuron-Specific Enolase
OC :	Ostéocalcine
ODDD :	Dysplasie Occulodentodigitale
OPG :	Ostéoprotégérine
Osx :	Ostérix
PARP :	Poly ADP-ribose Polymérase
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PGE2 :	Prostaglandine E2
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PNET :	Tumeurs Neuroectodermiques Primitives
PPARγ2	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma 2
PTH :	Parathormone
RANK :	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B
RANKL :	RANK Ligand
Rb :	Rétinoblastome
Runx2 :	Runt-related gene 2
shRNA :	Short hairpin RNA
Skp2 :	S-phase kinase-associated protein 2
S1P :	Sphingosine 1-phosphate
SOST :	Sclérostine

TCF :	T-Cell Factor
TGF-β :	Transforming Growth Factor β
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TPA :	Tétradécanoyl 12-13 Phorbol Acétate
TRAP :	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
Txn :	Transcription génique
Ub :	Ubiquitination
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VIDE :	Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicine, Etoposide

Introduction Générale

I. LE TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale. Il est constitué d'une matrice extracellulaire spécifique qui lui confère ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Son organisation et sa dynamique lui permettent d'assurer plusieurs fonctions dans l'organisme comprenant des fonctions mécaniques, métaboliques et hématopoïétiques.

Sur le plan mécanique, le tissu osseux représente une véritable « charpente » de l'organisme. Il assure ainsi le soutien et la protection des organes internes, permet la locomotion et constitue un point d'ancrage au système musculaire.

Sur le plan métabolique, le tissu osseux, principale réserve d'ions minéraux de l'organisme, joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et contribue ainsi à la régulation de la composition des fluides extracellulaires.

Sur le plan hématopoïétique, les os renferment, au niveau de leurs espaces médullaires, la moelle osseuse qui assure le renouvellement des cellules sanguines.

Malgré sa dureté et son apparente rigidité, l'os n'est pas pour autant un tissu figé. En effet, pour assurer ses fonctions tout au long de la vie, le tissu osseux est continuellement renouvelé, au cours d'un processus appelé remodelage osseux, correspondant à une succession de phases de destruction et de formation osseuse. Ce processus est assuré principalement par deux types cellulaires spécialisés : les ostéoclastes, responsables de la dégradation ou résorption osseuse et les ostéoblastes qui permettent la production d'une matrice organique minéralisée (apposition osseuse). Ce remodelage osseux permet la constitution d'un squelette adapté à la croissance, à la conservation de ses propriétés mécaniques et de sa capacité d'adaptation aux contraintes, à la réparation des fractures et à la mise à disposition du calcium qu'il stocke.

I.1. L'organisation macroscopique du tissu osseux

Anatomiquement, on distingue trois types d'os dans le squelette : les os plats (sternum, os pariétaux), les os longs (fémur, tibia, humérus) et les os courts (vertèbres, phalanges). Ces différents types d'os résultent de deux types d'ossification : l'ossification endochondrale et l'ossification intramembraneuse. L'ossification des os courts et longs est endochondrale, c'est-à-dire que la formation osseuse est réalisée à partir d'une ébauche cartilagineuse (tissu cartilagineux hyalin) produite par les chondrocytes, qui va être progressivement remplacée

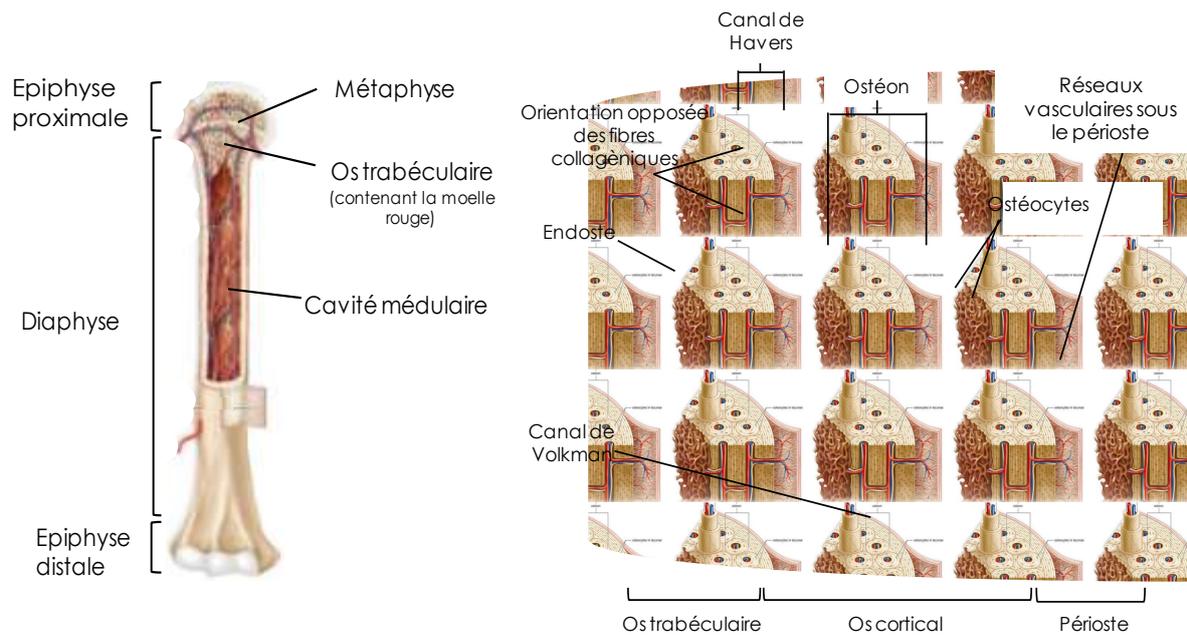


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long

(Adaptée à partir de <http://humanbio156.blogspot.com/2008/07/compendium-review-unit-3-major-topic.html>)

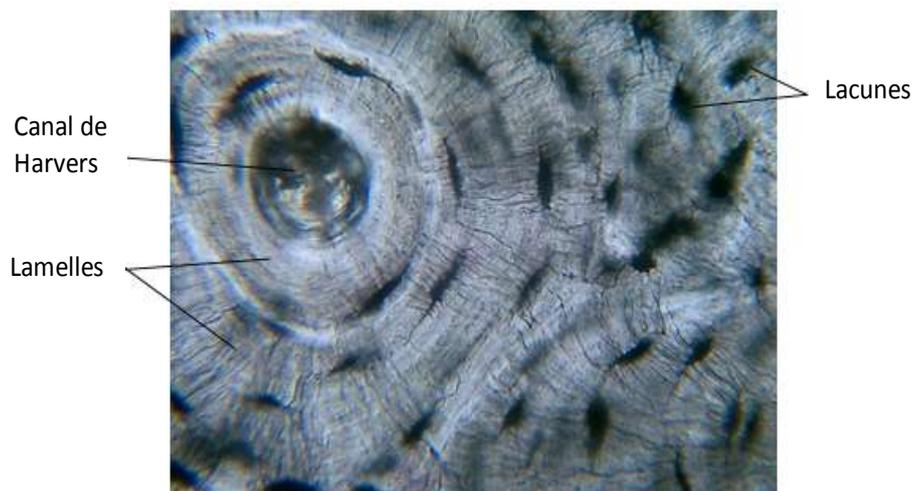


Figure 2 : Structure microscopique de l'os cortical

(D'après le site internet : <https://pages.usherbrooke.ca/htl302-pc/histo/conj/os/durb.htm>)

par une matrice ostéoïde sécrétée par les ostéoblastes. L'ossification intramembraneuse, préférentielle au niveau des os plats, correspond à l'apposition directe d'une matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes sous forme d'une membrane progressivement minéralisée.

Chez l'adulte, l'os long est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse (Figure 1). Dans un os long en croissance, épiphyse et métaphyse sont séparées par une couche de cartilage, appelée la plaque de croissance.

On distingue l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste, absent au niveau du cartilage articulaire et des insertions des tendons et des ligaments. Cette enveloppe joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et surtout circonférentielle des os. Chez l'enfant, elle est constituée de deux couches : une couche superficielle fibreuse vascularisée et une couche profonde contenant des cellules souches et des pré-ostéoblastes (Toppets *et al.*, 2004).

1.1.1. L'os cortical

L'os cortical (ou compact) constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts. Il représente environ 80-85% du tissu osseux et constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300 µm de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Chaque ostéon, qui correspond à l'unité structurale de l'os cortical, est composé de lamelles concentriques (de 20 à 30) de fibres de collagène disposées autour d'un canal central. Les fibres de collagène sont orientées parallèlement les unes aux autres de façon à conférer au tissu cortical une résistance mécanique optimale. Le canal central de chaque ostéon appelé canal de Havers (40 à 50 µm de diamètre), permet le passage de vaisseaux et de fibres nerveuses amyéliniques mais aussi les connexions intercellulaires (Figure 2). Les canaux de Havers sont délimités par des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes, qui se retrouvent emmurés dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons et, deviennent alors des ostéocytes. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits de Volkmann qui permettent la communication entre la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle osseuse (Heymann *et al.*, 2008). L'endoste et le périoste sont les couches de tissu recouvrant respectivement la partie interne et la partie externe de l'os cortical.

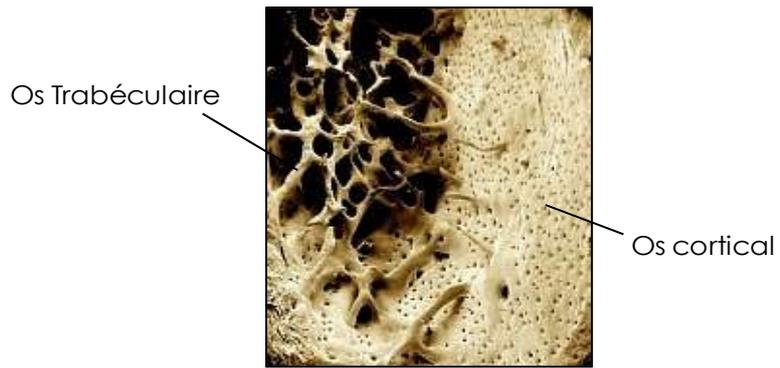


Figure 3 : Jonction entre l'os trabéculaire et l'os cortical

(D'après: <http://www.visualsunlimited.com>)

1.1.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire (ou os spongieux) est localisé principalement dans les régions métaphysaires des os longs, ainsi que dans les os courts et plats. Il est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches (Figure 3). Entre les travées osseuses se positionne la moelle hématopoïétique qui représente environ 75% du volume total de l'os spongieux. De par sa structure, l'os trabéculaire dispose d'une large surface d'échange avec la moelle osseuse, lui permettant ainsi d'effectuer au mieux ses fonctions hématopoïétiques, en assurant la production des progéniteurs des différentes lignées sanguines. A l'interface de la moelle osseuse et du tissu minéralisé se trouvent les cellules ostéoblastiques, qui jouent un rôle essentiel dans les échanges entre ces deux structures (Heymann *et al.*, 2008).

L'os cortical et trabéculaire ont des structures et des fonctions différentes. Une des différences structurales de ces deux types d'os est leur degré de porosité, qui est de 30 à 90% pour l'os trabéculaire et seulement de 5 à 30% pour l'os cortical. Cette porosité fait de l'os trabéculaire un os beaucoup moins dense et donc beaucoup plus fragile que l'os cortical. Ainsi, 85% du volume d'os cortical est calcifié contre seulement 20% du volume d'os trabéculaire, le reste étant occupé par la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins et l'endoste. Il en résulte que l'os trabéculaire assure une fonction principalement métabolique (la surface d'échange avec la moelle osseuse étant favorisée) alors que l'os cortical assure essentiellement des fonctions mécaniques et protectrices.

1.2. L'organisation microscopique du tissu osseux

Le tissu osseux, qu'il soit trabéculaire ou cortical, est constitué de cellules spécialisées (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et cellules bordantes) et d'une matrice extracellulaire occupant environ 95% du volume tissulaire qui lui confère ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

1.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est constituée de deux fractions, une fraction organique et une fraction minérale. Sa teneur en eau, d'environ 9%, est très variable selon l'âge et le degré de minéralisation.

La phase organique représente environ 25% de la masse osseuse. Elle est principalement composée de fibres de collagène de type I (90% de la phase organique), arrangées parallèlement au sein des lamelles osseuses. Plus de deux cents autres protéines sont répertoriées au sein de la matrice organique du tissu osseux et sont pour la plupart (75%) synthétisées par les cellules osseuses elles-mêmes. Parmi ces protéines, se trouvent des protéines de structure telles que l'élastine et la fibronectine qui forment avec le collagène de type I, la substance fibrillaire. Cette dernière est entourée par la substance interfibrillaire (10% de la phase organique), également appelée substance non-collagénique, qui comprend des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes. L'ostéocalcine qui est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20%) est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation (Glowacki *et al.*, 1991; Swaminathan, 2001). Des facteurs de croissance et des cytokines, tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), l'IGF (Insulin-like Growth Factor), le TNF- α (Tumor Necrosis Factor), les interleukines, les BMPs (Bone Morphogenic Protein) et les FGFs (Fibroblast Growth Factor) sont également présents au sein de la fraction organique (Hauschka *et al.*, 1986). Ces facteurs participent à l'activation et à la différenciation des cellules de la matrice osseuse assurant l'équilibre entre formation et dégradation osseuse (Heymann *et al.*, 2008).

La fraction minérale, qui représente 70% de la matrice osseuse, confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique et constitue la principale réserve minérale de l'organisme. En effet, environ 99% du calcium, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium de l'organisme sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse (Glimcher, 1987). Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Les cristaux d'hydroxyapatite, disposés dans les espaces interfibrillaires, ont une forme hexagonale et aplatie. Après la minéralisation primaire qui suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes (tissu ostéoïde), le nombre et la taille des cristaux vont croître lentement au cours d'un processus de minéralisation secondaire (Heymann *et al.*, 2008). Les ions calcium et phosphate à la surface des cristaux participent aux échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec la circulation sanguine, ce qui est crucial pour l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme.

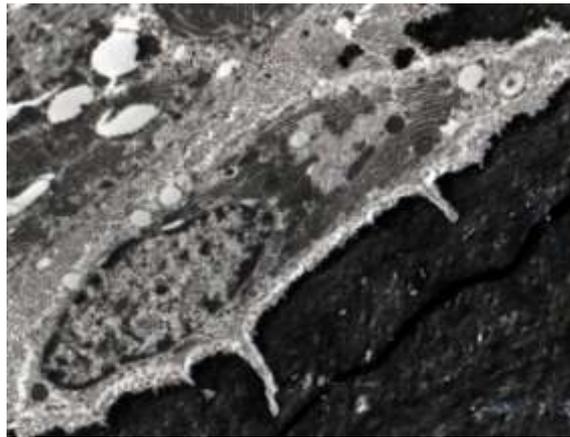


Figure 4 : Ostéoblaste observé par microscopie électronique à transmission
(Heymann et Rousselle, 2002)

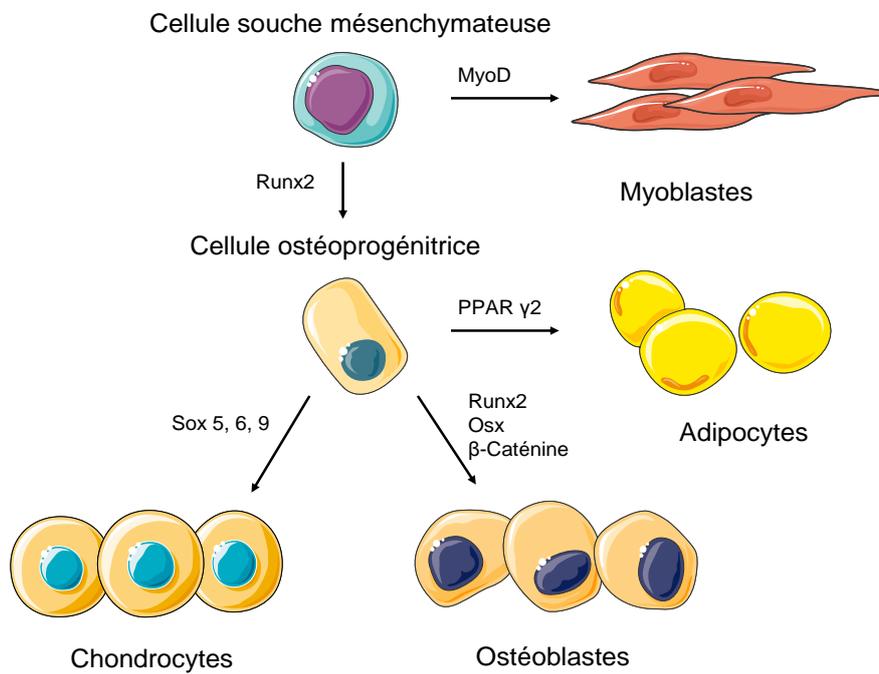


Figure 5 : Différenciation de cellules souches mésenchymateuses
(D'après Marie, 2008)

1.2.2. L'ostéoblaste

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules ostéoformatrices, disposées en monocouche cellulaire sur la surface osseuse. Ces cellules de forme cuboïdale de 20 µm de diamètre présentent un large noyau apical et un cytoplasme basophile. L'ostéoblaste est limité par une membrane plasmique classique polarisée (Figure 4). Ainsi, la membrane plasmique adjacente à la matrice osseuse en formation est constituée de nombreux prolongements cytoplasmiques pouvant s'étendre profondément entre les fibrilles de collagène de l'ostéoïde, la portion opposée n'en comprenant que très peu. Ces nombreux prolongements cytoplasmiques leur permettent également d'établir des contacts avec les ostéoblastes ainsi que les ostéocytes environnants. Ces contacts via les jonctions communicantes (ces structures seront décrites plus en détails dans la partie III p26) permettent ainsi la diffusion de divers signaux entre ces cellules (Civitelli, 2008).

Ces cellules ont pour fonction principale la synthèse de la substance ostéoïde, matrice organique qui sera ensuite minéralisée par la précipitation, à la surface, des fibres de collagène de type I et de cristaux de phosphate de calcium.

Par ailleurs, les ostéoblastes participent également à l'activation de la résorption osseuse via l'induction de la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques en ostéoclastes. En effet, l'ostéoblaste peut synthétiser et sécréter des facteurs tels que le RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand) ou encore interagir directement avec les cellules progénitrices pour induire leur différenciation en ostéoclastes.

a) La différenciation ostéoblastique

D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Owen, 1988), essentiellement présentes chez l'adulte dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Sous le contrôle de différents facteurs de transcription spécifiques, ces cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, myoblastes et adipocytes. Ainsi, l'expression du facteur Sox-9 induit la différenciation vers la voie chondroblastique, celle de Myo-D, vers la voie myoblastique et celle de PPARγ2 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma 2), vers la voie adipocytaire (Marie, 2008). La différenciation des MSC en ostéoblastes matures implique quant à elle, une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation faisant intervenir notamment les facteurs de transcription Runx2 (Runt-related gene 2) et ostérix (Figure 5).

BSP	
OC	
Collagène de type I	E11
Ostéopontine	DMP-1
ALP	SOST

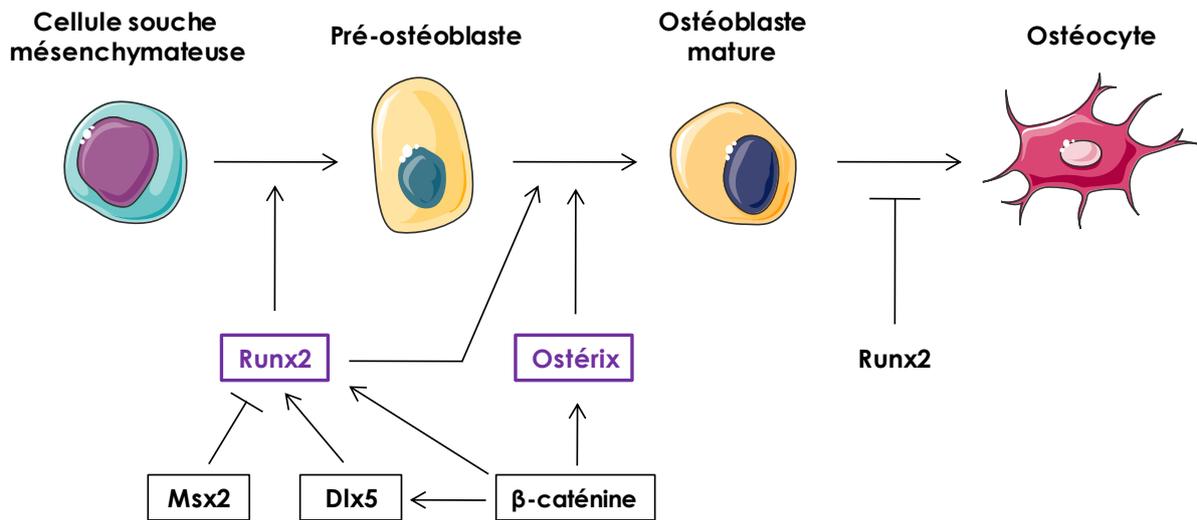


Figure 6 : La différenciation ostéoblastique

(d'après Robling *et al.*, 2006; Marie, 2008)

Les ostéoblastes proviennent de la différenciation des MSC sous l'influence des facteurs de transcription Runx2 et Osterix. Au cours de leur différenciation en ostéoblaste mature puis en ostéocytes, les cellules expriment séquentiellement différents gènes ostéoblastiques.

Au cours de la différenciation ostéoblastique, de nombreux gènes vont être exprimés, de manière séquentielle, menant à la synthèse de protéines essentielles à la différenciation des MSC en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures, mais également essentielles à la formation et la minéralisation de la matrice extracellulaire. La phase précoce de cette différenciation est caractérisée par l'expression de Runx2. Puis la maturation des cellules est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques associés à la production de matrice tels que la phosphatase alcaline (ALP), le collagène de type I ou encore l'ostéopontine. Les ostéoblastes matures quant à eux expriment des marqueurs tardifs tels que la sialoprotéine osseuse (BSP), ostérix, l'ostéocalcine (OC) ou l'ostéonectine (Figure 6).

Runx2 (appelé également cbfa-1) est un facteur de transcription essentiel à la différenciation ostéoblastique, puisqu'il permet l'activation de nombreux gènes exprimés par les ostéoblastes matures. Ce facteur est capable de se lier à un site consensus, appelé OSE2, présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I, la BSP, l'OC et l'ostéopontine (Ducy *et al.*, 1997). Runx2 est nécessaire à l'ostéoformation *in vivo* et au maintien de la fonction ostéoblastique lors de la croissance. En effet, il a été montré que la délétion de Runx2 chez la souris entraîne l'absence de tissu osseux : les maquettes des os sont présentes et de forme normale mais elles ne sont constituées que de cartilage (Komori *et al.*, 1997). *In vitro*, les ostéoblastes issus de ces souris perdent leur capacité à minéraliser (Lian *et al.*, 2006).

Ostérix est également impliqué dans la différenciation ostéoblastique mais intervient en aval de Runx2 en permettant la différenciation de pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures fonctionnels (Nakashima *et al.*, 2002). Sa surexpression dans des cellules souches embryonnaires murines est suffisante pour orienter leur différenciation vers la lignée ostéoblastique *in vitro* (Tai *et al.*, 2004).

D'autres facteurs de transcription interviennent dans ce processus de différenciation comme, par exemple, les membres de la famille AP-1, la β -caténine, Msx2 (homeobox msh-like-2) ou Dlx5 (Distal-less homeobox-5).

En effet, certains membres de la famille **AP-1** (constitués d'homo- ou hétérodimères de facteurs de transcription de la famille Jun/Fos), dont c-fos, contrôlent la prolifération ostéoblastique et l'expression des gènes dont le promoteur présente des sites AP-1. Des études plus récentes ont montré que la surexpression de Fra-1 stimule la différenciation ostéoblastique et accroît par conséquent la formation et la masse osseuse par une

augmentation du nombre d'ostéoblastes (Jochum *et al.*, 2000). A l'inverse, son invalidation résulte en une réduction de la masse osseuse chez la souris (Eferl *et al.*, 2004).

Par ailleurs, des études ont révélé un rôle important de la voie canonique Wnt/ β -caténine dans le contrôle de la formation et de la masse osseuse (Glass and Karsenty, 2006), résultant en une accumulation de la **β -caténine** et à sa translocation dans le noyau afin d'activer divers gènes. De plus, l'inactivation de la β -caténine empêche la différenciation ostéoblastique à partir des MSC, indiquant que cette protéine joue un rôle essentiel dans la différenciation des ostéoblastes *in vivo*. Une des cibles de la signalisation Wnt est Runx2 : en effet le complexe β -caténine/TCF1 induit l'expression et l'activité de Runx2 (Gaur *et al.*, 2005; Marie, 2008).

Msx2 est principalement exprimé par les précurseurs ostéoblastiques. *In vitro*, Msx2 stimule la prolifération et la différenciation des MSC en ostéoblastes, mais inhibe l'activité de Runx2 ainsi que l'expression de gènes ostéoblastiques dans des ostéoblastes matures (Shirakabe *et al.*, 2001; Marie, 2008). Cependant, Msx2 est un régulateur positif de la formation osseuse *in vivo*.

Dlx5, exprimé plus fortement dans les ostéoblastes matures, stimule l'expression de Runx2 ainsi que des marqueurs ostéoblastiques, OC et BSP (Holleville *et al.*, 2007).

Ces facteurs de transcription peuvent être activés par de nombreux facteurs solubles locaux ou systémiques qui participent à la régulation de l'ostéogenèse comme, le TGF- β , certaines BMPs, les FGFs, la PTH (parathormone), la vitamine D ou encore certains stéroïdes.

b) La formation osseuse

En ce qui concerne la formation osseuse, l'ostéoblaste va dans un premier temps élaborer de l'os immature en synthétisant principalement du collagène de type I, qui est le constituant majoritaire de la matrice extracellulaire, mais également des protéines non collagéniques (OC, BSP, ostéopontine, ostéonectine), des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes (décorine, biglycan). Cette matrice de protéines compose le tissu ostéoïde. La minéralisation de ce tissu immature va rapidement être initiée et facilitée grâce à l'action spécifique de certaines protéines :

- **la phosphatase alcaline (ALP)** est une enzyme dont l'activité est de dégrader les pyrophosphates inorganiques, qui sont des inhibiteurs de la calcification, afin d'augmenter le

taux de phosphate nécessaire à la minéralisation pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite (Wennberg *et al.*, 2000).

- **l'ostéopontine** est une glycoprotéine riche en acide sialique ayant une grande affinité pour le calcium. Au niveau osseux, l'ostéopontine permet l'adhérence des cellules osseuses à la matrice via une séquence RGD, lui permettant de se fixer à des récepteurs membranaires de type intégrine. Elle régule également la fonction des ostéoclastes et la minéralisation de la matrice extracellulaire, en liant les minéraux sous forme de cristaux aux cellules osseuses (Giachelli and Steitz, 2000).

- **l'ostéonectine** est nécessaire à la minéralisation du fait de son affinité pour le collagène de type I et le calcium (Terminet *et al.*, 1981).

- **l'ostéocalcine (OC)** est la plus abondante des protéines non-collagéniques (10 à 20%) de la matrice extracellulaire osseuse. Cette protéine, contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé, joue un rôle dans le processus de minéralisation en captant les ions Ca^{2+} extracellulaires (Swaminathan, 2001). Des études ont également suggéré qu'elle inhiberait la minéralisation par son affinité avec l'apatite qui régule la nucléation des cristaux d'apatite (Hunter *et al.*, 1996). Ainsi, l'absence d'ostéocalcine chez la souris provoque une augmentation de la densité de la matrice osseuse (Ducy *et al.*, 1996). Cependant, son rôle reste encore controversé. Par ailleurs, l'OC jouerait également un rôle clé dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique ainsi que l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption (Ishida and Amano, 2004).

- **la sialoprotéine osseuse (BSP)** est une glycoprotéine riche en acide sialique, qui comme l'ostéopontine, possède une séquence RGD, lui permettant de se fixer à des récepteurs membranaires de type intégrine, et ainsi d'être impliquée dans l'adhésion des cellules osseuses à la matrice. Elle est également impliquée dans la minéralisation initiale de l'os en induisant la nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite (Hunter and Goldberg, 1994).

Cette activité de synthèse protéique élevée des ostéoblastes est supportée par la présence, dans leur cytoplasme cellulaire, de nombreux organites tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique granuleux très développé (Heymann,

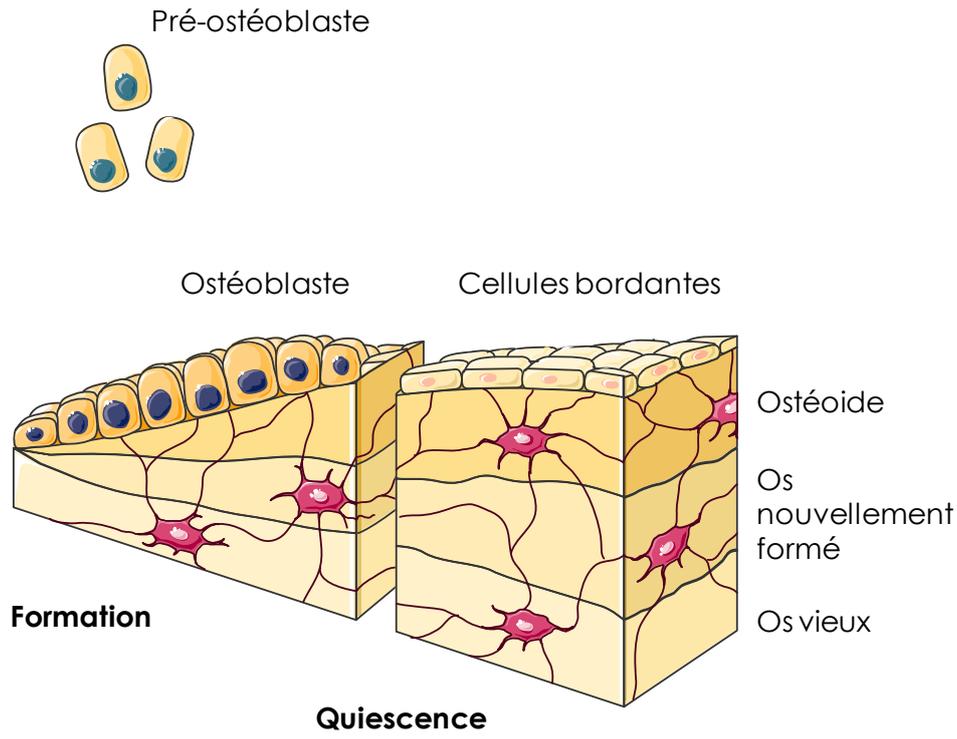


Figure 7 : Les différents stades de la différenciation ostéoblastique

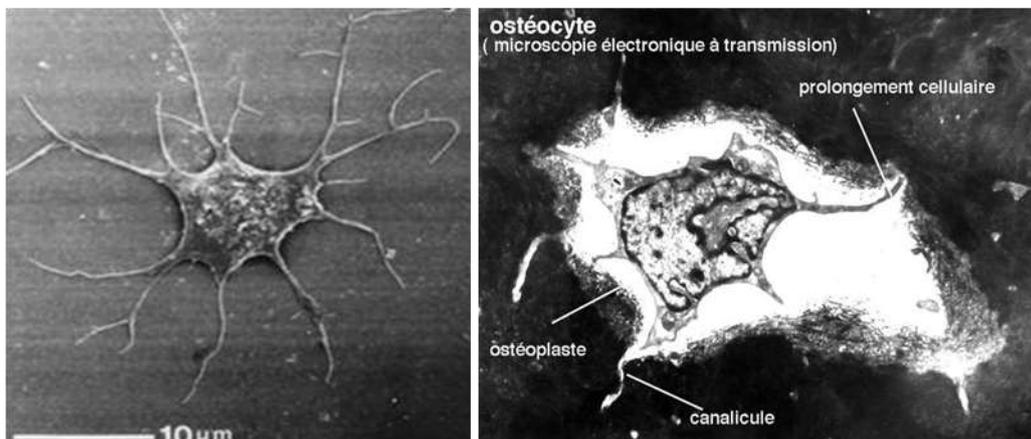


Figure 8 : Ostéocytes observés par :

A) microscopie électronique à balayage (d'après Tanaka-Kamioka *et al.*, 1998) et **B)** par microscopie à transmission d'après le laboratoire de biologie du tissu osseux de l'université Jean Monnet, St Etienne.

2008). De plus, leur cytoplasme renferme également des vésicules de calcium contenant de fortes concentrations d'ALP et de minéraux qui permettront la minéralisation aboutissant à la formation de l'os mature (Toppets *et al.*, 2004). La minéralisation dépend d'une part de la présence d'une structure matricielle extracellulaire et d'autre part d'une concentration adéquate en minéraux. Les cristaux d'hydroxyapatite, qui se déposent sur et entre les fibres de collagène assurant ainsi leur cohésion, donnent à l'os sa résistance aux contraintes.

Après un certain nombre de divisions, la plupart des ostéoblastes vont mourir par apoptose due à un excès de glucocorticoïdes. Dès qu'ils commencent à synthétiser de la matrice, les ostéoblastes cessent de se diviser. Au fur et à mesure que la matrice est synthétisée et minéralisée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et s'aplatissent. Une petite fraction des ostéoblastes sera incorporée dans le tissu ostéoïde et se différenciera en ostéocytes. Les ostéoblastes restant à la surface dériveront en cellules bordantes (Figure 7).

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés ou quiescents, qui forment une monocouche de cellules aplaties présentes le long des surfaces osseuses. Ces cellules, pauvres en cytoplasme et en organites, ont une activité métabolique très réduite (Rodan, 1992). Chez l'adulte ces ostéoblastes au repos recouvrent les os quiescents (non soumis au remodelage), le reste étant recouvert par les ostéoblastes actifs. Cependant, les cellules bordantes peuvent se multiplier sous l'effet de stimuli et ont la capacité de se différencier pour retrouver un phénotype d'ostéoblaste actif (Chow *et al.*, 1998). Leur principale fonction est d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Ces cellules ont également un rôle dans les premières phases de la résorption osseuse. En effet, sous l'effet de certains signaux, elles se détachent de la surface osseuse laissant place à une zone exposée accessible à l'ancrage des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont donc un rôle important dans le cycle du remodelage osseux (Chambers and Fuller, 1985).

Les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale d'ostéoblastes, qui sont emmurés dans la matrice osseuse minéralisée, à l'intérieur de lacunes périostéocytaires appelées ostéoplastes. Ils représentent le type cellulaire prépondérant au sein de l'os mature (environ 90% des cellules). La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte se fait sous l'action notamment de la MMP-2 (Matrix Metalloproteinase de type 2) et de la DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) (Noble, 2008; Rochefort *et al.*, 2010) et se caractérise par la diminution progressive de certains marqueurs ostéoblastiques tels que l'ALP, le collagène de type I, la BSP et l'OC (Franz-Odenaal *et al.*, 2006). Cette transformation s'accompagne également

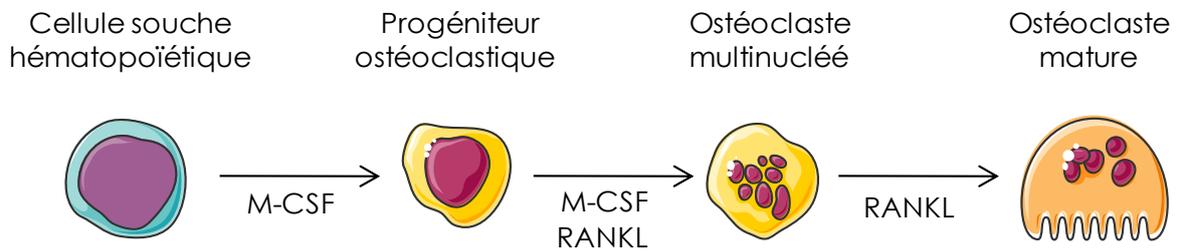


Figure 9 : La différenciation ostéoclastique

Les ostéoclastes dérivent de précurseurs, issus de la lignée hématopoïétique, sous l'influence de facteurs tels que RANKL et le MCSF pour former des cellules géantes multinucléées.

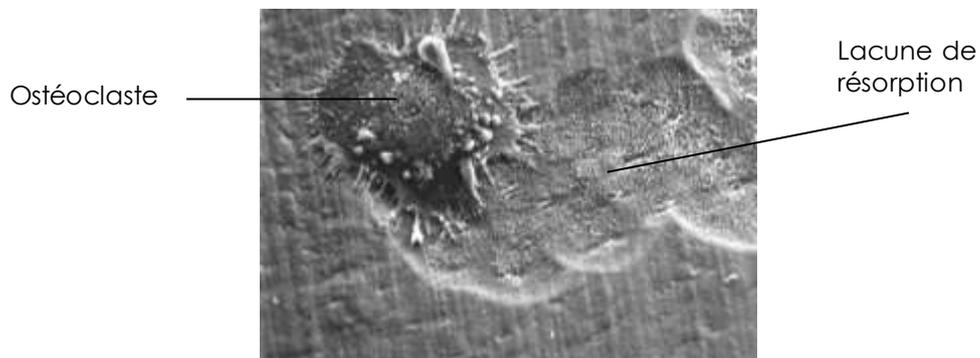


Figure 10 : Vue d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse au microscope électronique à balayage.

(D'après le site internet : <http://www.atpbone.org/>)

d'une augmentation de certains marqueurs ostéocytaires, tels que la sclérostine (SOST) ou E11. Le volume cytoplasmique ainsi que les organites sont réduits, traduisant une faible activité de synthèse protéique de ces cellules. Les ostéocytes possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur confèrent une forme étoilée (Palumbo, 1986) (Figure 8). Ces prolongements cytoplasmiques leur permettent d'établir des contacts entre eux ainsi qu'avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes, immobilisés dans la matrice osseuse, en diffusant, soit dans les canalicules entourant les prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par les jonctions communicantes (Civitelli, 2008).

Les ostéocytes, qui forment un vaste réseau, interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels au cours du processus de remodelage osseux. En effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagène tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrine et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes, assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux (Bonewald and Johnson, 2008).

Par ailleurs, les ostéocytes régulent la formation osseuse par la sécrétion de sclérostine. La sclérostine, étant un antagoniste de la voie Wnt, contrôle ainsi négativement l'activité et la différenciation des ostéoblastes (van Bezooijen *et al.*, 2005; Bonewald and Johnson, 2008). Il semblerait également que la mort des ostéocytes par apoptose soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent la mise en place du processus de résorption (Gu *et al.*, 2005).

1.2.3. L'ostéoclaste

Les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, dérivent de précurseurs hématopoïétiques mononucléés de type monocytaire (Massey and Flanagan, 1999). Ces précurseurs circulants colonisent la moelle osseuse et se différencient au contact des cellules stromales pré-ostéoblastiques. La différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription (*PU-1*, *c-fos*, *NF- κ B*) en réponse à certains facteurs de croissance dont les principaux sont le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et RANKL (Figure 9). Le M-CSF en se liant à son récepteur M-CSF R stimule la prolifération et la survie des précurseurs monocytaires. RANKL, exprimé à la membrane des ostéoblastes ou des

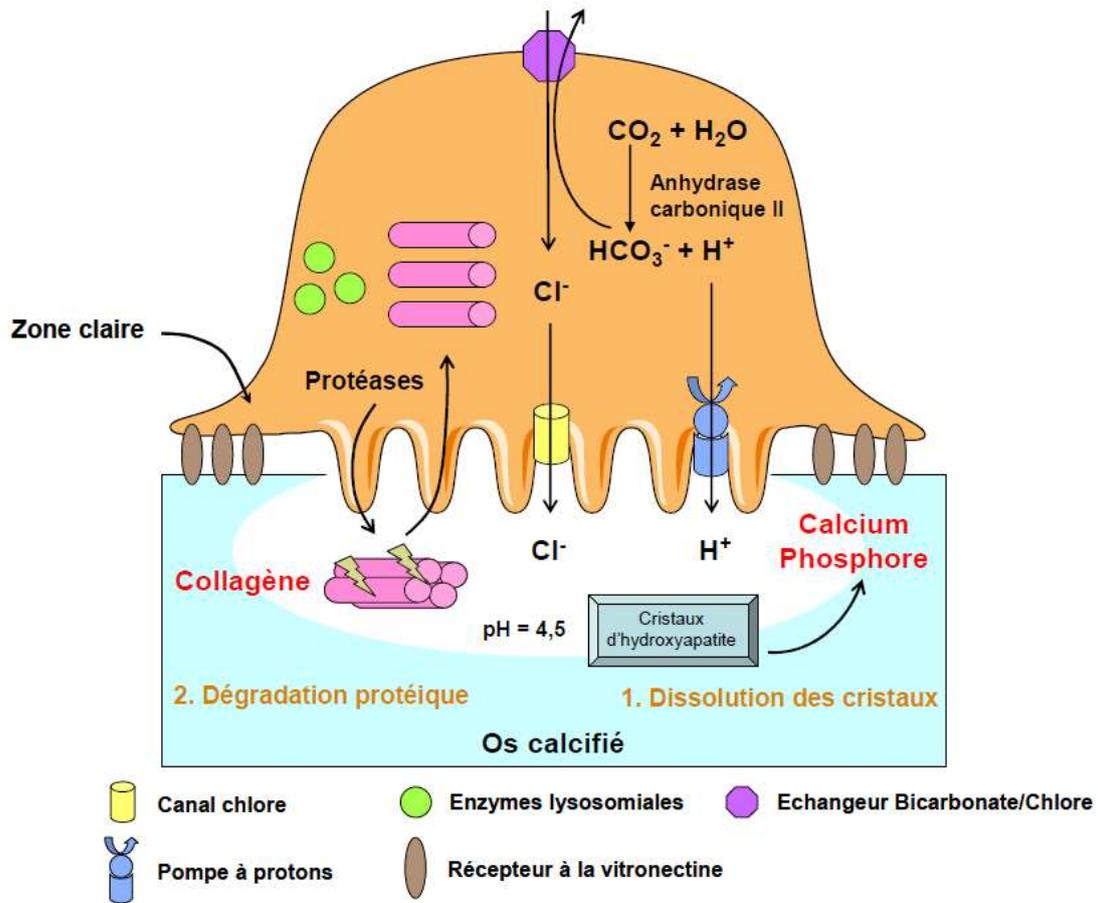


Figure 11 : Schéma d'un ostéoclaste actif

(d'après Rousselle and Heymann, 2002)

Une fois attachés à la matrice, les ostéoclastes créent un microenvironnement acide, entretenu par des pompes à protons. Cette acidité facilite la dissolution de la phase minérale de l'os (les cristaux d'hydroxyapatite) entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise l'activité des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsine K) conduisant à la destruction de la matrice organique.

cellules stromales ou libéré sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire, se lie à son récepteur RANK exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique. Ceci a pour conséquence d'activer la survie et la différenciation des précurseurs en pré-ostéoclastes mononucléés ainsi que leur fusion pour former des ostéoclastes matures multinucléés capables de résorber la matrice osseuse (Nicholson *et al.*, 2000). A l'inverse, l'ostéoprotégérine (OPG), synthétisée par les ostéoblastes, agit comme un récepteur leurre de RANKL inhibant ainsi la liaison du facteur pro-résorptif à son récepteur. Autrement dit, l'OPG prévient la naissance et la maturation des ostéoclastes.

Ainsi, la plupart des hormones et des facteurs de croissance qui affectent la résorption osseuse agissent à la fois sur l'équilibre formation/différenciation des ostéoclastes et sur leur activité. En particulier, la triade de molécules RANK/RANK-L/OPG joue un rôle majeur dans ce processus. Ces cytokines qui appartiennent à la super-famille des Tumor Necrosis Factors (TNF) et de leurs récepteurs, représentent un pivot moléculaire vers lequel convergent la plupart des systèmes régulateurs de la résorption osseuse connus à ce jour (Theoleyre *et al.*, 2004; Wittrant *et al.*, 2004).

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées (100 µm de diamètre en moyenne), pouvant renfermer de deux à trente noyaux. Ces cellules possèdent un appareil de Golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et sont riches en enzymes lysosomales telles que TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase) ou la cathepsine K ainsi qu'en métalloprotéases, nécessaires à leur activité de dégradation osseuse (Wittrant *et al.*, 2003). Le pôle basal présente une membrane plissée appelée bordure en brosse au contact de laquelle la matrice est résorbée (Figure 10). La résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse (via les intégrines) avec constitution d'une « poche » hermétique entre la bordure en brosse et l'os. L'ostéoclaste relargue dans la poche hermétique des ions H⁺ grâce à des pompes à protons ATP-dépendantes, ce qui acidifie le milieu. Il s'ensuit alors une dissolution de la phase minérale (les cristaux d'hydroxyapatite) du tissu osseux, suivie d'une phase de digestion de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes lysosomiales, dont l'activité est optimale à pH acide, telles que la cathepsine K et certaines métalloprotéases matricielles (ou collagénases) libérées par exocytose. L'os résorbé laisse peu à peu la place à une lacune de résorption appelée lacune de Howship (Boissy *et al.*, 2000 ; Heymann *et al.*, 2008)(Figure 11).

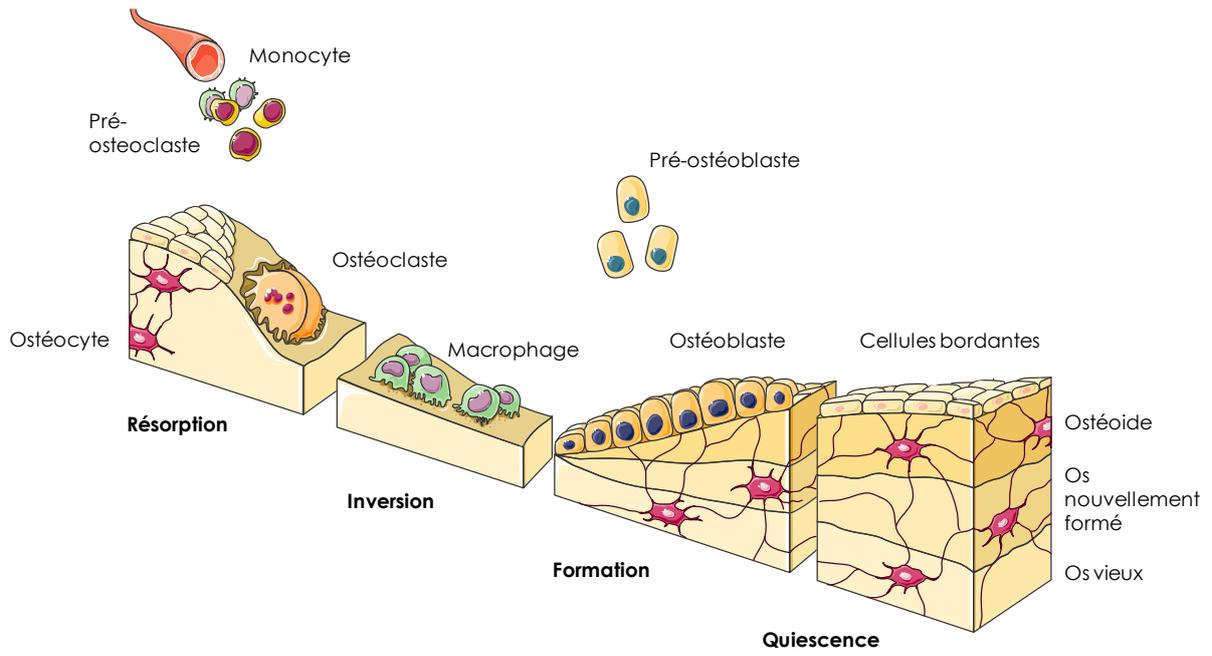


Figure 12 : Les différentes étapes du remodelage osseux

(d'après Servier Medial Art : http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp)

I.3. Le remodelage osseux

Tout au long de la vie, pour répondre à ses différentes fonctions, l'os est le siège d'un remaniement permanent. Ainsi, 5% des surfaces intracorticales et 20% des surfaces trabéculaires sont le siège d'un remodelage osseux dont la durée moyenne est de quatre à six mois. Ce processus permet ainsi au tissu osseux de s'adapter aux différentes contraintes mécaniques auxquelles il est soumis, d'assurer l'homéostasie minérale (du calcium et du phosphore) et d'assurer la cicatrisation des fractures. Le remodelage osseux se déroule en un même site, selon une séquence d'évènements bien précis résultant de l'activité de plusieurs types cellulaires. Le remodelage osseux débute par l'activation des ostéoclastes qui vont résorber la matrice osseuse suivie d'une phase de transition qui aboutit au recrutement des cellules ostéoprogénitrices et à l'activation des ostéoblastes, puis d'une phase d'inversion et enfin d'une phase de formation osseuse (Figure 12). Ce processus implique un couplage étroit entre résorption et formation.

Phase d'activation : Le remodelage osseux débute en un point d'une surface osseuse quiescente recouverte de cellules bordantes. Le signal déclenchant ce remodelage peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner and Pavalko, 1998) ou hormonal (comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'oestrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes) (Pacifci, 1998). Ce signal conduirait alors à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3, prostaglandine E2...), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

Phase de résorption : Cette phase d'environ trente jours débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse, au niveau du site de remodelage, et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement sur la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines telles que l'IL-6 (interleukine 6), le M-CSF ou encore RANKL, qui sont des facteurs pro-résorptifs. RANKL va notamment stimuler l'ostéoclastogénèse en agissant sur son récepteur RANK situé

à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Une fois attaché à la matrice, l'ostéoclaste mature va procéder à la dégradation de cette dernière.

Phase d'inversion : Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de transition. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu *et al.*, 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que les ostéoclastes en résorbant la matrice osseuse, libèrent des facteurs enfouis dans celle-ci lors de la phase de formation osseuse du cycle précédent. Ces facteurs tels que les IGFs, les FGFs, le TGF β , les BMPs et le PDGF (platelet derived growth factor) stimuleraient notamment la formation osseuse par les ostéoblastes (Sims and Gooi, 2008). La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes et correspondant au fond de la lacune de Howship est riche en éléments tels que l'ostéopontine qui activeraient les ostéoblastes. Les ostéoclastes pourraient également recruter directement les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à la sphingosine 1-phosphate (S1P) et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP (Pederson *et al.*, 2008).

Phase de formation : Cette phase de formation d'un nouveau tissu osseux se déroule en deux temps, au cours desquels les ostéoblastes jouent un rôle majeur. Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice organique osseuse. La production de cette matrice peut être stimulée par des hormones (œstrogènes, androgènes, vitamine D,...) ou par des facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes (TGF β , IGF, BMP...). A l'inverse, l'IL-1 α et TNF- α sont capables d'inhiber la production de matrice osseuse par les ostéoblastes (Nanes, 2003; Tanabe *et al.*, 2004). Après un délai de dix à quinze jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire puis se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage. La phase d'ostéoformation dure de quatre à cinq mois.

Phase de quiescence : Une fois la phase de formation terminée, alors que certains ostéoblastes meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse sous forme d'ostéocytes, d'autres sont convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation locale des ostéoclastes.

Ainsi, le maintien de l'architecture osseuse repose sur un équilibre entre deux mécanismes fondamentaux, la résorption et l'apposition osseuse, et toute modification de cet équilibre conduit au développement de pathologies ostéocondensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes.

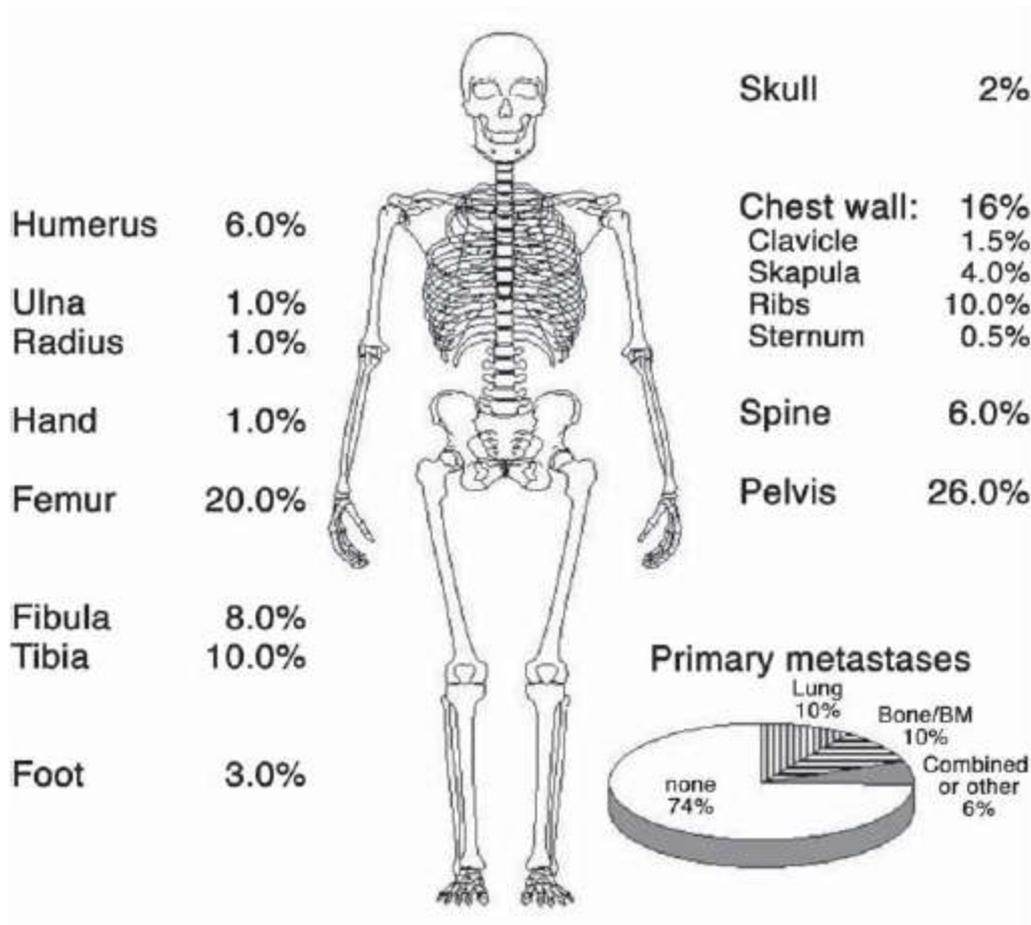


Figure 13 : Fréquence de la localisation des sites primaires de sarcome d'Ewing et de métastases

Données basées sur 1426 patients de l'essai clinique European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies (Bernstein *et al.*, 2006)

II. LE SARCOMES D'EWING

II.1. Les tumeurs osseuses primitives

Les tumeurs osseuses primitives sont des tumeurs rares qui peuvent être divisées en deux catégories : les tumeurs osseuses primitives bénignes (tumeurs à cellules géantes...) et les tumeurs osseuses primitives malignes (Ostéosarcomes, Chondrosarcomes et sarcome d'Ewing). Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et du jeune adulte. Cependant, un deuxième pic d'incidence se situe vers 60 ans avec des tumeurs osseuses primitives qui surviennent à la suite de pathologies du remodelage osseux telles que la maladie de Paget. L'Ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont les deux principales tumeurs osseuses primitives malignes chez l'enfant et le jeune adulte. Elles représentent environ 90% des tumeurs osseuses primitives malignes pédiatriques (Desandes *et al.*, 2004).

II.2. Le sarcome d'Ewing

II.2.1. Épidémiologie

Le sarcome d'Ewing représente la deuxième tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente après l'Ostéosarcome. Cette tumeur touche principalement l'enfant et le jeune adulte, avec un pic d'incidence de 15 ans. Avec environ 200 nouveaux cas diagnostiqués chaque année aux Etats-Unis, son incidence annuelle dans la population est d'environ 2,93 cas / millions d'enfants (Esiashvili *et al.*, 2008). Cette tumeur osseuse est, par ailleurs, plus fréquente chez les garçons avec un rapport de 1,2 à 1,5 et s'avère rare chez les populations afro-américaine et asiatique. Environ 85 % des sarcomes d'Ewing sont osseux avec une prédominance au niveau de la diaphyse des os longs (fémur, tibia, péroné, humérus). Ils peuvent également être localisés au niveau de la ceinture pelvienne et de la cage thoracique avec une fréquence variable (Bernstein *et al.*, 2006) (Figure 13). Les sarcomes d'Ewing s'accompagnent de tumeurs des parties molles souvent volumineuses en particulier au niveau des os plats. Par ailleurs, le risque de métastases est très important et facteur de mauvais pronostic. Il est estimé que 15 à 25% des patients présentent une forme métastatique de la pathologie au moment du diagnostic et les sites métastatiques les plus fréquents sont les poumons et dans une moindre mesure des localisations médullaires ou osseuses.

Membre de la famille EWS	Membre de la famille ETS	Fréquence (%)
EWS	FLI1	85
EWS	ERG	10
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

Tableau 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing

(Riggi and Stamenkovic, 2007)

II.2.2. Étiologie

Le développement du sarcome d'Ewing est associé à une translocation chromosomique donnant naissance à un gène de fusion spécifique entre le gène EWS et un gène de la famille ETS. La translocation t(11;22)(q24;q12), entre les gènes FLI1 et EWS, est retrouvée dans 85% des cas et génère le gène de fusion EWS-FLI1 (Delattre *et al.*, 1992). Dans environ 10% des cas, une translocation a lieu entre les gènes ERG et EWS, t(21;12)(22;12), donnant naissance au gène de fusion EWS-ERG. Et dans les 1-5 % restants, plusieurs translocations sont possibles entre le gène EWS et un membre de la famille ETS tel que ETV1 ou 4 avec des fréquences variables (Potratz *et al.*, 2012) (Tableau 1). De manière générale les taux de survie des patients en fonction du type de translocation varient peu (Le Deley *et al.*, 2010).

EWS-FLI1 agit comme un facteur de transcription aberrant capable d'activer ou de réprimer, directement ou indirectement, la transcription de certains gènes oncogéniques. Ainsi, ce facteur joue un rôle clé dans la tumorigénèse du sarcome d'Ewing.

Par ailleurs, d'autres mutations aspécifiques peuvent être retrouvées. En effet, *p16* est souvent sous exprimé dans les sarcomes d'Ewing et constitue un facteur d'agressivité de la tumeur (Kovar *et al.*, 1997). De plus, alors que *p53* est muté dans plus de 50% des tumeurs, cette mutation n'est retrouvée que dans 10% des sarcomes d'Ewing. Cependant, EWS-FLI1 pourrait bloquer directement la voie *p53* pour induire la tumorigénicité (Rorie and Weissman, 2004). L'effet de toutes ces délétions peut également se cumuler puisque la délétion conjointe de *p53*, *p16* et *p14* définit un groupe de tumeurs très résistantes à la chimiothérapie (Huang *et al.*, 2005).

II.2.3. Origine de la tumeur

Décrit en 1921 par James Ewing, le sarcome d'Ewing a été initialement inclus dans la famille des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET). Toutefois, l'origine de cette tumeur n'est pas encore clairement établie et reste un sujet controversé (Kovar, 2010; Lin *et al.*, 2011). Deux théories principales suggèrent que cette tumeur serait issue soit de cellules primaires provenant de la crête neurale, soit de MSC.

a) Origine neuroectodermique

Histologiquement, les cellules de sarcome d'Ewing ressemblent aux cellules primitives neuroectodermiques. De plus, des marqueurs neuronaux précoces tels que le marqueur NSE (neuron-specific enolase) et S-100 peuvent être retrouvés dans ces tumeurs (Cavazzana *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2011). Des études ont également démontré que des stimulations appropriées peuvent induire *in vitro* la différenciation des sarcomes d'Ewing dans la voie neuronale avec l'apparition d'un phénotype neuronal et de marqueurs caractéristiques (Navarro *et al.*, 1990). EWS-FLI1 est également capable d'inhiber la différenciation neuronale de cellules de neuroblastome (Rorie and Weissman, 2004).

Malgré ces différentes données suggérant une origine neuroectodermique, des doutes persistent concernant cette idée. En effet, il a été montré qu'EWS-FLI1 est capable d'induire la différenciation neuroectodermique et d'augmenter l'expression de marqueurs précoces de cette différenciation (Teitell *et al.*, 1999; Hu-Lieskovan *et al.*, 2005b). Ces études suggèrent alors que les caractéristiques neuroectodermiques des sarcomes d'Ewing seraient liées à l'expression d'EWS-FLI1 plutôt qu'à leur origine cellulaire.

b) Origine mésodermique

L'hypothèse alternative est que les sarcomes d'Ewing dériveraient des cellules souches mésenchymateuses. En effet, la localisation osseuse de cette tumeur ainsi que des expériences récentes basées, entre autres, sur l'inhibition d'EWS-FLI1, sont en faveur d'une origine mésenchymateuse des sarcomes d'Ewing.

Des études ont montré que suite à l'inhibition d'EWS-FLI1 dans des lignées de sarcome d'Ewing, ces cellules acquièrent alors la capacité de se différencier dans les voies chondroblastique, ostéoblastique et adipogénique. De plus, dans cette même étude, les auteurs ont montré que le profil d'expression génique de ces cellules tend à converger vers celui des MSC (Tirode *et al.*, 2007). Deux études ont également démontré qu'EWS-FLI1 est capable d'induire la transformation de MSC murines, et que l'implantation de ces cellules chez la souris entraîne la formation de tumeurs dont les caractéristiques (marqueurs cellulaires, morphologie...) sont similaires à celles des sarcomes d'Ewing (Castillero-Trejo *et al.*, 2005; Riggi *et al.*, 2005). De même, l'expression d'EWS-FLI1 dans la lignée de MSC murine pluripotente C3H10T1/2 inhibe la capacité de ces cellules à se différencier en ostéoblastes ou en adipocytes et induit une surexpression de marqueurs neuronaux (González *et al.*, 2007). Cependant, à l'inverse des études réalisées sur un modèle murin, l'expression d'EWS-FLI1 dans

des MSC humaines induit l'expression de gènes nécessaires à leur transformation en cellules cancéreuses similaire aux sarcomes d'Ewing, mais n'est pas suffisante pour induire la formation d'une tumeur chez des souris immunodéficientes (Riggi *et al.*, 2008).

De nombreuses données supportent donc une origine mésenchymateuse du sarcome d'Ewing. Cependant, il est clair que la simple inhibition d'EWS-FLI1 dans ces cellules tumorales n'est pas suffisante pour reverser leur phénotype en MSC saines (Lin *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'expression des marqueurs neuronaux étant strictement dépendante d'EWS-FLI1, une hypothèse consiste à dire que les sarcomes d'Ewing sont d'origine mésenchymateuse mais qu'EWS-FLI1 favorise la différenciation de ces cellules vers un phénotype neuronal.

II.2.4. Diagnostic

a) Tableau clinique

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par une croissance rapide et une destruction massive et extensive des os touchés qui peut induire des douleurs osseuses ainsi que des fractures pathologiques. Les signes révélateurs de la maladie sont tout d'abord une douleur intermittente, puis persistante au repos, dont l'intensité croît généralement progressivement sur plusieurs semaines. Cette évolution progressive entraîne fréquemment des retards de diagnostic. Dans 15 à 20 % des cas, la douleur et la présence d'une masse s'accompagnent également de signes généraux, associés au développement de la tumeur, en particulier de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement. Ces signes généraux sont souvent associés à une maladie métastatique ou à une localisation pelvienne. Dans le cas de métastases pulmonaires, des signes respiratoires révélateurs peuvent être observés et dans le cas d'une tumeur vertébrale, des douleurs radiculaires et une compression médullaire (Bernstein *et al.*, 2006).

Cette tumeur présente un caractère très ostéolytique et très agressif, avec un aspect mal limité associé à une destruction de la corticale osseuse, des appositions périostées et une atteinte des parties molles. Bien que la tumeur ne produise pas d'os, elle est condensante au scanner du fait des dépôts secondaires de calcium sur les travées osseuses. Ainsi, la radiographie, l'IRM (imagerie par résonance magnétique), le scanner thoracique, le scanner osseux et la tomographie par émission de positons peuvent être utilisés pour établir le diagnostic et rechercher d'éventuelles métastases pulmonaires et osseuses.

b) Caractéristiques cellulaires

Seule la biopsie chirurgicale permet de réaliser un diagnostic définitif. Ainsi, au niveau histologique, le sarcome d'Ewing est une tumeur à petites cellules rondes avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé.

Une analyse immunohistochimique montre que dans 90 % des cas, les cellules de sarcome d'Ewing expriment le marqueur CD99, généralement associé aux cellules lymphoïdes et qui jouerait un rôle dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium (Dejana, 2004). Selon leur degré de différenciation neuroectodermique, les cellules de sarcome d'Ewing peuvent aussi exprimer des marqueurs neuronaux tels que le NSE, S-100, la synaptophysine et le CD57 (Riggi and Stamenkovic, 2007).

Ainsi, en plus d'une analyse génique pour rechercher la présence du gène de fusion, des analyses immunohistochimiques permettent également de confirmer le diagnostic.

II.2.5. Le gène de fusion EWS-FLI1

a) Le gène EWS

Le gène *EWS*, localisé sur le chromosome 22, est exprimé de manière ubiquitaire mais sa fonction n'est pas encore très bien connue. *EWS* fait partie des gènes de la famille *TET* codant pour une protéine ayant un domaine impliqué dans la fixation ARN/protéine (Ohno *et al.*, 1994). En effet, les protéines *TET* possèdent un nombre variable de répétitions arginine-glycine-glycine permettant leur fixation à l'ARN et un domaine N-terminal riche en glutamine qui fera partie de la protéine *EWS-ETS* après translocation. Ainsi, *EWS* peut se fixer à l'ARN *in vitro* et s'associer à des facteurs de transcription ou des régulateurs de la transcription, tels que le *TFIID*, l'ARN polymérase II et le *CBP/p300* (Bertolotti *et al.*, 1996). Il peut également interagir avec des protéines impliquées dans l'épissage.

b) Le gène FLI1

Le gène *FLI1*, localisé sur le chromosome 11, est un facteur de transcription, retrouvé principalement chez l'adulte dans les cellules hématopoïétiques, et en plus faible quantité dans le cœur, les poumons et les ovaires. Il semble jouer un rôle dans l'hématopoïèse et la vasculogénèse (Spyropoulos *et al.*, 2000). *FLI1* est composé d'un domaine *ETS* en 5' et 3',

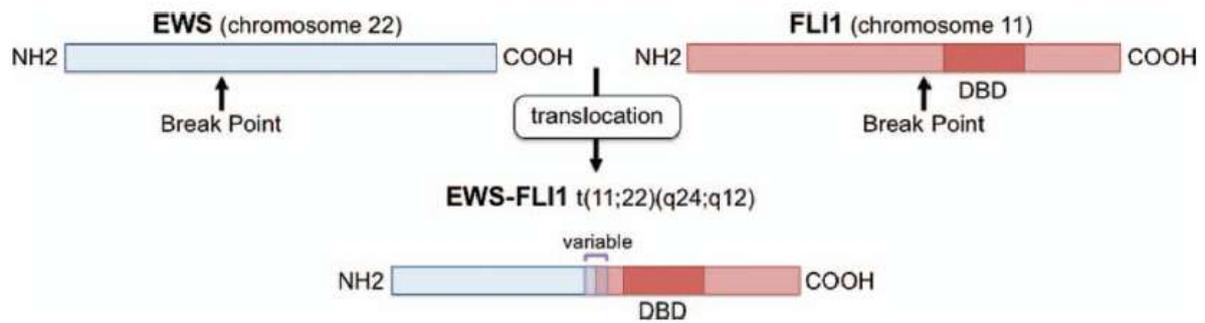


Figure 14 : La protéine de fusion EWS-FLI1

(Potratz *et al.*, 2012)

La variabilité au niveau du point de cassure de FLI1 génère 3 types de fusions distinctes.

DBD : DNA-binding domain

Cibles directes :

Surexpression	RPB7/POLR2G, TNC, UPP1, ID2, TERT, PTPL1/PTPN13, PLD2, MK-STYX, GLI1, Aurora A et B
Inhibition	p21/CDKN1A, TGFβR2, IGFBP3

Cibles indirectes :

Surexpression	EAT-2/SH21B, MFNG, UBE2C, CCND1, MAPT, PP1R1A, NEK2, MYC, PIM3, NKX2-2, CCK, CAV1, CD99, VEGF-A, EZH2, TOPK/PBK, IGF1/IGF1R, DAX1/NROB1
Inhibition	p27/CDKN1B, p57/CDKN1C, ZYX, NOTCH-p53, thrombospondin1 et 2

Tableau 2 : Principales cibles du facteur de transcription EWS-FLI1

(d'après (Mackintosh *et al.*, 2010))

séparés par un domaine FLS (FLI-1 specific) (Rao *et al.*, 1993). Les domaines 5'-ETS et FLS forment le domaine ATA (amino terminal transcriptional activation) alors que le domaine 3'-ETS contient le domaine de fixation à l'ADN et le domaine CTA (carboxyterminal transactivation).

c) Le gène de fusion EWS-FLI1

La translocation t(11;22) génère le gène de fusion EWS-FLI1 codant pour une protéine oncogénique formée par l'association du domaine N-terminal de EWS et du domaine C-terminal de FLI1 (domaine de fixation à l'ADN) (Figure 14). La substitution du domaine N-terminal natif de FLI1 (domaine activateur de la transcription) par le domaine N-terminal d'EWS confère aux domaines activateurs de cette protéine de fusion une capacité accrue à activer les gènes cibles en comparaison des domaines présents sur les facteurs de la famille ETS natifs (May *et al.*, 1993b). L'analyse des séquences d'EWS-FLI1 montre qu'il existe au moins huit formes différentes du transcrit EWS-FLI1 selon les points de cassure de EWS et de FLI1 et donc le nombre d'exons appariés.

Cette translocation aboutit à l'expression par les cellules tumorales d'une protéine de fusion EWS-FLI1 qui se comporte alors comme un facteur de transcription aberrant. Il migre dans le noyau et se fixe à l'ADN sur des sites spécifiques afin d'induire ou de réprimer la transcription de nombreux gènes oncogéniques. Ce facteur de transcription cible des promoteurs contenant des sites de fixation pour ETS et AP-1 en tandem et il se fixe alors à ces éléments en interagissant avec Fos et Jun (Kim *et al.*, 2006). De plus, des études récentes ont démontré qu'EWS-FLI1 se fixe également sur des séquences microsatellites contenant des répétitions GGAA afin de réguler le mécanisme de transcription (Gangwal *et al.*, 2008; Guillon *et al.*, 2009). Par ailleurs, lors de sa fixation au promoteur, EWS-FLI1 peut également s'associer à d'autres protéines (notamment la RNA helicase A) qui jouent alors le rôle de co-activateur de la transcription (Toretzky *et al.*, 2006).

d) Les cibles d'EWS-FLI1

EWS-FLI1 exerce son action oncogénique en modifiant l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Des études transcriptomiques, après surexpression ou inhibition d'EWS-FLI1, ainsi que des études par ChIP ont permis de mettre en évidence un très grand nombre de gènes cibles d'EWS-FLI1. Toutefois, le type de régulation (directe ou indirecte) n'a pas toujours été défini (Mackintosh *et al.*, 2010) (Tableau 2).

Ainsi, EWS-FLI1 contribue à la tumorigenèse des sarcomes d'Ewing soit en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la transformation et la progression tumorale (MYC, IGF1...), soit en réprimant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et l'inhibition de la prolifération (TGF- β RII, p21...).

EWS-FLI1 va notamment induire la transcription du gène NKx2.2, capable à son tour de réprimer ou d'activer la transcription de nombreux gènes, cibles indirectes d'EWS-FLI1. Cette activation de NKx2.2 est indispensable à la transformation oncogénique des cellules de sarcome d'Ewing (Potratz *et al.*, 2012). De plus, la protéine EWS-FLI1 exerce également une action oncogénique en réprimant l'expression de l'IGFBP-3 (IGF-Binding-Protein-3), qui est capable d'inhiber le facteur de croissance IGF-1. Ainsi, l'IGF-1 n'étant plus inhibé, cela va favoriser une prolifération anarchique des cellules (Prieur *et al.*, 2004). Par ailleurs, les mécanismes épigénétiques, tels que des modifications de la chromatine par acétylation et méthylation des histones, régulant l'expression génique, sont impliqués dans le développement tumoral. Ainsi, une autre cible directe clé dont l'expression est augmentée par EWS-FLI1 est EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), qui est capable d'inhiber l'expression de certains gènes par son activité histone méthyl-transférase (Burdach *et al.*, 2009; Potratz *et al.*, 2012).

EWS-FLI1 inhibe également la différenciation ostéoblastique, par sa fixation à Runx2 (Li *et al.*, 2010), ainsi que la différenciation chondrocytaire, adipocytaire et myocytaire. L'expression d'EWS-FLI1 participe aussi au phénotype neuronal peu différencié des cellules de sarcome d'Ewing en surexprimant des gènes critiques du développement de la crête neurale (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005b).

II.2.6. Les traitements actuels

L'enjeu thérapeutique du sarcome d'Ewing est d'assurer à la fois un contrôle systémique et local de la maladie. Les patients doivent donc être pris en charge par des équipes multidisciplinaires comprenant radiologues, anatomopathologistes, chirurgiens et radiothérapeutes, depuis la biopsie et jusqu'à la fin du traitement. Le principal critère pris en compte pour le choix du traitement est la présence ou non de métastases au moment du diagnostic.

a) Traitement des sarcomes d'Ewing localisés

Le traitement des tumeurs localisées repose sur trois étapes. La première est l'étape de cytoréduction grâce à une chimiothérapie néo-adjuvante visant à éradiquer les micrométastases et réduire la tumeur locale. La seconde étape repose sur la résection chirurgicale de la tumeur locale, réalisée si possible avec chirurgie conservatrice et reconstruction. La radiothérapie est fréquemment utilisée dans les formes inopérables ou associée à la chirurgie du fait de la radiosensibilité des sarcomes d'Ewing. La dernière étape consiste en une chimiothérapie adjuvante avec ou sans radiothérapie dans le but de minimiser l'apparition de récurrences. Les protocoles de chimiothérapie utilisent des approches combinatoires associant généralement cinq agents : Vincristine, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Doxorubicine et Etoposide (Marec-Bérard *et al.*, 2010).

b) Traitement des sarcomes d'Ewing métastatiques ou récidivants

Malheureusement, 15 à 25% des patients présentent déjà des métastases au moment du diagnostic. Pour ces formes métastatiques, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de première intention ; la chirurgie peut également être appliquée. Lorsqu'elle est possible, la résection des métastases pulmonaires améliore la survie des patients. Cependant, la prise en charge thérapeutique des patients présentant des formes métastatiques ou récidivantes consiste majoritairement à limiter l'évolution de la tumeur le plus longtemps possible.

Grâce à ces différents traitements, la survie à cinq ans de ce type de tumeur est de 60 % mais chute à 10 % dans les cas de récurrence. Pour les formes localisées, la survie à cinq ans est d'environ 70-75% alors qu'elle ne dépasse pas 15 à 30 % pour les formes métastatiques au diagnostic (Esiashvili *et al.*, 2008; Rodríguez-Galindo *et al.*, 2008).

c) Protocole Euro-EWING 99

Depuis 1999, le traitement de référence du sarcome d'Ewing en Europe suit le protocole clinique Euro-EWING 99 (EUROpean Ewing tumor Working Initiative of National Groups) qui évalue le bénéfice clinique d'une chimiothérapie combinatoire différente associant vincristine, ifosfamide, doxorubicine et étoposide (VIDE). Le protocole thérapeutique est constitué de six cures de cette chimiothérapie néo-adjuvante VIDE associées à une résection chirurgicale quand celle-ci est possible. Une randomisation est ensuite réalisée et les patients sont divisés en trois groupes en fonction du volume tumoral, de

la réponse histologique et de la présence de métastases au moment du diagnostic. Ainsi, pour la chimiothérapie adjuvante, différentes combinaisons de drogues sont évaluées en fonction du stade de la pathologie (pathologie localisée ; métastases pulmonaires ; métastases multifocales). Les premiers résultats intermédiaires publiés, concernant les 281 patients atteints de sarcome d'Ewing primaires disséminés inclus entre 1999 et 2005, montrent une survie sans rechute de 27% et une survie globale de 34% (Ladenstein *et al.*, 2010).

d) Limites des traitements actuels

Malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique grâce à la polychimiothérapie néoadjuvante et à la chirurgie conservatrice, les taux de survie à cinq ans pour les patients atteints de sarcome d'Ewing restent faibles, notamment en cas de métastases, de formes récidivantes ou dans le cas de l'apparition d'une résistance à la chimiothérapie. Par ailleurs, les séquences de traitements, les hospitalisations répétées et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement très lourd aboutissant à une perte réelle de qualité de vie pour les patients. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques apparaît donc nécessaire afin d'améliorer l'espérance et la qualité de vie des patients atteints de sarcome d'Ewing. Pour cela, différentes approches moléculaires sont menées afin de mieux comprendre le développement et la progression de ces tumeurs dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses cibles thérapeutiques potentielles ont déjà pu être mises en évidence avec pour objectif d'induire l'apoptose, de diminuer la prolifération, d'induire la différenciation ou encore de prévenir la dissémination des cellules tumorales. Quelques unes de ces stratégies seront développées dans le paragraphe suivant.

II.2.7. Nouvelles approches thérapeutiques en cours d'étude

a) Inhibition d'EWS-FLI1

L'expression d'EWS-FLI1 étant nécessaire et suffisante au développement des sarcomes d'Ewing, l'inhibition de cette protéine de fusion semble donc être une approche idéale pour le traitement de ce type de tumeurs. En effet, de nombreuses études ont montré que l'inhibition d'EWS-FLI1, que ce soit grâce à des oligonucléotides anti-sens, de l'ARN interférence ou des dominants négatifs est capable d'induire une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing *in vitro* (Kovar *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997) et d'inhiber la croissance tumorale *in vivo* (Lambert *et al.*, 2000; Hu-Lieskovan *et al.*, 2005a). Cependant, la transposition de cette stratégie à la clinique reste à ce jour problématique en

raison de la nécessité de vectoriser ces molécules pour permettre leur entrée dans les cellules.

Ainsi, une approche alternative est d'utiliser des molécules chimiques capables de réguler l'expression d'EWS-FLI1. Il a notamment été montré que la Cytarabine (un agent pharmacologique déjà utilisé dans le traitement des leucémies) induit, par son effet inhibiteur d'EWS-FLI1, une réduction de la viabilité cellulaire *in vitro* et limite la prolifération tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe. Cependant, des tests cliniques ont révélé une importante toxicité (DuBois *et al.*, 2009). Une autre molécule, la Mithramycine, a également été identifiée récemment comme un inhibiteur d'EWS-FLI1 présentant des activités anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* (Grohar *et al.*, 2011).

b) Inhibition de la voie de l'IGF-1

La voie de l'IGF-1, qui joue un rôle important dans la croissance et la survie des cellules tumorales, l'invasion ainsi que le développement métastatique, apparaît dérégulée dans les sarcomes d'Ewing, se révélant ainsi être une cible intéressante. De plus, il a été montré que la transformation de fibroblastes murins par EWS-FLI1 requière la présence de l'IGF-1R, confirmant son rôle essentiel dans l'oncogenèse des sarcomes d'Ewing (Toretzky *et al.*, 1997). EWS-FLI1 réprime l'expression d'IGFBP3, qui est un inhibiteur d'IGF-1, favorisant ainsi la croissance tumorale (Benini *et al.*, 2006). Dans ce contexte, différentes études précliniques et cliniques ont été mises en œuvre pour bloquer la voie de l'IGF-1 dans les sarcomes d'Ewing en ciblant principalement l'IGF-1R. Il a été montré notamment que l'inhibition du récepteur de l'IGF-1, l'IGF-1R, par un inhibiteur spécifique, le NVP-AEW541 induit une inhibition de la migration, du développement de métastases et de l'angiogenèse (Manara *et al.*, 2007). De plus, *in vitro*, l'utilisation d'un siRNA ciblant IGF-1-R augmente la sensibilité des sarcomes d'Ewing à la chimiothérapie (Scotlandi *et al.*, 2002). Actuellement, plusieurs essais cliniques, évaluant l'efficacité d'anticorps anti-IGF-1R, montrent une assez bonne réponse chez les patients atteints de sarcome d'Ewing (Kurzrock *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2010).

c) Autres voies d'étude

EWS-FLI1 agissant comme un facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes, une stratégie thérapeutique envisagée est également de jouer directement sur les cibles d'EWS-FLI1, telles que NKx2.2 ou NROB1. En effet, ces deux cibles dont l'expression est induite par EWS-FLI1 jouent un rôle important dans le processus

oncogénique des sarcomes d'Ewing, en tant que régulateurs de l'expression de nombreux autres gènes (Mackintosh *et al.*, 2010).

Des stratégies anti-angiogéniques sont également en cours d'étude. L'effet d'une combinaison d'un anticorps monoclonal anti-VEGF, le bevacizumab (Avastin®) et de vincristine, cyclophosphamide et topecan est notamment évalué sur des patients atteints de sarcome d'Ewing récidivant dans l'essai clinique COG-AEWS-0521 (DuBois *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les Bisphosphonates constituent également une approche intéressante dans le traitement des sarcomes d'Ewing. En effet, plusieurs études précliniques ont déjà montré l'effet antitumoral des bisphosphonates sur les lignées de sarcome d'Ewing (Sonnemann *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005). De plus, il a été montré récemment au laboratoire que l'administration d'acide zolédronique est capable, dans un modèle préclinique induit chez la souris Nude, d'entraîner une inhibition significative du développement tumoral en site osseux, de réduire les lésions ostéolytiques ainsi que d'accroître la survie des animaux (Odri *et al.*, 2010). D'autre part, l'association de bisphosphonates et d'agents chimiothérapeutiques, ayant déjà montré des effets synergiques dans d'autres types de cancer (Neville-Webbe *et al.*, 2006), semble représenter une approche prometteuse dans le traitement des sarcomes d'Ewing.

Ces différentes stratégies sont pour le moment à un stade expérimental et la réponse relative des tumeurs à ces traitements ainsi que la toxicité observée lors des essais cliniques laissent penser que d'autres options thérapeutiques doivent être envisagées.

III. LES JONCTIONS COMMUNICANTES

Chez les organismes pluricellulaires, la communication entre les cellules d'un même tissu, qu'elles soient du même type ou non, est essentielle. Celle-ci peut s'effectuer de différentes manières :

- Par l'intermédiaire de molécules liées à la membrane plasmique permettant un contact étroit entre deux cellules : communication juxtacrine.
- Par l'intermédiaire de molécules sécrétées telles que des hormones, facteurs de croissance, neurotransmetteurs ou des cytokines qui vont aller agir sur des récepteurs extra- ou intracellulaires de cellules cibles plus ou moins proches : communication paracrine, autocrine, endocrine ou synaptique.
- Par transfert direct de cytoplasme à cytoplasme de molécules entre cellules adjacentes via des canaux transmembranaires : les jonctions communicantes.

III.1. La découverte des jonctions communicantes

Selon le concept de Schleiden, la cellule est une unité autonome circonscrite par une barrière de diffusion, la membrane, qui empêcherait tout échange de matériel avec les cellules environnantes ou avec le milieu extracellulaire (Schleiden, 1938). Il apparaît cependant que des échanges de molécules peuvent se faire au travers de cette membrane cellulaire. Ces observations ont ainsi amené Höber à émettre pour la première fois l'hypothèse de l'existence de canaux hydrophiles dans les membranes plasmiques (Höber, 1936). En 1952, Weidmann montra que malgré leur structure multicellulaire, les fibres cardiaques de Purkinje présentaient une conduction électrique continue, suggérant l'existence d'une continuité cytoplasmique ou d'une très faible résistance membranaire entre les cellules constituant ces fibres (Weidmann, 1952). Par la suite, en 1959, Furshpan et Potter ont mis en évidence, par des études électrophysiologiques, l'existence d'une transmission électrique de cellule à cellule via des zones de faible résistance électrique avec la découverte de la synapse électrique de crustacé. Cette structure était alors considérée comme une spécialisation de la membrane adaptée à la conduction électrique (Furshpan and Potter, 1959). Quelques années plus tard, Kanno et Loewenstein ont montré que non seulement les ions de petite taille mais également une molécule de taille plus importante (la fluorescéine, 376 Da) pouvait franchir la membrane jonctionnelle et passer librement d'une cellule à une autre, y compris dans les tissus non excitables (Kanno and Loewenstein, 1964). Deux ans plus tard (1966), Loewenstein proposa l'hypothèse que la communication

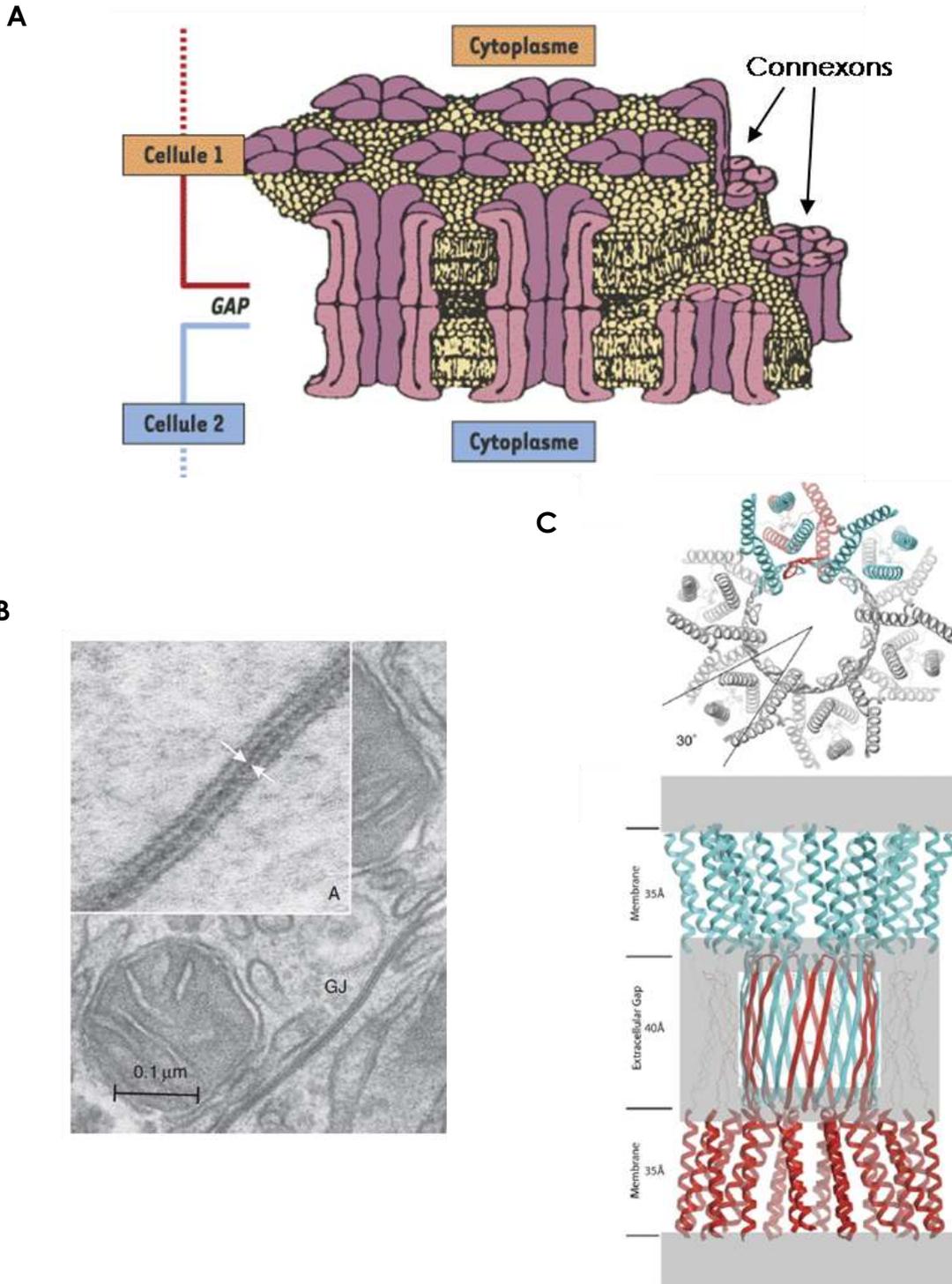


Figure 15 : Structure d'une jonction communicante

A) Représentation schématique d'une jonction communicante, formée par la juxtaposition de 2 héli-canaux, les connexons, provenant chacun d'une des deux cellules en contact. Chaque connexon est constitué de six connexines dont l'arrangement forme un pore central permettant le passage d'ions et de petites molécules entre cellules adjacentes (Mesnil, 2004). **B)** Structure d'une plaque jonctionnelle observée en microscopie électronique (GJ : gap junction ; (Goodenough and Paul, 2009). **C)** Représentation moléculaire des canaux jonctionnels. Le panneau du haut permet de visualiser la rotation de 30° existant entre deux connexons qui s'apparient. Deux sous-unités d'un connexon (en bleu) sont au-dessus d'une sous-unité d'un second connexon (en rouge). Le panneau du bas représente l'assemblage de deux connexons. Les parties en gris désignent les zones de la structure encore incertaines (Yeager and Harris, 2007).

jonctionnelle se ferait au travers de canaux traversant les membranes des deux cellules dans des zones de contact membranaire. Chacun de ces canaux serait constitué d'une paire d'unités membranaires perméables, situées en regard l'une de l'autre et associées pour former le canal jonctionnel (Loewenstein *et al.*, 1966). Mais ce n'est qu'en 1967 que les structures impliquées dans ces phénomènes ont été identifiées, grâce à l'observation de coupes ultrafines de myocarde de souris mettant en évidence la présence d'un espace extracellulaire de 2 à 3 nm au niveau de ces zones de contact membranaire d'où le terme de Jonction Gap (gap signifiant espace) (Revel and Karnovsky, 1967). Enfin, en 1975, le terme de jonctions communicantes apparaît en référence à la fonction de ces structures (Simionescu *et al.*, 1975).

III.2. La structure des jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (ou jonctions gap) sont des structures membranaires, qui résultent de l'agrégation de canaux intercellulaires, permettant le transfert direct de cytoplasme à cytoplasme de petites molécules hydrophiles entre cellules adjacentes (Makowski *et al.*, 1977) (Figure 15). Des études de microscopie électronique et de diffraction optique ont permis de montrer que chaque canal intercellulaire est constitué par l'assemblage de deux héli-canaux transmembranaires, les connexons, provenant chacun d'une des deux cellules en contact (Yeager and Nicholson, 1996; Unger *et al.*, 1999). L'interaction optimale entre les deux connexons est possible par un décalage de 30° d'un connexon par rapport à l'autre autour de l'axe central du canal (Unger *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 1998). Les connexons sont formés de six connexines (Cx) arrangées de telle sorte qu'elles constituent un pore central de 2 nm de diamètre permettant la diffusion de molécules d'un poids moléculaire inférieur à 1200 Da (seconds messagers : calcium, inositol triphosphate, adénosine monophosphate cyclique ; nucléotides ; oses ; ions ; acides aminés) (Loewenstein, 1981). Ces structures assurent donc ce que l'on nomme la Communication Intercellulaire via les Jonctions Gap (CIJC ou GJIC : Gap Junctional Intercellular Communication).

Humain				Souris			
Connexine	Masse moléculaire (KDa)	Gène	Chromosome	Connexine	Masse moléculaire (KDa)	Gène	Chromosome
hCx23	23	GJE1	6q24.1	mCx23	23	Gje1	10
hCx25	25,892	GJB7	6q15				
hCx26	26,2	GJB2	13q11-q12	mCx26	26,411	Gjb2	14 (21.0 cM)
hCx30	30,396	GJB6	13q12	mCx30	30,366	Gjb6	14 (22.5 cM)
hCx30.2	30,313	GJC3	7q22.1	mCx29	28,981	Gjc3	5
hCx30.3	30,419	GJB4	1p34.3	mCx30.3	30,388	Gjb4	4 (57.5 cM)
hCx31	30,817	GJB3	1p34	mCx31	30,901	Gjb3	4 (58.0 cM)
hCx31.1	31,088	GJB5	1p35.1	mCx31.1	31,394	Gjb5	4 (57.5 cM)
hCx31.9	31,933	GJD3	17q21.2	mCx30.2	30,219	Gjd3	11
hCx32	32,024	GJB1	Xq13.1	mCx32	32,003	Gjb1	X (41.0 cM)
pseudo-gene		GJA6P	Xp22	mCx33	32,860	Gja6	X (68.0 cM)
hCx36	36,248	GJD2	15q14	mCx36	36,085	Gjd2	2 (F3)
hCx37	37,413	GJA4	1p35.1	mCx37	37,596	Gja4	4 (57.6 cM)
hCx40	40,38	GJA5	1q21.1	mCx40	40,413	Gja5	3 (45.6 cM)
hCx40.1	40,14	GJD4	10p11.21	mCx39	39,996	Gjd4	18
hCx43	43,008	GJA1	6q21-q23.2	mCx43	43,004	Gja1	10 (29.0 cM)
hCx43 pseudo-gene 1		GJA1P1	5q21.3				
hCx45	45,482	GJC1	17q21.31	mCx45	45,665	Gjc1	11
hCx46	46,655	GJA3	13q12.11	mCx46	46,302	Gja3	14 (21.0 cM)
hCx47	47,427	GJC2	1q42.13	mCx47	46,603	Gjc2	11 (34.0 cM)
hCx50	48,173	GJA8	1q21.1	mCx50	49,597	Gja8	3 (47.1 cM)
hCx59	58,842	GJA9	1p34				
hCx62	61,871	GJA10	6q15-q16	mCx57	57,114	Gja10	4 (16.1 cM)

Tableau 3 : Classification des connexines humaines et murines

(modifié d'après (Söhl and Willecke, 2004; Bosco *et al.*, 2011))

III.3. Les connexines

III.3.1. Les gènes des connexines

La première séquence codante de connexine, correspondant à la Cx32, a été identifiée en 1986, dans le foie murin et humain (Kumar and Gilula, 1986). Puis, rapidement, de nombreuses autres connexines ont été isolées.

Les connexines appartiennent à une famille multigénique de, respectivement, 20 et 21 membres dans les génomes murin et humain, dont 19 d'entre eux sont communs et peuvent être regroupés en paires orthologues (Söhl and Willecke, 2004). Il apparaît cependant que ces connexines orthologues ne sont pas nécessairement exprimées dans les mêmes tissus ou types cellulaires, comme c'est le cas des connexines hCx30.2, hCx31.9, hCx40.1 et hCx62 présentes dans le cœur, alors que leur orthologues murins mCx29, mCx30.2, mCx39 et mCx57 ne le sont pas (Söhl *et al.*, 2003).

Afin de distinguer les différentes connexines, deux nomenclatures ont été mises en place. La première désigne les connexines selon leur espèce d'origine (h = human et m = mouse) suivi du préfixe Cx et de leur masse moléculaire prédite à partir de l'ADNc. Par exemple, hCx43 correspond à la connexine 43 humaine, protéine de 43KDa. Dans la seconde nomenclature, les connexines sont divisées en cinq sous-groupes (α , β , γ , δ et ϵ) prenant en compte leur séquence et la longueur de leur boucle cytoplasmique. Chaque connexine est ainsi désignée par Gj pour Gap junction suivi de la sous-classe et du numéro d'ordre de découverte. Par exemple, la première connexine découverte, la Cx32 appartenant au sous-groupe β est nommée Gj β 1 (Söhl and Willecke, 2004; Bosco *et al.*, 2011) (Tableau 3).

Chez les mammifères, les gènes des connexines sont très conservés au sein des différentes espèces et dériveraient d'une seule séquence originale. Chaque connexine est codée par un gène distinct. La plupart de ces gènes sont situés sur des chromosomes différents mais montrent toutefois une structure similaire avec deux exons séparés par un intron. En effet, la plupart des gènes codant les connexines comprennent un premier exon contenant une région 5' non traduite (5'-UTR) suivi d'un intron de longueur variable et enfin un second exon contenant la séquence codante complète ainsi que la région 3'-UTR. Cependant, il existe quelques exceptions à ce schéma telles que : 1) la région 5'-UTR peut être épissée ou 2) la région codante peut être interrompue par des introns notamment pour la Cx36 (Condorelli *et al.*, 1998; Söhl and Willecke, 2004) (Figure 16). Par ailleurs, deux pseudogènes de connexines (GJA1P1 et GJA6P) ont également été identifiés dans le

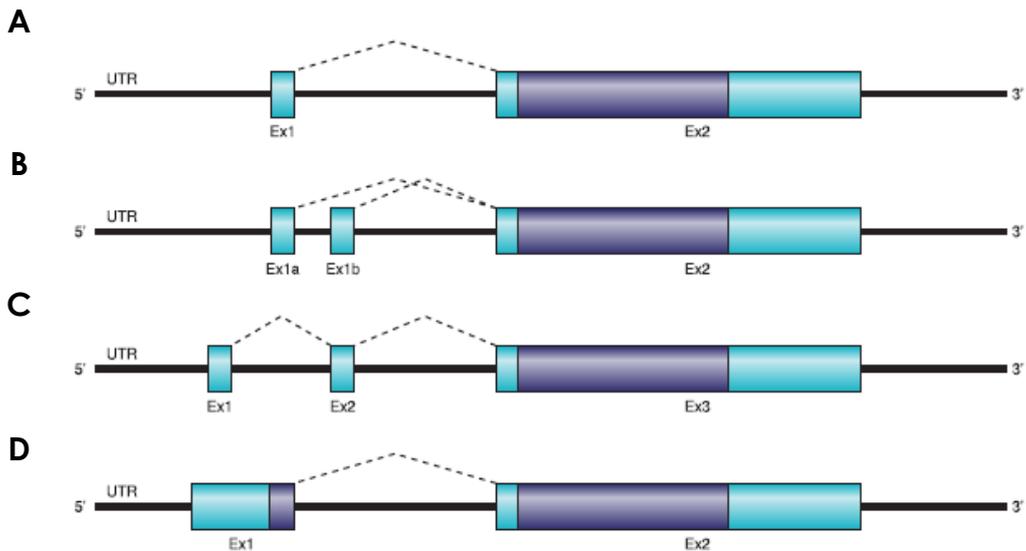


Figure 16 : Structures des gènes des connexines

(d'après Bosco *et al.*, 2011)

Les gènes des connexines montrent une structure similaire. La plupart des gènes codant pour les connexines sont constitués de deux exons séparés par un intron, l'exon 2 contenant la totalité de la séquence codante, comme le montre la figure 1A. Cependant, certaines connexines ne suivent pas ce schéma classique. On peut ainsi retrouver des épissages au niveau de la région 5'-UTR ou encore de la région codante (Figure 1B, C et D).

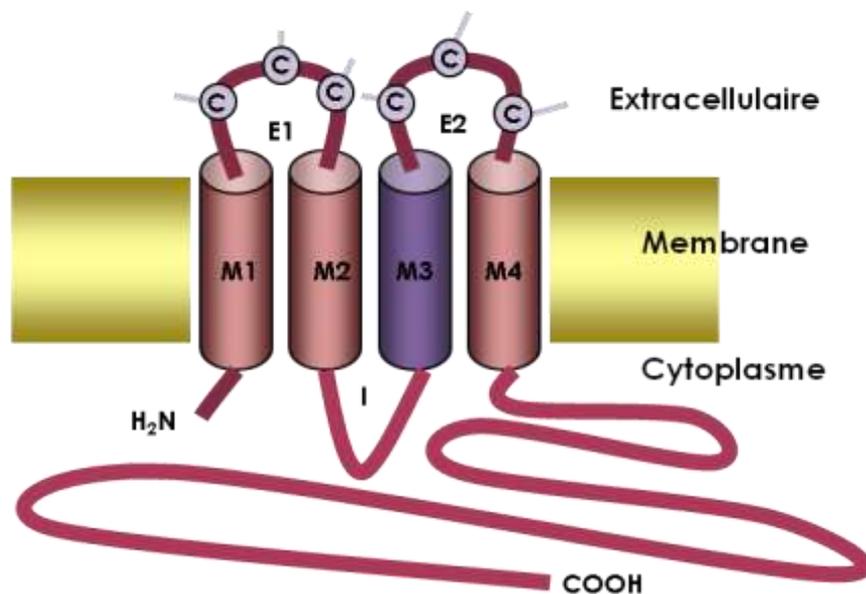


Figure 17 : Structures des connexines

(d'après Mesnil, 2004)

Les connexines sont constituées de quatre domaines transmembranaires (M1 à M4), d'extrémités C et N terminales cytoplasmiques, de deux boucles extracellulaires (E1 et E2) possédant chacune trois cystéines, ainsi que d'une boucle intracellulaire (I).

génomique humaine, cependant leur fonction exacte reste encore inconnue à ce jour (Willecke *et al.*, 1990).

III.3.2. La topologie des connexines

L'organisation topologique des connexines a commencé à être étudiée à partir de 1987, par l'utilisation de différentes approches biochimiques combinant à la fois des protéolyses ainsi que l'utilisation d'anticorps spécifiques de certaines régions (Zimmer *et al.*, 1987). Ces différentes études ont ainsi permis de mettre en évidence que toutes les connexines possèdent une topologie similaire, caractérisée par la présence de quatre domaines transmembranaires M1 à M4, reliés par une boucle intracellulaire I et deux boucles extracellulaires E1 et E2, ainsi que d'extrémités NH₂ et COOH terminales intracytoplasmiques (Milks *et al.*, 1988; Yeager and Gilula, 1992; Zhang and Nicholson, 1994) (Figure 17).

Les connexines des différentes espèces montrent une structure primaire particulièrement bien conservée au niveau de l'extrémité amino-terminale, des quatre domaines transmembranaires et des deux boucles extracellulaires.

Les quatre domaines transmembranaires hydrophobes (M1, M2, M3 et M4), organisés en hélice α parallèles, sont formés de 20 acides aminés. L'analyse de leur séquence protéique a montré que les régions transmembranaires M1, M2 et M4 contiennent principalement des résidus hydrophobes alors que la région M3 comporte des résidus polaires, acides et basiques. Ces résidus hydrophiles, entourant la lumière du canal, suggèrent que le domaine M3 est impliqué dans la formation du pore central par lequel transitent les différentes molécules (Milks *et al.*, 1988).

Chaque boucle extracellulaire E1 et E2, formée respectivement de 31 et 34 acides aminés, possède trois résidus cystéines qui ont conservé la même position au cours de l'évolution. Ces résidus forment des ponts disulfures intramoléculaires qui permettent la stabilisation de la structure tertiaire et confèrent aux connexines une conformation serrée et rigide. Ces boucles extracellulaires semblent ainsi jouer un rôle fondamental dans la formation du canal, en permettant aux connexines d'interagir avec les connexines des cellules adjacentes (John and Revel, 1991; Foote *et al.*, 1998).

Cependant, les connexines se différencient par leur boucle intracellulaire I, ainsi que par leur terminaison carboxyle, dont les séquences et les longueurs sont très variables d'un type à l'autre expliquant les variations de poids moléculaire des différentes connexines (Willecke *et al.*, 2002). En effet, par exemple, l'extrémité COOH terminale de la Cx43 est formée de 156 acides aminés alors que celle de la Cx26 n'en possède que 16 (Evans *et al.*, 2006). Par ailleurs, des sites de phosphorylations par des kinases (PKA, PKC, MAPK...) et

Connexines	Profil d'expression tissulaire
Cx23	Génome humain (la transcription et la traduction n'ont pas été démontrées chez l'Homme).
Cx25	Génome humain
Cx26	Glande mammaire, peau, cochlée, foie, endomètre, cellules gliales, épithélium respiratoire, tubules séminifères, pancréas
Cx30	Peau, cerveau, cochlée, épithélium respiratoire, glande exocrine
Cx31.3	Oligodendrocytes, muscle squelettique, foie, pancréas, rein
Cx30.3	Peau
Cx31	Peau, épithélium respiratoire, cochlée, placenta
Cx31.1	Peau
Cx31.9	Génome humain
Cx32	Foie, peau, cellules de Schwann, oligodendrocytes, endomètre, cellules glandulaires
Cx36	Rétine, cellules β pancréatiques, neurones du système nerveux central
Cx37	Muscle lisse vasculaire, endothélium, ovaires, peau
Cx40	Peau, système nerveux, endothélium, cœur
Cx40.1	Génome humain
Cx43	La connexine la plus exprimée, présente dans au moins 34 tissus différents et 46 types cellulaires : Blastocystes, peau, cornée, fibroblastes, ostéoblastes, reins, glandes mammaires, cellules musculaires cardiaques, cellules épithéliales pulmonaires, kératinocytes, hypophyse antérieure, parathyroïdes, thyroïde, pancréas, surrénales, testicules, ovaires, myomètre, muscle lisse, cellules endothéliales, cristallin, astrocytes, cellules épithéliales rénales tubulaires, macrophages, tissu conjonctif, placenta
Cx45	Cellules épithéliales du canal pancréatique, cœur, neurones, oligodendrocytes, astrocytes, système vasculaire, peau, ostéoblastes, rétine, utérus
Cx46	Cristallin, épithélium alvéolaire
Cx47	Cerveau, moelle épinière, oligodendrocytes
Cx50	Cristallin
Cx58	Génome humain
Cx62	Cellules horizontales de la rétine

Tableau 4 : Profil d'expression tissulaire des connexines chez l'Homme

(modifié d'après (Rackauskas *et al.*, 2010))

d'interactions avec certaines protéines (tubuline, ZO-1...) sont également localisés au niveau de cette extrémité COOH terminale, permettant une régulation fonctionnelle des jonctions gap (Hervé *et al.*, 2004; Lampe and Lau, 2004).

III.3.3. La distribution tissulaire

La présence des connexines est observée dans pratiquement tous les types cellulaires exceptés dans les cellules sanguines circulantes, certains neurones, les cellules musculaires squelettiques adultes et les spermatozoïdes. L'expression de chaque connexine dépend des organes, du tissu et du type cellulaire. Certaines connexines, comme les Cx26 et Cx32, sont exprimées dans de nombreux tissus, alors que d'autres semblent spécifiques d'un tissu donné, comme par exemple, la Cx50, qui est spécifique du cristallin. La Cx43 est, quant à elle, exprimée de manière ubiquitaire. Sa présence a, en effet, été retrouvée dans 34 tissus et 46 types cellulaires.

Par ailleurs, la plupart des organes et des cellules exprime plus d'un type de connexine, c'est le cas, par exemple, dans les hépatocytes dans lesquels sont exprimés à la fois la Cx26 et la Cx32, ou encore des différentes couches de la peau au niveau desquelles ont été identifiées dix isoformes de connexines (Nicholson *et al.*, 1987; Laird, 2006) (Tableau 4). Au sein d'un même tissu, le profil d'expression de chaque connexine est spécifique du type cellulaire. La co-expression de multiples connexines par un même type cellulaire permet l'existence de possibles mécanismes compensatoires en cas de perte ou de mutation d'un membre de cette famille.

Il peut également exister un profil d'expression spatio-temporel des connexines dans un même tissu ou type cellulaire. En effet, il a été montré que la Cx40, fortement exprimée dans le cœur des souris durant la période fœtale, voit son expression diminuer après la naissance. De plus, cette même connexine est également exprimée différemment entre le ventricule droit et le ventricule gauche (Van Kempen *et al.*, 1996).

III.3.4. Compatibilité entre connexines

La co-expression de plusieurs connexines par un même type cellulaire favorise également l'assemblage de connexines différentes afin de générer différents types de connexons. Ainsi, on observe *in vivo* et *in vitro* deux types de connexons : des connexons homomériques, constitués d'un seul type de connexines, et des connexons hétéromériques, composés de connexines de plusieurs types. Ces différentes structures des connexons donnent lieu à des jonctions gap homotypiques (association de deux connexons identiques) et hétérotypiques (deux connexons différents) (Figure 18).

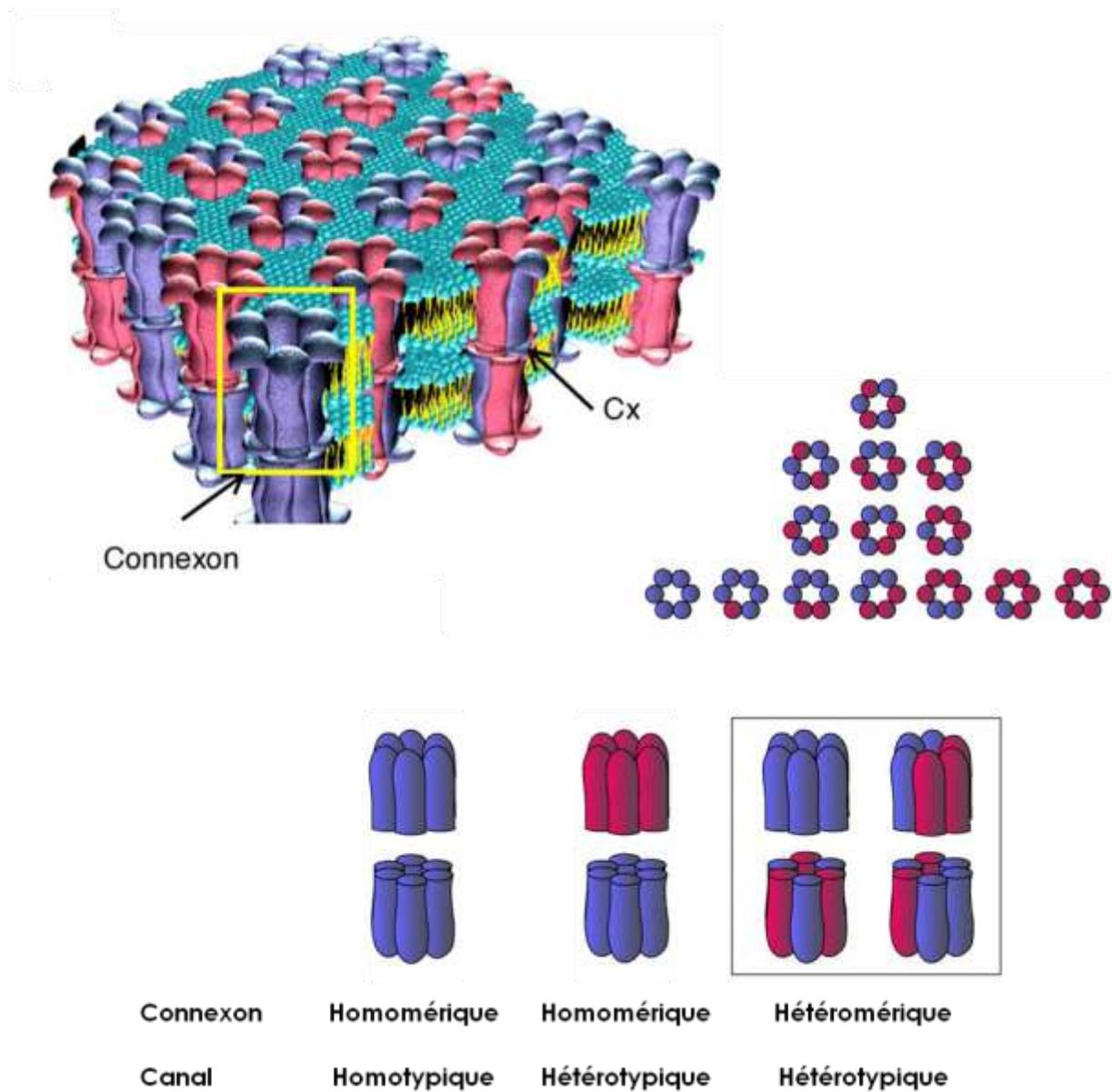


Figure 18 : Illustration des différentes conformations de connexons possibles

(d'après Cottrell & Burt, 2005)

Les connexons peuvent se présenter sous deux formes : soit homomériques, c'est-à-dire constitués d'un seul type de connexines, ou hétéromériques, composés de connexines de plusieurs types. Ces différentes conformations de connexons forment des jonctions gap homotypiques (association de deux connexons identiques) ou hétérotypiques (deux connexons différents).

Différentes combinaisons sont donc possibles. Par exemple, l'existence de connexons hétéromériques, constitués de Cx26 et de Cx32 a été montrée au niveau du foie (Sosinsky, 1995), ou encore de Cx46 et de Cx50 au niveau du cristallin (Hopperstad *et al.*, 2000). Il s'avère que les différentes configurations des connexons formant une jonction gap influent sur la perméabilité sélective du canal. En effet, il a été montré que des canaux hétéromériques Cx26/Cx32 montrent une perméabilité sélective aux différents inositol phosphates que les canaux homomériques correspondants n'ont pas (Ayad *et al.*, 2006).

Des études sur la compatibilité des connexines, réalisées par des expériences de co-expression dans des cellules de mammifères ou dans des ovocytes de Xénopes, ont permis de mettre en évidence les différentes conformations possibles (Cottrell and Burt, 2005). Par exemple, il a été montré que les Cx26 et Cx43 ne forment pas de connexon hétéromérique (Gemel *et al.*, 2004). Il semble que les connexines aient la possibilité de s'associer lorsqu'elles appartiennent à la même sous classe.

III.3.5. Le turn-over des connexines

Les connexines ont une demi-vie courte de seulement quelques heures (1,5 à 5 heures) et sont préprogrammées pour être continuellement synthétisées puis dégradées (Fallon and Goodenough, 1981; Laird *et al.*, 1991) (Figure 19). Il est probable qu'une demi-vie courte permette ainsi aux connexines de répondre à des exigences physiologiques en up- ou down-régulant rapidement le couplage jonctionnel.

La majorité des connexines suivent la voie classique de sécrétion. Elles sont donc traduites dans le réticulum endoplasmique dans lequel elles vont, pour la plupart, s'oligomériser en connexon (Falk *et al.*, 1994; Ahmad *et al.*, 1999). L'oligomérisation des connexines est un mécanisme progressif qui débute dans le réticulum endoplasmique, se poursuit dans le compartiment intermédiaire (ERGIC : Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment), puis se termine dans l'appareil de Golgi. Toutefois, la Cx26 semble être une exception à cette règle, puisqu'il a été montré qu'elle emprunterait une voie particulière en passant directement du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (Ahmad and Evans, 2002).

Bien que les connexines ne soient pas glycosylées, il n'est pas exclu qu'elles soient sous la protection de protéines chaperonnes jusqu'à ce qu'elles atteignent leur état stable et

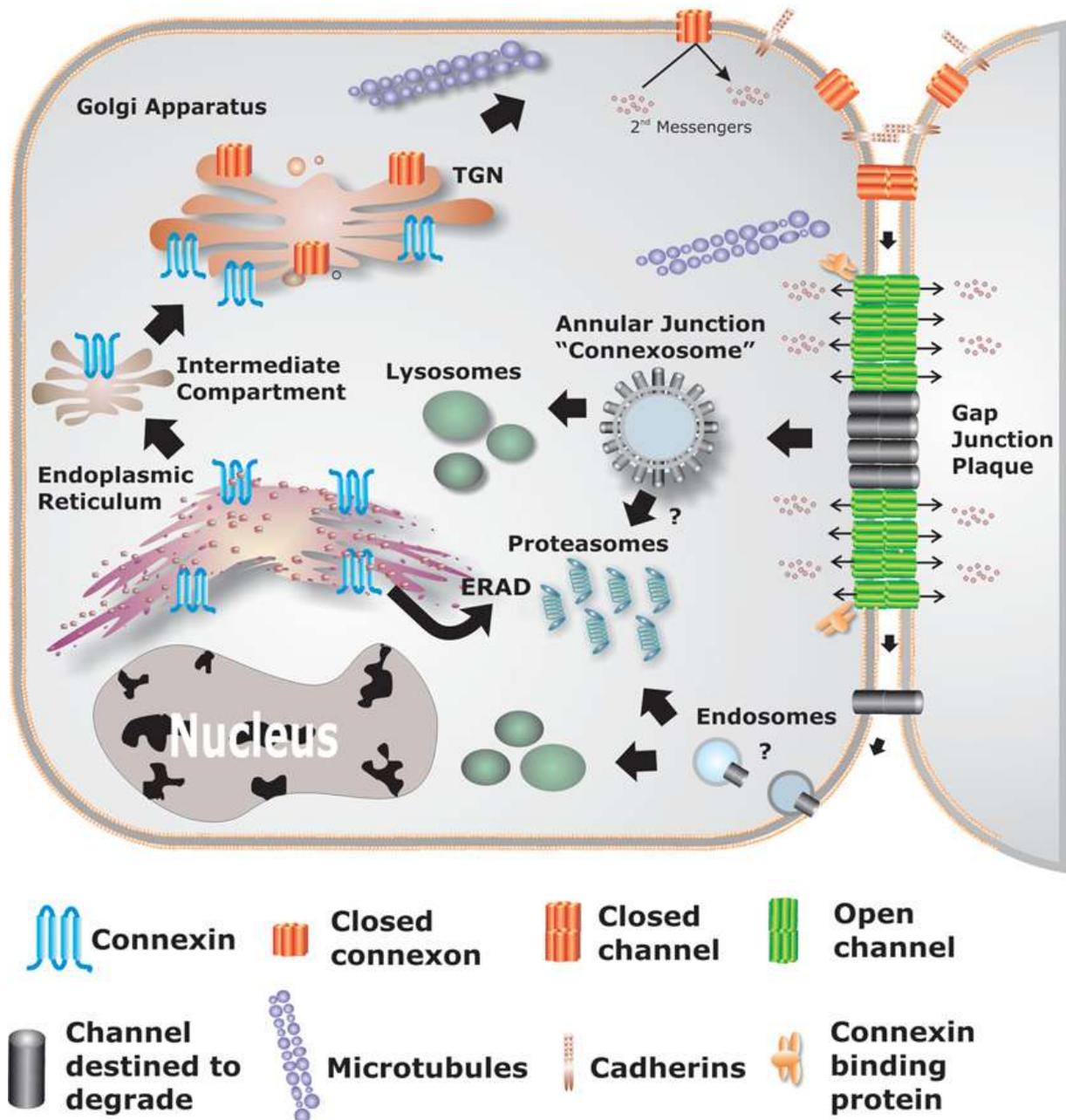


Figure 19 : Cycle de vie des connexines

(d'après Laird, 2006)

Les connexines sont traduites dans le réticulum endoplasmique. Si leur structure est correctement repliée, leur oligomérisation en connexon se poursuivra ensuite dans le compartiment intermédiaire puis l'appareil de Golgi. Dans le cas contraire, elles seront dégradées par le système de contrôle qualité ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Une fois oligomérisés, les connexons sont acheminés à la membrane plasmique via, entre autres, les microtubules. Puis par diffusion à travers la membrane, les connexons vont s'assembler avec les connexons présents à la membrane plasmique de la cellule adjacente pour former des canaux jonctionnels. Les nouveaux canaux jonctionnels seront localisés à la périphérie de la plaque jonctionnelle alors que les anciens seront au centre. Un fragment ou la totalité de la plaque jonctionnelle sera ensuite internalisée dans une structure vésiculaire appelée connexosome, puis dégradée soit au niveau des lysosomes ou des protéasomes.

définitif. En effet, le fait qu'elles possèdent des résidus cystéines formant des ponts disulfures entre les deux boucles extracellulaires, suggère qu'elles soient sous la surveillance, au moins, de protéines disulfide isomérases (Laird, 2006).

Suite à leur sortie du réseau trans-golgien, les connexines, oligomérisées sous forme de connexons, vont emprunter différentes voies de transport afin d'être acheminées à la membrane plasmique. Certaines études suggèrent que les connexons seraient transportés le long des microtubules même si leur intervention n'est pas clairement définie (Johnson *et al.*, 2002; Lauf *et al.*, 2002). Une fois insérés dans la membrane sous forme d'hémicanaux, les connexons diffusent librement dans la bicouche lipidique guidés par la N et E-cadhérine (Jongen *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 2005; Govindarajan *et al.*, 2010), afin de s'assembler avec un connexon d'une cellule adjacente et ainsi former une jonction gap. Cette dernière diffusera ensuite vers la zone jonctionnelle. Il a notamment été montré, par l'utilisation de Cx43 marquée par la GFP, que les canaux jonctionnels nouvellement formés sont localisés à la périphérie de la plaque jonctionnelle alors que les plus anciens se situent au centre. Cette observation suggère que les anciens canaux au centre de la plaque jonctionnelle sont destinés à être internalisés puis dégradés (Laird, 2006).

La dégradation des jonctions communicantes ne correspond pas à la séparation des hémicanaux mais à l'internalisation d'une partie ou de l'ensemble des jonctions communicantes en une structure vésiculaire à double membrane appelée jonction annulaire ou plus récemment connexosomes (Jordan *et al.*, 2001). Ces connexosomes seront par la suite dégradés soit au niveau des lysosomes ou d'après des données récentes, au niveau du protéasome.

III.3.6. Les partenaires protéiques des connexines

Diverses études ont montré l'existence d'interaction entre les connexines et de nombreuses protéines, telles que des protéines du cytosquelette, des enzymes (protéines kinases et phosphatases), des protéines associées aux jonctions serrées.... (Hervé *et al.*, 2011). Ces protéines partenaires des connexines jouent un rôle important dans la stabilité des jonctions communicantes, leur localisation ainsi que dans la régulation de la communication jonctionnelle.

Les connexines interagissent notamment avec des protéines membranaires associées aux jonctions serrées telles que les occludines et les protéines appartenant à la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK) telles que ZO-1 et ZO-2. ZO-1 se lie à

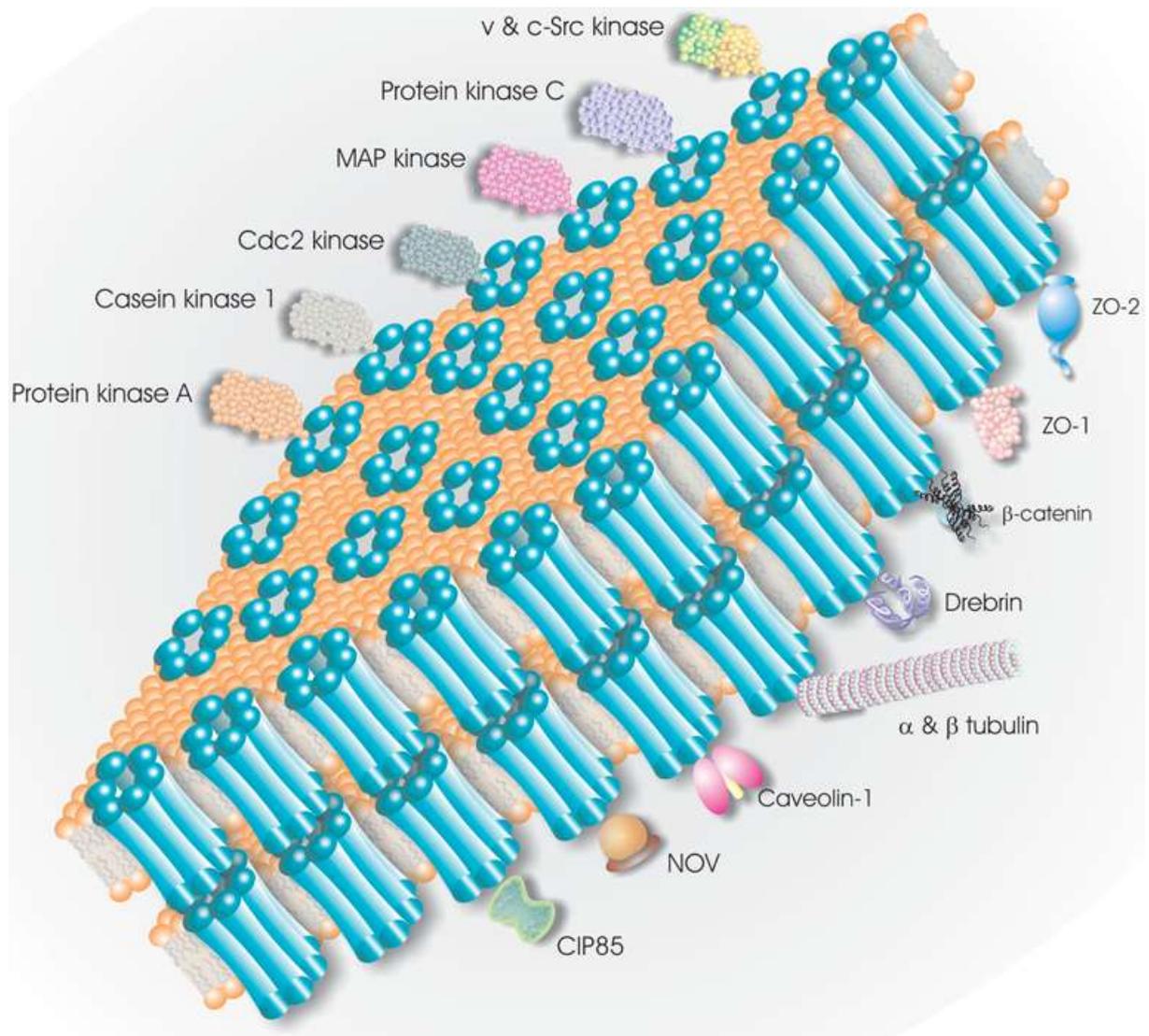


Figure 20 : Les partenaires protéiques des connexines

(d'après Laird, 2006)

De nombreuses protéines interagissent avec les connexines au niveau de leur extrémité C-terminale. Ces interactions jouent un rôle dans la stabilité des jonctions communicantes, leur adressage à la membrane, ainsi que dans la régulation de la communication jonctionnelle.

de nombreuses connexines telles que la Cx43, la Cx32, la Cx45, la Cx46 ou encore la Cx50 et cette interaction se ferait par l'intermédiaire de son domaine PDZ (Giepmans *et al.*, 2001; Singh and Lampe, 2003). L'interaction de ZO-1 avec les connexines participerait à la stabilité des jonctions communicantes et interviendrait également dans l'adressage de la Cx43 à la membrane plasmique.

De plus, il s'avère que des protéines d'adhérence cellulaire telles que les caténines, la N-cadhérine ainsi que la E-cadhérine participeraient à la bonne conformation des jonctions communicantes. En effet, il a été montré que la surexpression de la E-cadhérine dans des cellules cancéreuses d'utérus, exprimant faiblement cette protéine et présentant une communication intercellulaire faible, augmente la présence de la Cx43 à la membrane co-localisée avec la E-cadhérine (Jongen *et al.*, 1991). L'implication de ces protéines dans la transduction de signaux suggère également un rôle dans la régulation du couplage intercellulaire. En effet, l'interaction de la Cx43 avec la β -caténine suggère que cette dernière joue un rôle dans l'expression de la Cx43 ainsi que dans la régulation de la communication intercellulaire via notamment un « cross-talk » avec la voie de signalisation Wnt (Ai *et al.*, 2000).

D'autre part, la plupart des connexines possèdent des sites de phosphorylation au niveau de leur extrémité C-terminale, ce qui suggère une interaction, au moins transitoire, avec des protéines kinases. La phosphorylation des connexines par des kinases, telles que v- et c-Src, PKC, PKA et les MAPK joue un rôle dans l'état d'ouverture du canal jonctionnel (Lampe and Lau, 2004; Moreno, 2005).

D'autres protéines, telles que les α - et β -tubulines interagiraient avec l'extrémité carboxyle de la Cx43 afin de permettre l'adressage à la membrane de cette dernière (Giepmans *et al.*, 2001). Les ubiquitines, quant à elles, en se fixant aux connexines, participeraient à la dégradation des jonctions communicantes au niveau du protéasome (Laing and Beyer, 1995).

Un grand nombre de partenaires protéiques des connexines a déjà été décrit et seules quelques unes ont été citées dans ce paragraphe. Cependant, le rôle de ces différentes interactions reste pour la plupart encore flou (Laird, 2006; Hervé *et al.*, 2011) (Figure 20).

III.4. La communication jonctionnelle

Le rôle principal des jonctions communicantes est d'établir une communication intercellulaire en permettant la diffusion d'ions et de petites molécules hydrophiles entre cellules adjacentes.

III.4.1. Le couplage électrique

Les jonctions communicantes permettent le passage de courant ionique (Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , K^+) entre les cellules, générant ainsi une communication électrique. Ce couplage, détecté en 1952 par Weidmann, par un enregistrement effectué avec des microélectrodes placées entre des cellules cardiaques (Weidmann, 1952), a été corrélé, par microscopie électronique, à la présence de jonctions communicantes (Robertson, 1963). Le couplage électrique, mis en évidence dans un premier temps dans des tissus excitables, fut ensuite démontré dans des tissus épithéliaux tels que les hépatocytes de souris (Penn, 1966). Le couplage électrique par échange d'ions est indispensable à certains types cellulaires dont les fonctions sont associées à une dépolarisation membranaire, tels que les neurones, les cellules musculaires lisses, les cellules cardiaques, les cellules sécrétrices et sensorielles. Cette forme de couplage génère ainsi une réponse synchronisée des cellules (Bruzzone *et al.*, 1996).

III.4.2. Le couplage métabolique

La diffusion de molécules hydrophiles par les jonctions communicantes a été mise en évidence dans les années 60 (Kanno and Loewenstein, 1964). Différentes approches ont montré que les jonctions communicantes sont perméables à des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1200 Da, telles que des nucléotides (ATP, ADP et GTP), des acides aminés, des cofacteurs vitaminiques, des petits peptides, des sucres ainsi que des seconds messagers (AMPC, IP3, Ca^{2+}) (Saez *et al.*, 2003; Goodenough and Paul, 2009). Cette propriété met en avant l'importance des jonctions communicantes pour certaines fonctions biologiques essentielles telles que la prolifération, la différenciation ou encore la contraction. Il s'avère également que des siRNA ainsi que des miRNA peuvent passer au travers des jonctions communicantes (Wolvetang *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2011).

III.4.3. La perméabilité jonctionnelle

Le passage des ions et des molécules s'effectue selon un gradient électrochimique. Plusieurs approches, comprenant des mesures de conductance unitaire ou de sélectivité selon la charge ionique, ont été menées afin de déterminer les propriétés de perméabilité des jonctions gap (Harris, 2007). Des traceurs fluorescents de différents poids moléculaires et charges tels que le *Lucifer Yellow* et l'iodure de propidium ont été testés pour évaluer la sélectivité et la perméabilité des jonctions gap composées de connexines différentes (Elfgang *et al.*, 1995). Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence que les propriétés de couplage des canaux jonctionnels varient suivant le type de connexines exprimé par les cellules en contact. En effet, toutes les connexines ne présentent pas la même conductance ni le même type de régulation. L'utilisation de traceurs fluorescents a également permis d'estimer le diamètre du pore du canal jonctionnel, qui serait compris entre 1,6 et 2 nm chez les mammifères, et de mettre en évidence que les jonctions gap sont spécifiquement perméables à certaines molécules selon les connexines qui les composent. Ainsi, les molécules qui vont différer en taille, forme et charge, vont pouvoir diffuser différemment selon le type de connexine formant le canal jonctionnel, générant ainsi une grande sélectivité moléculaire. Il a été montré, par exemple, que les canaux composés de Cx32 sont plus perméables à l'adénosine que ceux formés de Cx43, qui présentent eux une perméabilité très importante pour l'ATP (Goldberg *et al.*, 2002).

De plus, les spécificités d'appariement des connexines influent sur la perméabilité des canaux jonctionnels, suggérant des échanges sélectifs.

III.4.4. Régulation de la perméabilité jonctionnelle

La conductance globale (G) entre deux cellules dépend de la conductance unitaire de chaque canal (γ), de leur probabilité d'ouverture (P) et du nombre total de canaux. La conductance globale est ainsi définie par la formule suivante : $G = \gamma \times P \times N$. La probabilité d'ouverture des canaux intercellulaires étant très élevée est considérée comme constante. La conductance globale entre deux cellules dépend essentiellement de la conductance unitaire (γ) de chaque canal et du nombre total de canaux (N).

A ce jour, un nombre de facteurs importants est connu comme étant capable de réguler la communication intercellulaire. Cette régulation peut se faire à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel ou directement sur l'ouverture des canaux jonctionnels.

a) Régulation de la conductance unitaire

La conductance unitaire de chaque canal peut être régulée au niveau de la fermeture ou de l'ouverture par différents facteurs tels que certains ions, le niveau de phosphorylation des connexines ou encore par des composés lipophiles.

➤ Le calcium (Ca^{2+}) et les protons (H^+)

Ces ions entraînent la fermeture des canaux jonctionnels. La sensibilité des jonctions communicantes vis-à-vis de la concentration en Ca^{2+} ou du pH intracellulaire varie en fonction du type de connexine considéré ainsi que du type cellulaire.

Le Ca^{2+} fut le premier ion pour lequel une régulation fonctionnelle de la communication intercellulaire a été démontrée. Ce travail a montré que lors d'une lésion localisée du tissu cardiaque, les cellules endommagées sont rapidement isolées des cellules voisines intactes par l'établissement d'une barrière de forte résistance électrique liée à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (Délèze, 1975). Les connexons peuvent laisser transiter cet ion lorsque les concentrations ne dépassent pas 150 nM, au-delà de cette valeur, les canaux se ferment (Peracchia, 2004). Certaines études suggèrent, par l'utilisation de bloqueurs, que l'effet du Ca^{2+} sur les canaux impliquerait la calmoduline. En effet, cette protéine ayant une haute affinité pour le Ca^{2+} , est également capable d'interagir avec les connexines au niveau de leur extrémité C-terminale (Peracchia *et al.*, 2000; Sotkis *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

De même, l'acidification du milieu intracellulaire diminue la communication jonctionnelle. La protonation directe ou indirecte des canaux reste encore à être élucidée. Cependant, la plupart des études concluent que les protons affecteraient l'ouverture des canaux de manière indirecte, par protonation d'intermédiaires cytoplasmiques tels que la taurine (Bevans and Harris, 1999). Seules quelques études ont montré un effet rapide et direct des protons sur la fermeture des canaux jonctionnels (Trexler *et al.*, 1999).

➤ La phosphorylation des connexines

Les connexines, excepté la Cx26, peuvent être phosphorylées au niveau de leur partie C-terminale, ce qui permet de réguler leur conductance unitaire. De nombreux sites potentiels de phosphorylation, contenant des résidus thréonine, tyrosine et sérine, ont été identifiés sur cette extrémité carboxyle. Des sites de phosphorylations ont également été retrouvés au niveau de la boucle cytoplasmique de certaines connexines, notamment de la

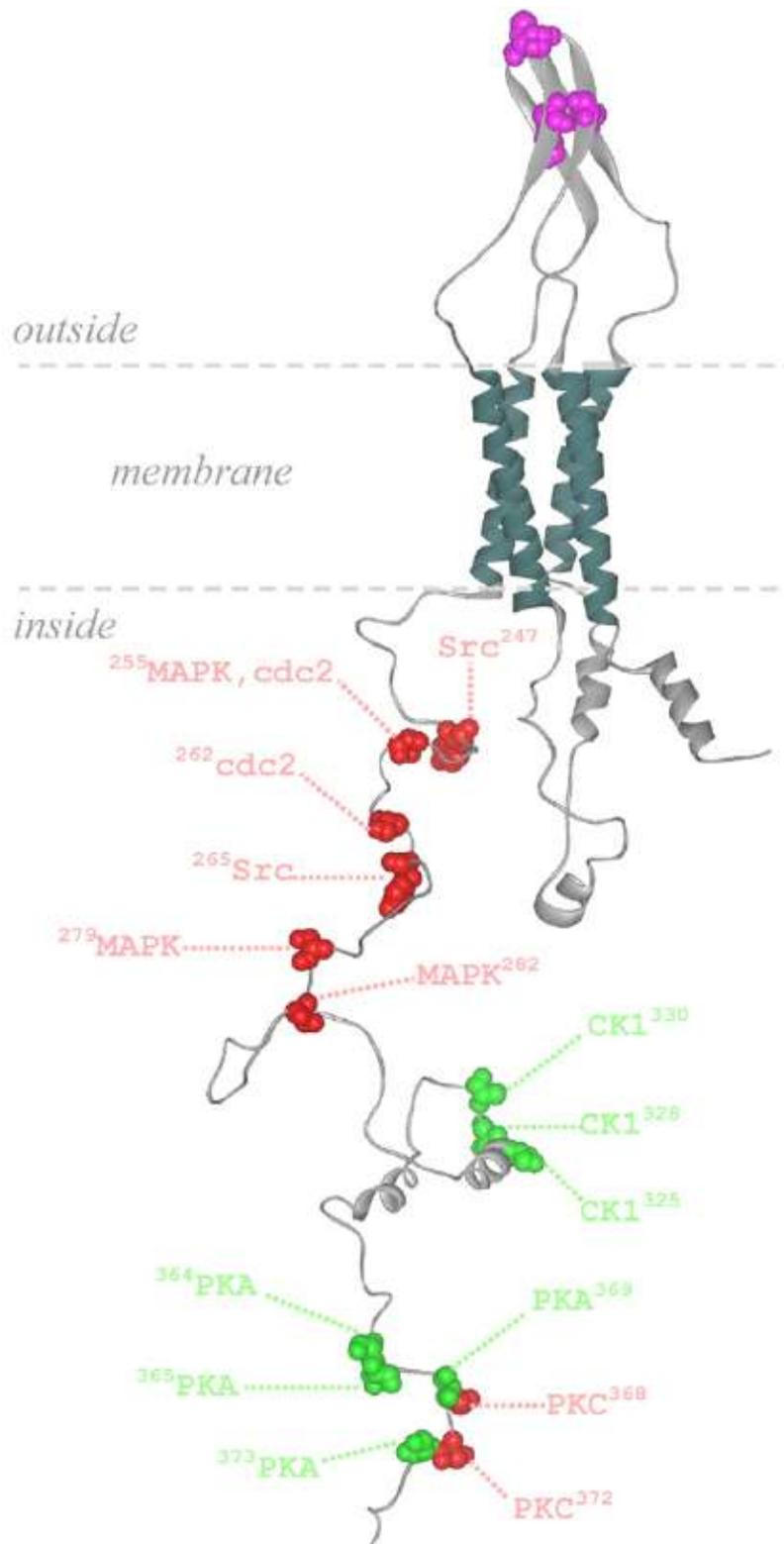


Figure 21 : Les différents sites de phosphorylations localisés au niveau de l'extrémité C-terminale de la Cx43

(d'après Pahuja et al., 2007)

La phosphorylation des sites, marqués en vert, entraînent une augmentation de la communication jonctionnelle alors que celle des sites, marqués en rouge, diminuent la communication jonctionnelle.

Cx36 et de la Cx56 (Urschel *et al.*, 2006; Rackauskas *et al.*, 2010). Il a été montré, notamment par l'utilisation de phosphatases chimiques, que la phosphorylation des connexines joue un rôle important dans la régulation de l'ouverture des canaux, en modulant notamment le temps moyen d'ouverture du canal ainsi que sa probabilité d'ouverture (Verrecchia *et al.*, 1999; Duthe *et al.*, 2000). En effet, il semblerait que l'extrémité C-terminale soit capable d'interagir avec la boucle cytoplasmique afin de fermer le canal jonctionnel (Hervé *et al.*, 2011). De plus, la phosphorylation entraîne une modification de la charge nette de la partie C-terminale, qui à son tour, peut moduler la sensibilité des connexines au voltage et au pH (Rackauskas *et al.*, 2010). Les effecteurs de cette phosphorylation sont essentiellement la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). Selon le type cellulaire considéré, ces kinases augmentent ou diminuent la communication jonctionnelle. Le cas de la Cx43 est le plus décrit : d'une façon générale, il semblerait que la communication jonctionnelle soit augmentée en réponse à la phosphorylation de Cx43 par la PKA (Atkinson *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 2006) alors qu'elle serait diminuée en réponse à la phosphorylation de Cx43 par la PKC (Sirnes *et al.*, 2009). D'autre part, il a également été montré que la PKA augmente l'insertion de la Cx43 à la membrane plasmique (Paulson *et al.*, 2000; TenBroek *et al.*, 2001) alors que la phosphorylation par la PKC ou les MAPK entraîne son internalisation (Leithe and Rivedal, 2004) (Figure 21).

➤ L'effet du voltage

La conductance jonctionnelle est également sensible au potentiel de membrane ou au potentiel transjonctionnel, correspondant à la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane jonctionnelle. Cette sensibilité au voltage est notamment importante pour le couplage intercellulaire des cellules excitables (Rackauskas *et al.*, 2010).

➤ Les composés lipophiles

Les alcools aliphatiques, les acides gras ou encore certains stéroïdes (la testostérone et l'œstradiol), en s'insérant dans la membrane plasmique, peuvent perturber l'environnement lipidique des canaux jonctionnels et entraîner un changement de conformation des connexines qui a pour conséquence la fermeture des canaux (Hervé *et al.*, 1996; Pluciennik *et al.*, 1996; Verrecchia and Hervé, 1997a, 1997b).

b) Régulation du nombre de canaux

La régulation du nombre de canaux dépend de la balance entre leur synthèse et leur dégradation, c'est-à-dire, de leur demi-vie et donc de celle de leurs protéines constitutives, les connexines. Ainsi, le contrôle de l'expression des connexines et en particulier la régulation transcriptionnelle de leurs gènes semble être un événement majeur (Teunissen and Bierhuizen, 2004).

La transcription des gènes codant les connexines est régulée par diverses substances biologiques, telles que des cytokines comme le TGF- β (Tacheau *et al.*, 2008a) ou le TNF- α (Tacheau *et al.*, 2008b) ou des hormones telles que les œstrogènes ou la PTH, qui vont activer différentes voies de transduction du signal et par conséquent des facteurs de transcription variés. Ces facteurs de transcription vont alors pouvoir aller se fixer sur certains sites de la région promotrice des gènes des connexines. En effet, la plupart des connexines possèdent, dans la structure de leur gène, un promoteur P1 localisé à 300 paires de bases environ de l'exon 1. Ce promoteur contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription qui varient en fonction du modèle cellulaire ainsi que du type de connexine considéré. Concernant la Cx43, une région conservée d'environ 150 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, correspondant à la région promotrice, a été cartographiée chez l'homme et la souris, dans divers types cellulaires exprimant la Cx43 (Teunissen and Bierhuizen, 2004). Chez les deux espèces, on retrouve dans cette région quatre éléments de liaison à Sp1 et Sp3 et au moins un élément de liaison à AP-1 (Oyamada *et al.*, 2005). Par exemple, il a été montré que l'activation du site AP-1, composé des deux protéines jun et fos, permettait d'augmenter l'expression de la Cx43 dans les cellules musculaires lisses utérines (Geimonen *et al.*, 1996).

III.5. Rôles des jonctions communicantes

La diversité des connexines, leur distribution dans tout l'organisme ainsi que la variété de leur régulation suggèrent qu'elles participent à des fonctions physiologiques diverses. En effet, dans les tissus excitables, les jonctions communicantes, par l'échange d'ions, participent à la synchronisation des activités électriques et à la propagation du potentiel d'action. Elles permettent ainsi la transmission de l'influx nerveux par les synapses électriques ainsi que la synchronisation des contractions cardiaques (Duffy *et al.*, 2006). Dans les tissus non excitables, elles interviennent, entre autres, dans la nutrition des tissus faiblement

vascularisés tels que le cristallin ou encore dans la propagation de vagues calciques dans des épithélia sécréteurs (Goodenough, 1992; Clair *et al.*, 2001).

Les jonctions communicantes jouent également un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le développement, le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

III.5.1. Rôle des jonctions communicantes au cours du développement

Les jonctions communicantes ont un rôle important dans le développement et la morphogénèse des organes. En effet, il s'avère que la Cx43 est exprimée dès le stade 2 cellules chez la souris, puis d'autres connexines telles que la Cx30.3, la Cx31, la Cx31.1, la Cx40 et la Cx45 apparaissent au stade 8 cellules (Davies *et al.*, 1996). Certains auteurs considèrent que les jonctions communicantes participeraient à la mise en place de gradients morphogénétiques en compartimentant l'embryon (Risek and Gilula, 1991; Wei *et al.*, 2004). De plus, la communication jonctionnelle serait également impliquée dans l'asymétrie droite-gauche correspondant à la localisation et à la géométrie des organes (Levin, 2005).

Des études réalisées sur des modèles de souris transgéniques et « knockout » pour certaines connexines ont permis de mettre évidence le rôle indispensable de ces protéines au cours du développement ainsi que pour la fonction de nombreux tissus et organes (Wei *et al.*, 2004). Par exemple, les souris invalidées pour le gène de la Cx43 présentent, à leur naissance, des malformations osseuses ainsi que des malformations cardiaques létales, qui seraient dues à un défaut de migration des cellules de la crête neurale (Reaume *et al.*, 1995). De plus, les souris Cx45^{-/-} meurent *in utero* d'une déficience cardiaque (Kumai *et al.*, 2000) et celles Cx37^{-/-} présentent des défauts de maturation des ovocytes (Kidder and Mhawi, 2002).

III.5.2. Rôles des jonctions communicantes dans la différenciation cellulaire

Les jonctions communicantes ont également un rôle prépondérant dans la différenciation de nombreux tissus tels que l'os, le muscle et la peau. Ainsi, par exemple, au niveau de la peau, le profil d'expression des connexines change durant la formation de l'épiderme, la Cx26 étant exprimée plus précocement que la Cx43 (Arita *et al.*, 2002). De même, le profil d'expression des connexines varie également au cours de la spermatogénèse, selon l'étape ainsi que le type cellulaire considérés, suggérant un rôle essentiel de la communication jonctionnelle dans ce processus (Pointis *et al.*, 2010).

L'importance du couplage jonctionnel durant le processus de différenciation cellulaire a été mise en évidence sur divers types cellulaires.

En effet, alors que les cellules musculaires squelettiques adultes n'expriment pas de jonctions communicantes, leurs progéniteurs non différenciés présentent un fort couplage. Puis, lors de la différenciation des cellules musculaires myoblastiques en myotubes, le couplage jonctionnel est diminué. L'inhibition de ce couplage altère l'expression de facteurs myogéniques tels que la myogénine. De plus, la surexpression de la Cx43 dans des rhabdomyosarcomes permet de rétablir la fusion et la différenciation des cellules musculaires (Constantin and Cronier, 2000).

Par ailleurs, le couplage jonctionnel est également nécessaire pour la fusion des trophoblastes lors de leur différenciation en syncytiotrophoblaste (Cronier *et al.*, 1994). Ceci a été confirmé par l'utilisation d'une stratégie anti-sens contre la Cx43, qui en diminuant la communication intercellulaire, a provoqué une diminution de la capacité des trophoblastes à fusionner (Frendo *et al.*, 2003).

La communication intercellulaire joue également un rôle essentiel durant la différenciation ostéoblastique. En effet, il a été montré que des souris invalidées pour le gène de la Cx43 présentent des retards d'ossification au niveau craniofacial, des côtes, des vertèbres et des membres (Lecanda *et al.*, 2000). Le rôle de la Cx43 dans la différenciation ostéoblastique sera développé dans la partie 1.

III.5.3. Rôles des jonctions communicantes dans la prolifération cellulaire

Ces dernières décennies, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de la communication jonctionnelle durant le processus de prolifération cellulaire. Il a été montré que lors de la mitose, les cellules présentent généralement un couplage intercellulaire réduit, non seulement entre elles mais également avec les cellules environnantes en interphase (Goodall and Maro, 1986; Stein *et al.*, 1992). Ainsi, il est admis que la capacité des cellules à communiquer via les jonctions gap est inversement corrélée à leur taux de prolifération (Vinken *et al.*, 2006).

Il a notamment été montré que la régulation de la GJIC est impliquée dans la progression du cycle cellulaire. En effet, le niveau d'expression des connexines ainsi que la communication jonctionnelle varient lors des différentes phases du cycle cellulaire. Dans la plupart des types cellulaires, la GJIC est réduite en fin de phase G1 ainsi que durant les phases S et M, cependant ces modifications dépendent du type cellulaire, du type de connexine ainsi que de l'espèce étudiée. En effet, dans des hépatocytes, il a été démontré une augmentation transitoire de la GJIC durant la phase G1, suivie par une diminution drastique lors de la phase S (Fladmark *et al.*, 1997). Ces altérations ont été retrouvées au niveau de l'expression des deux principales connexines hépatiques, les Cx32 et Cx26, et résulteraient d'une réduction de la stabilité de leurs transcrits (Kren *et al.*, 1993). De plus, dans des cellules

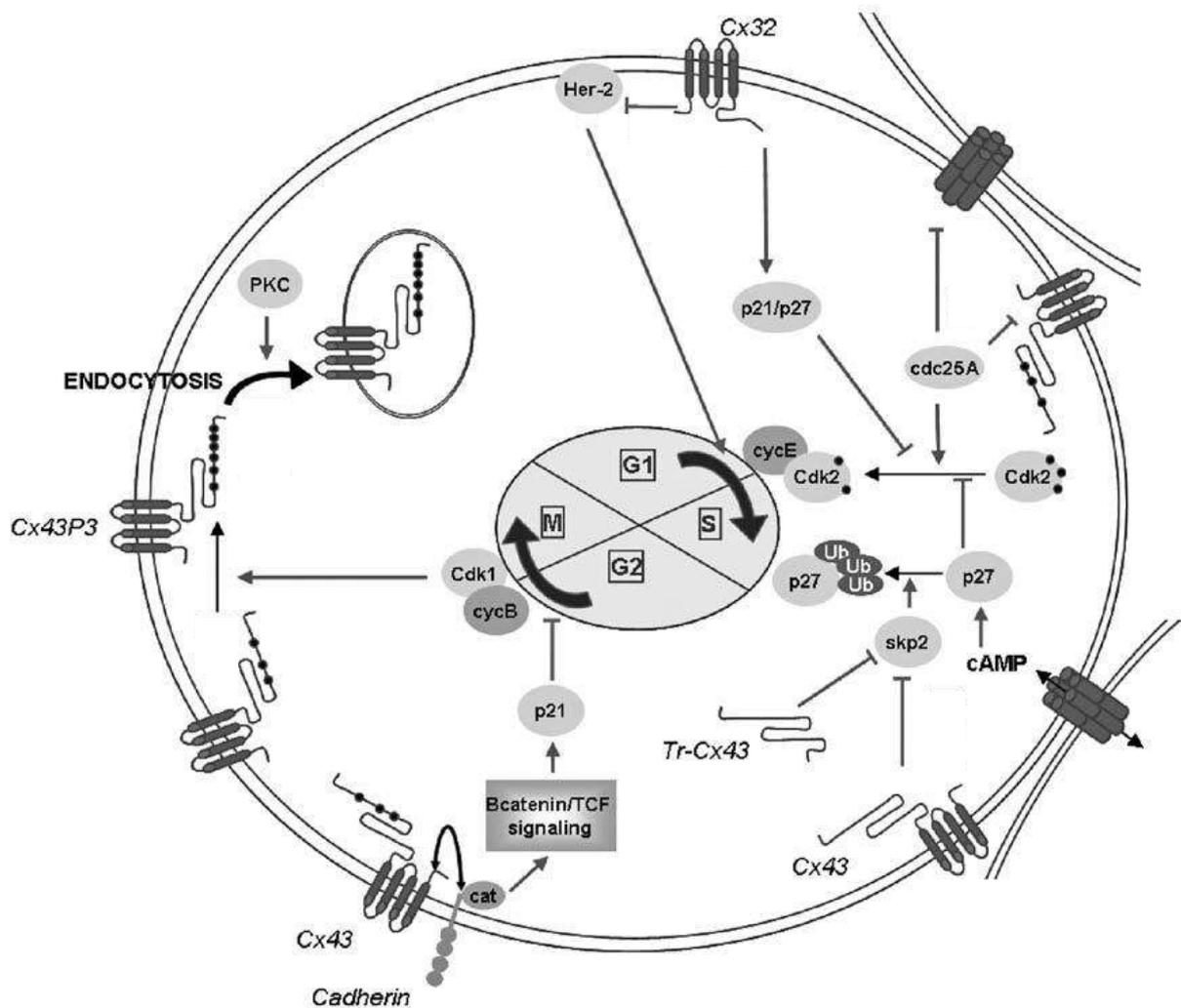


Figure 22 : Connexine et cycle cellulaire

(d'après Cronier *et al.*, 2009)

Dans cette cellule hypothétique, sont représentés quelques évènements moléculaires associés aux connexines dans la progression du cycle cellulaire. Les phases du cycle cellulaire sont notées de G1 à M. • = Sites de phosphorylation de la portion carboxy-terminale de la Cx43. **AMPc** = Adénosine MonoPhosphate cyclique ; **cdc25A** = cell division cycle 25 homolog A ; **Cdk1** = Cyclin-dependent kinase 1 ; **Cdk2** = Cyclin-dependent kinase 2 ; **Cx32** = Connexine 32 ; **Cx43** = Connexine 43 ; **Cx43P3** = forme hyperphosphorylée de la Cx43 ; **cycB** = Cycline B ; **cycE** = Cycline E ; **Her-2** = Human Epidermal Growth factor Receptor-2 ; **p21** = cyclin-dependent kinase inhibitor p21 ; **p27** = cyclin-dependent kinase inhibitor p27 ; **PKC** = Protéine kinase C ; **skp2** = S-phase kinase-associated protein 2 ; **TCF** = T-Cell Factor ; **Tr-Cx43** = forme tronquée de la Cx43 ; **Ub** = Ubiquitination de p27.

de néocortex murin, l'expression de la Cx26 augmente à partir de la phase S jusqu'au début de la phase G1 et reste modérément élevée tout le reste du cycle cellulaire. La production de Cx43 est la plus élevée lors des phases S et G2 et diminue vers la phase G1. Ainsi cette étude a montré l'existence d'un couplage cellulaire élevé durant la synthèse de l'ADN et une chute lors de la phase de mitose (Bittman and LoTurco, 1999).

Ainsi, au vue de nombreuses études, il a été établi que la communication intercellulaire ainsi que l'expression des connexines sont généralement diminuées lors de la prolifération cellulaire. La prolifération cellulaire est associée à de nombreux changements métaboliques (concentration calcique, pH) ainsi qu'à l'activation de nombreuses voies de signalisation, telles que les MAPK et PI3K/Akt, qui régulent généralement négativement la communication intercellulaire (Vinken *et al.*, 2006). Ce phénomène résulterait donc soit de la modulation de l'expression transcriptionnelle des connexines, qui peut être régulée par de nombreuses voies de signalisation, ou soit de modifications post-traductionnelles de l'activité du canal jonctionnel (Vinken *et al.*, 2011). En effet, l'état de phosphorylation du canal jonctionnel est probablement le mécanisme majeur responsable de l'altération de la GJIC durant le cycle cellulaire (Lampe and Lau, 2004). Par exemple, dans une lignée cellulaire de foie de rat, le passage de la phase G0 à la phase S est lié à la phosphorylation de la Cx43 par la PKC, entraînant une diminution de la GJIC (Koo *et al.*, 1997). Il a également été montré dans des cellules épithéliales de rein de rat que la Cx43 est phosphorylée par la PKC durant la phase S et lors de la transition G2/M. Cet état de phosphorylation serait associé à une redistribution cytosolique de la Cx43 et par conséquent à une réduction de la GJIC (Solan *et al.*, 2003). D'autre part, une forme hyperphosphorylée de la Cx43 semble également apparaître spécifiquement lors de la transition G2/M sous l'action du complexe Cdk1/cyclin B (Lampe *et al.*, 1998) (Figure 22).

Les jonctions communicantes réguleraient la prolifération cellulaire en permettant le transfert direct entre les cellules de médiateurs positifs ou négatifs de la croissance cellulaire, tels que l'AMPC, le Ca²⁺ et l'IP3 (Vinken *et al.*, 2011). Cependant, l'effet des connexines sur la prolifération cellulaire pourrait également s'exercer de façon indépendante de la communication intercellulaire. Ce concept a notamment été mis en évidence par les travaux de Zhang et ses collègues réalisés sur des cellules d'ostéosarcome humain, dans lesquels il a été démontré que la surexpression de la Cx43 entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire, associée à une augmentation de l'expression de p27, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire. Cette augmentation de p27 serait en partie due au fait que la

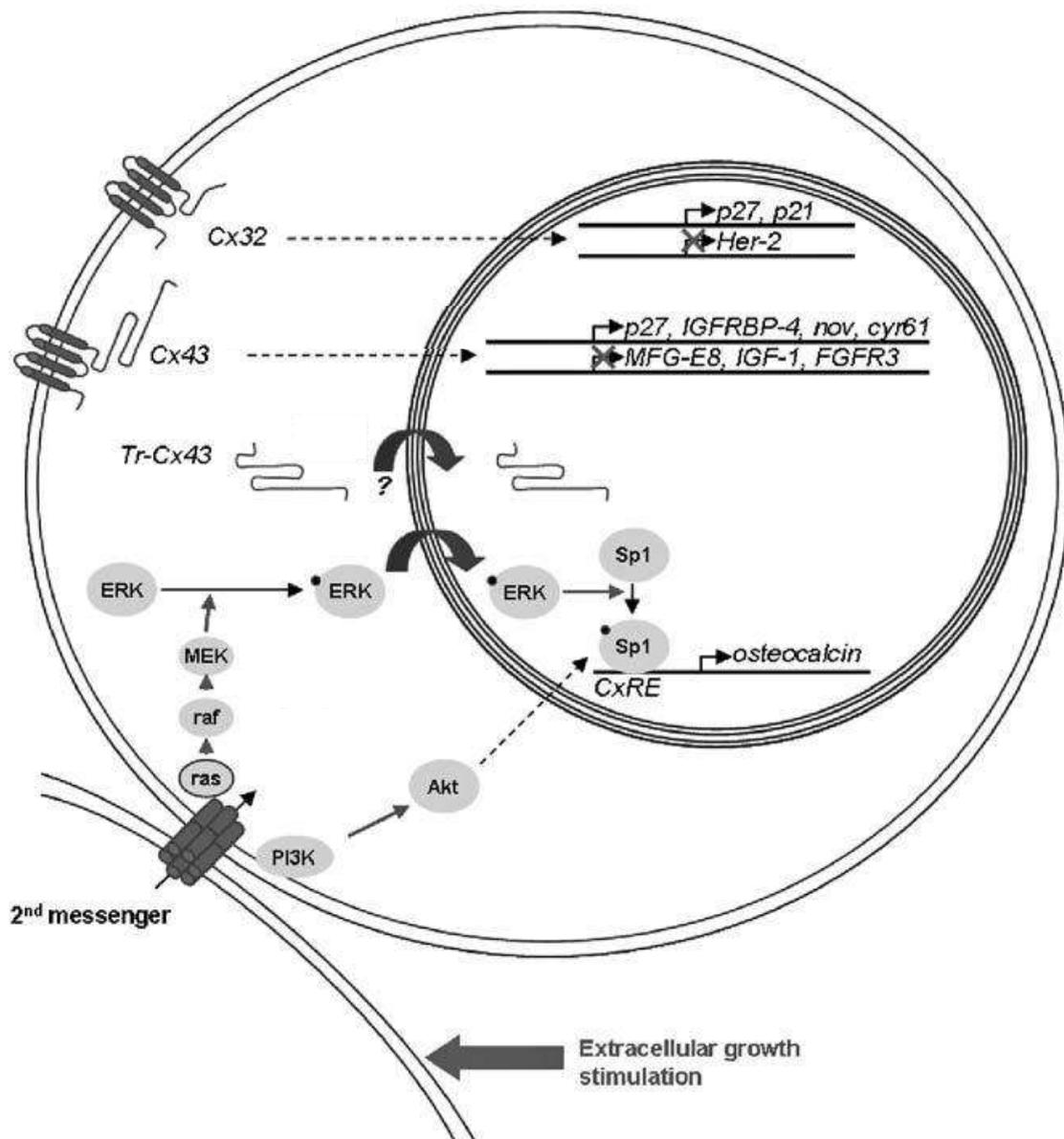


Figure 23 : Connexines et régulation de l'expression de gènes

(d'après Cronier *et al.*, 2009)

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

Cx43, indépendamment de la GJIC, stimulerait la dégradation de la protéine Skp2, elle-même impliquée dans l'ubiquitination de p27 (Zhang *et al.*, 2001, 2003c).

Les connexines semblent également moduler la prolifération cellulaire par leur interaction avec certains facteurs, tels que la β -caténine. La Cx43, en interagissant avec la β -caténine, réduit l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire (Ai *et al.*, 2000). De plus, le gène de la Cx43 a été identifié comme étant une cible de la voie Wnt, suggérant ainsi que la Cx43 peut réguler sa propre expression (van der Heyden *et al.*, 1998). En effet, l'activation de la voie Wnt par divers stimuli entraîne une augmentation de l'expression de la Cx43.

D'autres études suggèrent que les connexines pourraient jouer un rôle direct sur l'expression des gènes (Figure 23). En effet, plusieurs études ont révélé des modifications dans le profil d'expression génique de lignées cellulaires suite à la transfection de connexines. En général, cela affecte l'expression de gènes codant pour des activateurs de prolifération (FGFR3, Her-2, IGF-1) qui est alors inhibée, et à l'inverse, l'expression de gènes codant pour des suppresseurs de prolifération (p21, p27, IGFBP-4) est induite (Vinken *et al.*, 2006). Récemment, afin d'établir un lien entre les connexines et la régulation de l'expression génique, Stains et ses collègues ont proposé un modèle dans lequel ils ont montré l'existence d'un élément de réponse aux connexines (CxRE) présent dans la région promotrice du gène, notamment celui de l'ostéocalcine, régulé par le facteur de transcription Sp1 (Stains and Civitelli, 2005a, 2005b, 2005c).

De plus, des études récentes ont également suggéré que les connexines ou au moins une partie de cette protéine pouvait être transloquée dans le noyau afin de modifier l'expression de certains gènes cibles. En effet, suite à la transfection du gène de l'extrémité C-terminale de la Cx43 dans des cellules HeLa (Dang *et al.*, 2003) et Neuro2A (Moorby and Patel, 2001), cette partie de la protéine a été retrouvée localisée à l'intérieur de la cellule y compris dans le compartiment nucléaire. Cette transfection a également été associée à une inhibition de la prolifération cellulaire, suggérant ainsi que l'extrémité C-terminale des connexines serait capable d'affecter l'expression génique et par conséquent la prolifération cellulaire. De même, la transfection de cellules HeLa avec une forme mutée de Cx43, portant des mutations ponctuelles au niveau de la seconde boucle extracellulaire, entraîne une inhibition de leur prolifération malgré une absence de communication intercellulaire de ces cellules, due à une localisation cytosolique de la Cx43 (Olbina and Eckhart, 2003). Toutefois, Omori et Yamasaki ont montré que des formes de Cx32 et Cx43 tronquées au niveau de leur extrémité C-terminale, sont capables d'inhiber la prolifération de cellules HeLa, suggérant que d'autres régions structurales des connexines pourraient contrôler la prolifération cellulaire (Omori and Yamasaki, 1999). Quoiqu'il en soit, ces études montrent

clairement que les connexines, en dehors de leur rôle primordial dans la communication intercellulaire, joue également un rôle important en tant que simple unité.

Tous ces éléments vont dans le sens d'une implication des connexines dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, le processus de tumorigénèse, caractérisé par une prolifération incontrôlée, est généralement associé à une perte ou à une réduction de la communication jonctionnelle, à une chute de l'expression des connexines ou à une localisation aberrante de ces dernières. De plus, dans certains cas, la réexpression des connexines dans des cellules cancéreuses peut s'accompagner d'une inhibition de la croissance tumorale. Ainsi, les connexines sont considérées comme des gènes suppresseurs de tumeurs (Cronier *et al.*, 2009; Kandouz and Batist, 2010). Le rôle des connexines dans la cancérogénèse sera développé dans la partie 2.

III.5.4. Rôles des jonctions communicantes dans la mort cellulaire

Enfin, de nombreuses études montrent une corrélation positive entre la GJIC et l'activité apoptotique des cellules. Les jonctions communicantes permettraient la propagation de signaux de mort entre les cellules, comme des vagues calciques, favorisant ainsi l'entrée en apoptose (Vinken *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la communication tel que l'acide 18- β -glycyrrhétinique peut prévenir l'apoptose (de Pina-Benabou *et al.*, 2005). De plus, la Cx43 inhibe l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes induite par les bisphosphonates (Plotkin *et al.*, 2008). Cependant, il a également été montré que la présence des jonctions gap pouvait, à l'inverse, prévenir la mort cellulaire (Cohen-Salmon *et al.*, 2002; Bry *et al.*, 2004). En effet, les cellules saines pourraient fournir aux cellules mourantes des signaux de survie, tels que du glucose, de l'ATP ou de l'acide ascorbique. De même, les jonctions gap peuvent favoriser la survie cellulaire en limitant les flux de métabolites toxiques, comme l'oxyde nitrique et les ions superoxydes. Ainsi, il semble que les métabolites diffusant à travers les jonctions communicantes diffèrent entre les cellules apoptotiques et non apoptotiques, et cette balance favorise soit la mort soit la survie cellulaire. De plus, il a été montré que les connexines, indépendamment de la GJIC, peuvent réguler l'expression de gènes pro- ou anti-apoptotiques (Kanczuga-Koda *et al.*, 2005).

III.5.5. Le rôle des hémicanaux

Une fois insérés dans la membrane plasmique, les connexons peuvent servir de canaux transmembranaires avant la formation des jonctions communicantes. Le rôle de ces canaux serait de libérer dans le milieu extracellulaire des petites molécules, telles que l'ATP, le

glutamate et NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide), et de permettre le passage de courants ioniques (Sáez *et al.*, 2010). L'ouverture de ces hémicanaux peut être initiée par divers stimuli, incluant une faible concentration extracellulaire de Ca²⁺, une dépolarisation membranaire, un stress mécanique et une activation de récepteurs purinergiques. Des études ont déjà démontré leur implication dans la propagation de vagues calciques, le contrôle de la prolifération, la mort ainsi que la survie cellulaire. Par exemple, les hémicanaux sont impliqués dans l'effet anti-apoptotique des biphosphonates sur les ostéoblastes et les ostéocytes. En effet, l'alendronate induit l'ouverture des hémicanaux de Cx43, ce qui entraîne l'activation de la protéine Src associée aux connexons de Cx43. Ceci déclenche ensuite l'activation de ERK, qui à son tour va favoriser la survie des cellules (Plotkin *et al.*, 2002).

III.5.6. Physiopathologies liées aux jonctions communicantes

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

Les invalidations des gènes de la Cx26, de la Cx43 et de la Cx45 conduisent à la mort des souris soit *in utero* pour la Cx26 et la Cx45 soit périnatale pour la Cx43. Les souris invalidées pour la Cx26 présentent un retard de croissance dû à un défaut de transfert de nutriments vers le fœtus, tels que le glucose, entre les différentes couches de syncytiotrophoblastes dans le placenta (Gabriel *et al.*, 1998). Les souris invalidées pour la Cx45 présentent, quant à elles, des anomalies cardiaques (Krüger *et al.*, 2000). Concernant l'invalidation pour la Cx43, une malformation cardiaque sévère entraîne la mort des souriceaux à la naissance. Cette malformation est provoquée par un défaut de migration des cellules de la crête neurale lors du développement (Reaume *et al.*, 1995). Ces souris présentent également une diminution de la taille des gonades, un défaut de l'hématopoïèse et des retards d'ossification (Lecanda *et al.*, 2000; Montecino-Rodriguez *et al.*, 2000). Cependant, certaines invalidations de gènes des connexines sont viables et entraînent des altérations spécifiques selon la connexine considérée. En effet, l'invalidation de la Cx32 entraîne notamment de sévères anomalies hépatiques et révèle une neuropathie périphérique (Anzini *et al.*, 1997; Temme *et al.*, 2001). Les souris invalidées pour les Cx46 et Cx50 développent des cataractes (Goodenough, 1992).

Ainsi, des anomalies du développement ou de la différenciation conduisant à des pathologies humaines ont été associées à des mutations de connexines. En effet, la maladie de Charcot-Marie-Tooth, qui est une neuropathie résultant d'une démyélinisation progressive suivie d'une dégénérescence des nerfs périphériques, est associée à des mutations du gène codant pour la Cx32 aboutissant à l'absence de jonctions communicantes ou à l'altération de leurs propriétés fonctionnelles. L'absence de ces jonctions communicantes induit la dégénérescence des cellules de Schwann par déficit d'apports en nutriments (Fischbeck *et al.*, 1999). Des mutations des Cx46 et Cx50 sont associées à certaines formes de cataractes (Berthoud *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003), celles des Cx26, Cx30 et Cx31 à des surdités ainsi qu'à des pathologies de la peau (Maestrini *et al.*, 1999; Marziano *et al.*, 2003). Une autre pathologie, nommée dysplasie occulodentodigitale (ODDD), est liée à une mutation autosomique dominante sur le gène codant la Cx43. Les patients atteints par cette pathologie présentent une syndactylie, des malformations craniofaciales, des pertes d'audition, des défauts du cristallin et de la cornée (Paznekas *et al.*, 2003).

IV. OBJECTIFS

Ainsi au vu de l'importance physiologique des jonctions communicantes, les objectifs de mes travaux de thèse ont été de comprendre le rôle de la Cx43 dans la biologie et la physiopathologie osseuse.

La première partie de mon étude porte sur le rôle de la Cx43 dans la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures.

Puis dans une seconde partie, nous avons étudié le rôle de la Cx43 dans le développement de la seconde tumeur osseuse primitive présentée précédemment, le sarcome d'Ewing.

Partie 1 :
Rôle de la Cx43 dans la
différenciation des hMSC en
ostéoblastes

I. RÔLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes : la formation et la résorption osseuse, assurées respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes. La formation osseuse débute par la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) présentes principalement dans le stroma médullaire, en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures sous le contrôle de différents facteurs de transcription spécifiques de la voie ostéogénique. Au cours de la différenciation ostéoblastique, de nombreux gènes vont être exprimés, de manière séquentielle, menant à la synthèse de protéines indispensables aux différentes étapes de la différenciation des MSC en ostéoblastes ainsi qu'à la formation et à la minéralisation de la matrice osseuse. A la fin du processus de différenciation ostéogénique, les ostéoblastes matures expriment de nombreux marqueurs, tels que la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéocalcine (OC), la phosphatase alcaline (ALP), l'ostéopontine et le collagène de type 1. Le contrôle précis et coordonné de ce processus de différenciation requiert une orchestration moléculaire complexe entre les différents types cellulaires osseux, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Ainsi, il a été suggéré que les jonctions communicantes joueraient un rôle important dans cette coordination du remodelage osseux (cf. revue en Annexe : Talbot and Verrecchia, 2012).

I.1. Rôle des jonctions gap dans les cellules osseuses

I.1.1. Les ostéoblastes

La présence de jonctions communicantes a été mise en évidence dans les trois types cellulaires du tissu osseux : les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes (Doty, 1981; Ilvesaro *et al.*, 2000). Les ostéoblastes expriment principalement la Cx43 et faiblement la Cx45 (Civitelli *et al.*, 1993). Ils expriment également la Cx46 mais celle-ci présente un défaut d'adressage et reste piégée dans l'appareil de Golgi, l'empêchant ainsi de former un connexon fonctionnel à la membrane (Koval *et al.*, 1997). L'expression ubiquitaire de la Cx43 en fait l'actrice principale de la formation des canaux intercellulaires dans le tissu osseux. Contrairement à la Cx43, les jonctions gap formées de Cx45 possèdent un pore dont la taille ne permet pas le passage de molécules informatives excédant 0,3 kDa. De plus, les connexines 43 et 45 peuvent s'assembler pour former des connexons hétéromériques, dont

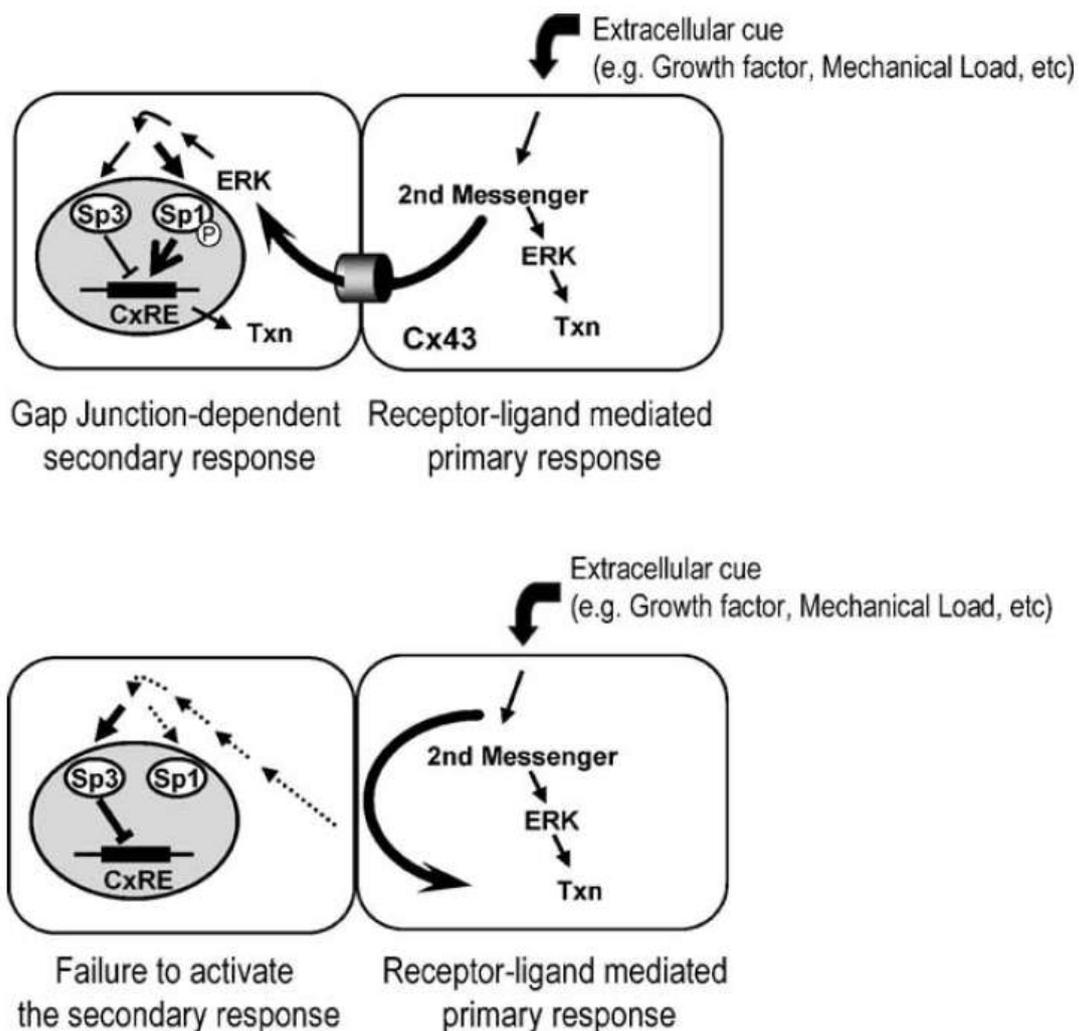


Figure 24 : Modèle du mécanisme d'action des jonctions gaps dans la régulation de l'expression des gènes ostéoblastiques (d'après Stains et Civitelli, 2005c)

Des signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance ou des stimuli mécaniques induisent la libération de seconds messagers (IP_3 , AMPc, Ca^{2+}), conduisant à une réponse dite primaire. Cette réponse est indépendante des jonctions communicantes. La présence de canaux intercellulaires constitués de Cx43 permet la propagation, entre cellules adjacentes, de seconds messagers qui vont alors activer la voie de signalisation ERK, déclenchant ainsi une réponse dite secondaire. ERK va alors activer par phosphorylation le facteur de transcription Sp1, qui en se liant au domaine CxRE, présent sur le promoteur des gènes ostéoblastiques tels que l'ostéocalcine et le collagène de type 1, stimule la transcription génique (Txn). Une perturbation de la communication intercellulaire résulte en une non propagation des seconds messagers entre les cellules, entraînant ainsi une réponse cellulaire atténuée.

les propriétés électriques et biochimiques sont similaires à celles d'un connexon homomérique composé uniquement de Cx45 (Martinez *et al.*, 2002).

Plusieurs études *in vitro* montrent que les canaux intercellulaires jouent un rôle majeur dans la différenciation terminale des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures et dans leur activité (Batra *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression de la Cx43 ainsi que de la communication intercellulaire a notamment été mise en évidence durant la différenciation terminale d'une lignée foétale ostéoblastique en ostéoblastes matures. A l'inverse, l'expression de la Cx45 n'est pas altérée durant ce processus (Donahue *et al.*, 2000). De plus, de nombreux travaux, concernant le rôle de la Cx43 sur la fonction des ostéoblastes, suggèrent que l'expression de la Cx43 et la communication intercellulaire module l'activité transcriptionnelle de différents marqueurs ostéoblastiques. En effet, la diminution de la perméabilité jonctionnelle par des inhibiteurs chimiques ou par surexpression de la Cx45, qui se comporte comme un dominant-négatif vis à vis de la Cx43, entraîne une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique tels que le collagène de type I, l'ALP, l'OC ou la BSP, et par conséquent, une inhibition de la minéralisation osseuse (Lecanda *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 2001a). Une étude a également montré que le traitement de cellules ostéoblastiques avec des inhibiteurs pharmacologiques des jonctions gap, tels que l'acide 18 α -glycyrrhétinique ou l'oléamide, non seulement prévient la différenciation de ces cellules en ostéoblastes matures mais induit leur transdifférenciation en adipocytes (Schiller *et al.*, 2001c). Cette altération de la différenciation ostéoblastique terminale a été confirmée sur des cultures primaires d'ostéoblastes isolés à partir de calvaria de souris Cx43^{-/-}. En effet, il a été démontré que l'expression de marqueurs de la différenciation ostéoblastique, tels que l'ALP, la BSP et l'OC, est fortement diminuée dans ces cellules comparé aux cellules issues de souris wild-type. Ces cellules montrent également un défaut de minéralisation (Lecanda *et al.*, 2000). Au contraire, la surexpression de la Cx43 et par conséquent du couplage intercellulaire dans une lignée ostéoblastique favorise la différenciation ostéogénique (Gramsch *et al.*, 2001).

L'étude des mécanismes moléculaires par lesquels la Cx43 module l'expression transcriptionnelle de l'OC et de la sous-unité $\alpha 1$ du collagène de type I suggère que l'ouverture des canaux intercellulaires constitués de Cx43 permettrait le passage d'un médiateur cytoplasmique capable d'activer la voie de signalisation ERK. ERK modulerait alors la balance Sp1/Sp3 en faveur de Sp1, par phosphorylation de ce dernier. Une fois activé, le facteur de transcription Sp1 irait alors se fixer sur des séquences riches en CT (domaine CxRE :

Connexin Response Element) du promoteur des gènes ostéoblastiques, stimulant ainsi la transcription génique (Figure 24) (Stains *et al.*, 2003; Stains and Civitelli, 2005c, 2005d).

La Cx43 est également impliquée dans la réponse des cellules osseuses à différentes stimulations hormonales. En effet, des études, sur des lignées ostéoblastiques, ont mis en évidence que la Cx43 permet de potentialiser les effets de la PTH. Ainsi, l'habileté de la PTH à induire la minéralisation osseuse des ostéoblastes matures *in vitro* est fortement réduite en absence de communication intercellulaire médiée par les jonctions gap (Schiller *et al.*, 2001b). De plus, il a été montré que la production d'AMPc induite par un traitement à la PTH est diminuée dans des ostéoblastes dans lesquels l'expression de la Cx43 a été réduite en utilisant une stratégie anti-sens (Vander Molen *et al.*, 1996). *In vivo*, les effets anaboliques osseux normalement induits par l'administration de PTH sont atténués chez des souris avec une délétion de la Cx43 spécifique aux ostéoblastes, n'entraînant ainsi pas d'augmentation de la masse osseuse (Chung *et al.*, 2006). Par ailleurs, la PTH est également capable d'augmenter l'expression de la Cx43 ainsi que la communication intercellulaire (Schiller *et al.*, 1992).

1.1.2. Les ostéocytes

La Cx43 est également fortement exprimée au niveau des ostéocytes. Ces ostéocytes, enfouis dans la matrice osseuse, possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques leur permettant d'établir des contacts, via les jonctions gap, avec les cellules osseuses environnantes, notamment les ostéoblastes (Yellowley *et al.*, 2000). Les ostéocytes et les ostéoblastes, par l'intermédiaire de ce réseau de communication, interviennent dans la transmission de signaux mécanosensoriels au cours du remodelage osseux. En effet, il a été montré qu'un stress mécanique augmente l'expression de la Cx43 ainsi que la communication intercellulaire dans les ostéoblastes et les ostéocytes et entraîne l'ouverture d'hémicanaux de Cx43 *in vitro* (Ziambaras *et al.*, 1998; Thi *et al.*, 2003; Cherian *et al.*, 2005). De plus, il a été montré *in vivo* que des souris présentant une ablation conditionnelle du gène de la Cx43 au niveau des ostéoblastes (ColCre;Gja1(-/flox)) montrent une réponse atténuée à une stimulation mécanique. En effet, lors de l'application d'un stress mécanique au niveau du tibia, la formation osseuse endocorticale ainsi que l'apposition minérale observée sont moindres chez ces souris déficientes pour la Cx43 comparé aux souris sauvages (Grimston *et al.*, 2008). Les ostéocytes agissent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os, puis ils convertissent ces stimuli mécaniques en signaux biochimiques qu'ils transmettent via les jonctions gap aux cellules osseuses

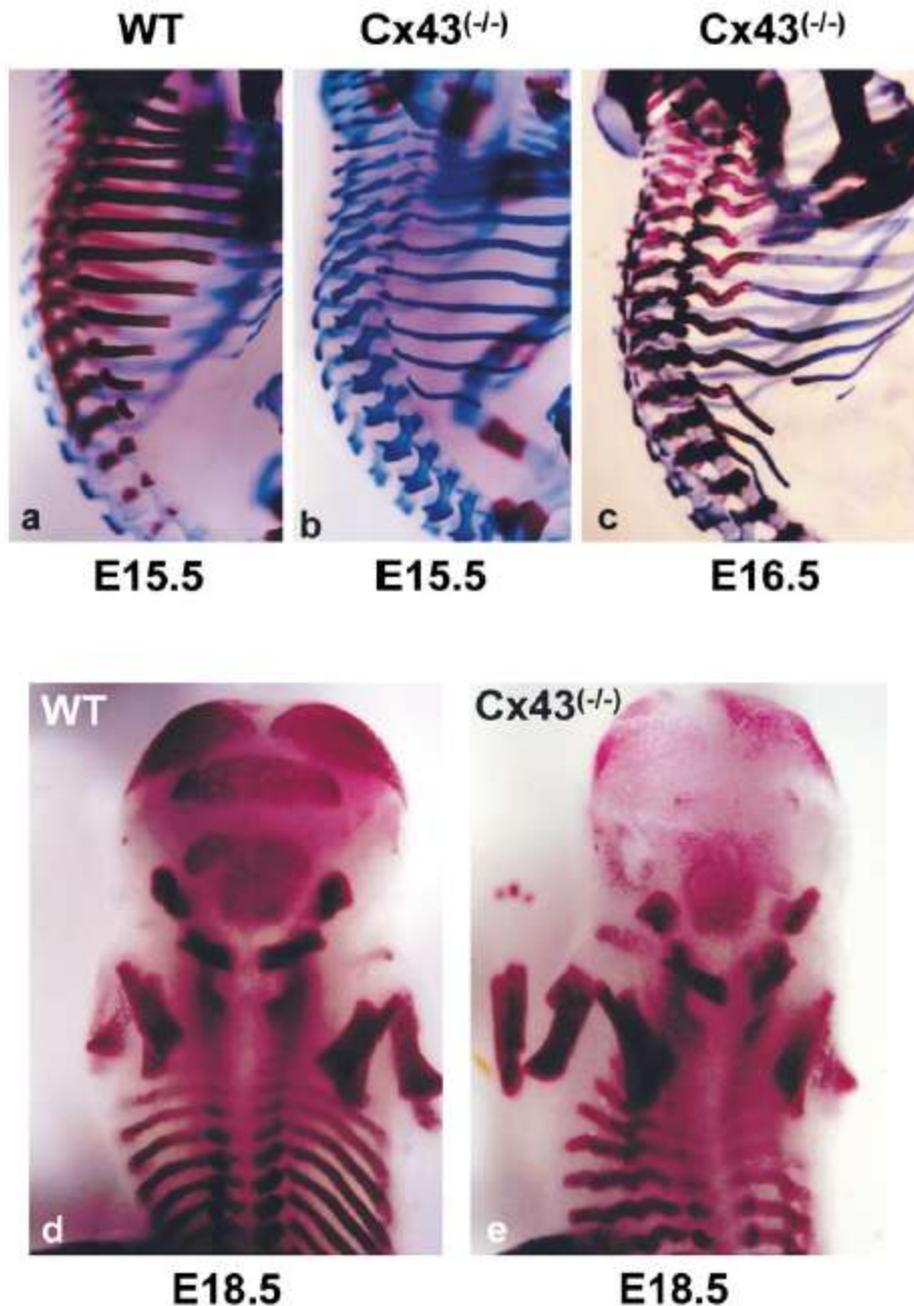


Figure 25 : Effet de l'ablation du gène de la Cx43 sur le développement squelettique axial de la souris (Lecanda *et al.*, 2000)

Le panneau du haut représente une vue latérale des vertèbres thoraciques colorées au Rouge Alizarine (tissu osseux) et Bleu Alcian (tissu cartilagineux) à différents jours de vie embryonnaire : E15.5 (**a** et **b**) et E16.5 (**c**) chez la souris wild-type ou Cx43^{-/-}. Ces photographies illustrent un retard d'ossification au niveau des vertèbres ainsi que des déformations costales dues à l'absence d'expression de la Cx43. Le panneau du bas représente une vue dorsale de la tête et du thorax des embryons wild-type (**d**) et Cx43^{-/-} (**e**) colorés au Rouge Alizarine à jour E18.5. Un retard d'ossification de la région cranio-faciale est observé sur ces photographies.

environnantes, assurant ainsi une adaptation fonctionnelle du tissu osseux. Cependant, les mécanismes moléculaires intervenant dans la perception de la charge mécanique par les ostéocytes jusqu'à l'initiation d'une voie de signalisation intracellulaire ne sont pas encore bien compris.

1.1.3. Les ostéoclastes

A ce jour, peu d'études ont montré le rôle des jonctions communicantes dans l'ostéoclastogénèse. Il semble cependant que la communication intercellulaire joue un rôle dans la fusion des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures plurinucléés (Ilvesaro *et al.*, 2000; Ilvesaro and Tuukkanen, 2003). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la communication intercellulaire médiée par les jonctions gap (GJC) tel que l'heptanol ou le peptide Gap 27, entraîne le ralentissement de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de digérer une matrice de dentine (Ilvesaro *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2008).

1.2. Les jonctions gap et le développement du squelette

L'importance de la Cx43 dans le remodelage osseux a été confirmée *in vivo* grâce à l'utilisation de souris KO pour la Cx43. En effet, ces souris présentent des retards d'ossification intramembraneuse et endochondrale associés à des malformations craniofaciales. Ces animaux montrent aussi des retards d'ossification au niveau des vertèbres, des clavicules, des côtes et des membres ; cependant leurs squelettes axial et appendiculaire sont normaux à la naissance (Figure 25) (Lecanda *et al.*, 2000). Toutefois, la létalité prénatale de ces souris KO pour la Cx43 ne permet pas d'étudier le rôle de cette connexine sur le squelette adulte. Ainsi, des modèles transgéniques de souris KO conditionnel pour la Cx43 ont été générés en utilisant la méthode de la recombinaison Cre, dont l'expression est sous le contrôle de promoteurs spécifiques aux cellules osseuses. Des souris présentant une délétion conditionnelle du gène de la Cx43 spécifique des ostéoblastes, par utilisation de la recombinaison Cre dont l'expression est contrôlée par le promoteur du collagène (ColCre;Gja1(-/flox)), développe une masse osseuse faible et une ostéopénie avec l'âge, due à une formation osseuse réduite et à une dysfonction des ostéoblastes (Chung *et al.*, 2006). A l'inverse, le KO conditionnel pour la Cx43, utilisant la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur de l'ostéocalcine, dans des ostéoblastes matures ne montre aucun effet sur la masse osseuse (Plotkin *et al.*, 2008). Cette observation contradictoire de l'effet de

la Cx43 sur la masse osseuse pourrait être due à une délétion de la Cx43 intervenant à un stade plus tardif du développement osseux dans le modèle contrôlé par l'ostéocalcine contrairement à celui sous le contrôle du collagène exprimé plus précocement. Ceci suggère que la Cx43 jouerait un rôle essentiel dans les stades précoces du développement osseux.

De plus, le rôle crucial de la Cx43 dans la mise en place du squelette est également démontré par les nombreuses malformations osseuses retrouvées chez les patients atteints de la Dysplasie Oculodentodigitale (ODDD), qui est caractérisée par la présence de mutations du gène *GJA1* codant pour la Cx43 (Civitelli, 2008).

I.3. Rôle des hémicanaux dans le tissu osseux

Par ailleurs, outre la formation de jonctions gap, l'existence d'hémicanaux fonctionnels, formés par la Cx43 et s'ouvrant dans le milieu extracellulaire, a également été mise en évidence, notamment au niveau des ostéocytes et des ostéoblastes. Des études ont montré que ces hémicanaux sont impliqués dans la régulation de la libération de molécules telles que NAD, ATP, NO (oxyde nitrique) et PGE₂ (prostaglandine E₂), induite lors d'un stress mécanique au niveau des ostéocytes (Cherian *et al.*, 2005; Genetos *et al.*, 2007; Siller-Jackson *et al.*, 2008). De plus, les hémicanaux jouent également un rôle dans la réponse des cellules osseuses à divers agents pharmacologiques. En effet, il a été montré que les biphosphonates agiraient via les hémicanaux de Cx43 pour empêcher l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes par l'activation de la cascade de signalisation Src-ERK (Plotkin *et al.*, 2002).

I.4. Objectifs de l'étude

L'implication des jonctions communicantes dans la régulation du remodelage osseux est incontestable, et de ce fait, toute altération de l'expression des connexines ou de la communication intercellulaire conduit au développement de pathologies osseuses.

Les différentes études présentées dans cette partie ont démontré l'importance de la communication intercellulaire et de l'expression de la Cx43 dans la différenciation terminale des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures ainsi que dans l'activité et le maintien du phénotype des ostéoblastes. Cependant, le rôle des jonctions gap dans la différenciation initiale des progéniteurs ostéoblastiques, les MSC, en ostéoblastes matures reste encore

inconnu. Les hMSC expriment les connexines 40, 43 et 45 et forment des jonctions gap fonctionnelles (Valiunas *et al.*, 2004). De plus, l'existence d'une communication intercellulaire médiée par les jonctions gap a été mise en évidence entre des cellules endothéliales et des hMSC. Celle-ci favoriserait la différenciation des hMSC en ostéoblastes (Villars *et al.*, 2002). Bien que ces études soulignent la présence de jonctions communicantes fonctionnelles dans les MSC, de futures études seront nécessaires afin d'évaluer le rôle des jonctions gap dans la détermination de la voie d'engagement et la différenciation des cellules souches, ainsi que l'identité des molécules diffusant à travers les canaux intercellulaires pour moduler la fonction des cellules souches.

Ainsi l'objectif de mes travaux de thèse, présentés dans cette première partie, ont été de déterminer le rôle spécifique de la Cx43 dans la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures. Pour cela, deux approches ont été utilisées : une stratégie anti-sens ciblant la Cx43 ainsi que des inhibiteurs pharmacologiques de la GJC.

II. ARTICLE 1

« La communication intercellulaire médiée par les jonctions gap formées de connexine 43 contrôle la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en ostéoblastes matures. »

Julie Talbot, Régis Brion, Verena Stresing, Bérengère Gobin, Dominique Heymann et Franck Verrecchia

En révision à **Stem Cell Research**

Les jonctions communicantes sont des structures membranaires constituées de canaux intercellulaires permettant la diffusion de cellule à cellule de molécules informatives. Ces structures jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La Cx43 est l'actrice principale de la formation des canaux intercellulaires dans le tissu osseux. Plusieurs études ont démontré le rôle crucial des jonctions communicantes dans la différenciation terminale des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures ainsi que dans la prolifération et l'activité des ostéoblastes. Bien qu'il ait été démontré que les hMSC expriment la Cx43 et forment des jonctions communicantes fonctionnelles, leur rôle dans la différenciation initiale des hMSC en ostéoblastes matures reste encore inconnu.

Dans le cadre de cette étude, des hMSC, issues de prélèvements de moelle osseuse, ont été cultivées en présence d'un cocktail de différenciation ostéogénique composé de Dexaméthasone (10^{-8} M), de Vitamine D3 (10^{-8} M), d'acide Ascorbique (50 μ g/ml) et de β -glycérophosphate (10 mM).

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression et de la production de la Cx43, ainsi que de la communication intercellulaire au cours de la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures. La différenciation ostéoblastique a été évaluée à la fois en suivant l'augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique comme l'OC, la BSP et l'ALP par PCR quantitative, ainsi que par un test fonctionnel de minéralisation, la coloration au rouge Alizarine. Par ailleurs, deux approches ont été utilisées afin d'étudier le rôle des jonctions gap dans ce processus de différenciation ostéoblastique : une approche pharmacologique utilisant des inhibiteurs de la GJIC (l'acide 18 α -glycyrrhétinique et le peptide Gap27) et une approche moléculaire utilisant un shRNA ciblant la Cx43. Ces deux approches ont entraîné un ralentissement de la

différenciation des hMSC en ostéoblastes, évaluée par la coloration au rouge Alizarine et par l'étude de l'expression transcriptionnelle des marqueurs ostéoblastiques.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que la présence de la Cx43 ainsi que la communication intercellulaire sont essentielles pour la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures. De ce fait, les techniques d'ingénierie tissulaire osseuse utilisant les MSC devraient s'assurer de l'existence d'une communication via les jonctions gap entre ces cellules souches après transplantation cellulaire, puisque cette interaction cellulaire semble être une condition préalable à l'engagement des MSC dans la voie de différenciation ostéogénique.

**Intercellular communication mediated by connexin43 channels drives the
differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts**

Julie Talbot^{1,2,3,4}, Régis Brion^{1,2,3,4}, Verena Stresing^{1,2,3,4}, Bérengère Gobin^{1,2,3,4}, Dominique
Heymann^{1,2,3,4} and Franck Verrecchia^{1,2,3,4}

¹LUNAM Université, France; ²INSERM, UMR 957, Nantes, France; ³Université de Nantes, Laboratoire
de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives,
Nantes, France; ⁴CHU de Nantes, Nantes, France

Running title: Role of Cx43 in hMSC differentiation

Address correspondence to: Franck Verrecchia, INSERM U957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston
Veil, 44000 Nantes, France, Phone: +33 240412842, Fax: +33 240412860, E-mail:
franck.verrecchia@inserm.fr

Abstract

Although it has been demonstrated that human mesenchymal stem cells (hMSC) express the ubiquitous connexin43 (Cx43) and form functional gap junctions, their role in the initial differentiation of hMSCs into osteoblasts remains unknown. Here, we show that Cx43 expression and gap junctional intercellular communication (GJIC) are increased during the differentiation of hMSCs into osteoblasts, both at the protein and mRNA level. Moreover, two independent procedures to reduce GJIC, a pharmacological approach with GJIC inhibitors (18 α -glycyrrhetic acid and Gap27 peptide) and a molecular approach using small interfering RNA against Cx43, demonstrated that the presence of Cx43 and functional junctional channels are essential to the ability of hMSCs to differentiate into osteoblasts. If indeed GJIC plays a crucial role in the control of stem cell differentiation programs, MSC therapies should assure that cellular communication between stem cells is available after cell transplantation, since this interaction may be a prerequisite for proper cell commitment towards organ-specific cell types.

Keywords: cell differentiation, Connexin43, gap junction, human mesenchymal stem cells, intercellular communication, osteoblast

Introduction

Bone formation, a regulated process that takes place during embryonic development, growth, remodeling and repair, begins with the differentiation of osteoblast progenitor cells into pre-osteoblasts and then into osteoblasts (Neve *et al.*, 2011). These osteoblast progenitors are mesenchymal stem cells (MSC), present mainly in the bone marrow stroma, which prior to osteoblast commitment can also differentiate into other mesenchymal cell lineages such as fibroblasts, chondrocytes, myoblasts and bone marrow stromal cells including adipocytes, depending on the activated signaling transcription pathways (Friedenstein *et al.*, 1987; Owen, 1988). At the end of the osteogenic differentiation process, mature osteoblasts no longer divide and produce many markers such as alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COL1), bone sialoprotein (BSP), osteopontin and osteocalcin (OC) (Wennberg *et al.*, 2000).

Connexins, the structural proteins of gap junctions, are a family of transmembrane proteins that oligomerize into hemichannels containing six connexin subunits (Sosinsky and Nicholson, 2005). Upon reaching the cell surface, two hemichannels pair to complete an intercellular gap junction channel, which directly links the cytoplasm of neighboring cells and mediates the exchange of low-molecular-mass molecules (<1000 Da), including cAMP, inositol trisphosphate, and Ca^{2+} (Kumar and Gilula, 1996). The permeability of gap junctions is finely regulated at the transcriptional (Tacheau, *et al.*, 2008) and posttranscriptional level via cycles of connexin phosphorylation (Verrecchia *et al.*, 1999), intracellular Ca^{2+} or H^+ concentrations, or by a variety of lipophilic substances (Pluciennik *et al.*, 1996).

Multiple lines of evidence have established that Cx43, the most abundant connexin in bone cells, and subsequent intercellular channels play a major role in skeletal development and for the function and survival of osteoblasts and osteocytes (Civitelli, 2008; Stains and Civitelli, 2005). For example, the decrease in junctional permeability by chemical inhibitors or by over-expression of Cx45, which acts as a dominant-negative against Cx43, causes a decrease in the expression of osteoblastic differentiation markers such as COL1, ALP, OC or BSP in differentiated osteoblastic cells (Lecanda *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 2001). The importance of Cx43 in bone development has been confirmed *in vivo* through the use of Cx43 knockout mice. These mice exhibit delayed intramembranous and endochondral ossification associated with craniofacial malformations (Lecanda *et al.*, 2000).

However, although it has been shown that human mesenchymal stem cells (hMSC) express Cx40,

Cx43 and Cx45, and form functional gap junctions, the role of connexins in the initial differentiation of hMSCs into osteoblasts remains unknown. In this context, the aim of this work was to determine the specific role of Cx43 in the differentiation of human MSCs into osteoblasts using small interfering RNA.

Materials and methods

Cell isolation and culture

Bone marrow, harvested by iliac crest aspiration from donors (age=46±12; range=36–67), were obtained from the “Etablissement Français du Sang” with informed consent and ethical approval from the Nantes University Hospital Ethics Committee. hMSCs were cultured in medium composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza), 10% fetal bovine serum (Hyclone Perbio), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (R&D systems). Adherent cells were characterized by flow cytometry (CD45⁻, CD34⁻, CD105⁺, CD73⁺ and CD90⁺, purity ≥ 99%) prior to further experiments.

Osteoblast differentiation

hMSCs were seeded at 2.10^4 cells/cm² in 24-well plates in culture medium. After 3 days, the medium was replaced by fresh medium supplemented with vitamin D3 (10^{-8} M; Hoffmann-La Roche) and dexamethasone (10^{-8} M; Sigma). Three days later, ascorbic acid (50 µg/ml; Sigma) and β-glycerophosphate (10 mM; Sigma) was added to allow mineralization. Alizarin red S staining was used to detect the mineralized nodules formed. After staining, images were captured using a stereo microscope (Stemi 2000-C; Zeiss), and mineralized surfaces were quantified using the Qwin software (Leica). Two gap junction inhibitors were used: the Cx43 mimetic peptide Gap27 (250 µM; GeneCust) and the chemical agent 18α-glycyrrheticin (50 µM; Sigma). Medium in presence or absence of GJIC inhibitors was replaced by fresh medium every 24h.

Western Blot

Cells were lysed in a lysis buffer and analyzed as previously described (Tacheau *et al.*, 2008). The membranes were blotted with antibodies to Cx43 or GAPDH (Sigma).

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using NucleoSpin[®]RNAII (Macherey Nagel) and used for first strand cDNA synthesis using ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Real-time PCR was performed with a Chromo4 instrument (Biorad). Sequences are provided in Table 1.

Transient cell transfections, reporter assays and plasmid constructs

Transient cell transfections were performed with jetPEI™ (Polyplus-transfection). The phRLMLP*Renilla* luciferase expression vector was cotransfected in every experiment to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega). The plasmid -2400Cx43-lux was a gift from GI Fishman, The Leon H. Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine, New York, NY.

RNA interference

Modified hMSC cells were obtained by lentiviral cell transduction as previously described (Trichet *et al.*, 2006). Oligonucleotides were designed and cloned into pSUPER to produce the short hairpin RNA shRNACx43 directed against the human Cx43 gene. The targeted sequence was TGCTGCGAACCTACATCAT. The cloned oligonucleotides were controlled by sequencing (Genome Express) before subcloning them with the upstream H1 promoter into the vector pFG12. As a control, a vector pFG12 was developed to produce shRNAs targeting the LacZ gene. The resulting constructs were used for lentivirus production following the protocols provided with the ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen) to transduce hMSCs.

Parachute assay

Gap junctional intercellular communication (GJIC) was determined by “parachute” assay, as previously described (Ziambaras *et al.*, 1998). Cell cultures were divided into “acceptor” and “donor” cell groups. Adherent acceptor cells were loaded with Dil (Sigma; 5 μ M), a nontransferable membrane dye, for 1h, and confluent donor cells were dyed with calcein-acetoxymethylester (calcein-AM; Sigma; 1 μ M), a gap junction permeant dye, for 45 min. After loading, cells were washed in PBS to remove the excess dye. Then, the calcein-AM-dyed cells were trypsinized and parachuted on the Dil-dyed acceptor cell layer at a cell ratio of 1:10 and incubated at 37°C for 2h to allow calcein transfer via gap junctions. Dye coupling was analyzed using a FACS FC500 cytometer (Beckman Coulter). For the analysis of results, gates were established on the day of each experiment using non-dyed cells, cells dyed with calcein-AM, and cells dyed with Dil.

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software) with the unpaired t-test and are given as mean \pm SD. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Increased production of Cx43 during the differentiation of hMSCs into osteoblasts

We first analyzed the production of Cx43 during hMSC differentiation into osteoblasts. As shown in Figure 1, incubation of hMSCs in monolayer cultures with osteogenic medium over 2 weeks resulted in osteogenesis. As the differentiation progressed, there was a marked increase in mineral deposition as assessed by Alizarin red S staining (Fig. 1A). Concurrently, there was an increase in the expression of genes associated with osteoblast differentiation (Fig. 1B). Quantitative real-time PCR demonstrated that the levels of transcripts encoding OC and BSP gradually increased starting at day 5 and day 13, respectively, until the end of the experiment. The transcript levels of ALP also increased from day 3 to day 7, and then slowly returned to basal level. Interestingly, Western-Blot analysis showed a significant increase in Cx43 protein level after treatment of hMSCs with osteogenic medium for 9 days, which remained stable until day 15 (Fig. 1C). By contrast, no change in the expression of Cx40 or Cx45 was observed during the process of hMSC differentiation (data not shown). To determine whether the induction of Cx43 production during hMSC differentiation occurred via modulation of the corresponding gene, the *Cx43* mRNA steady-state levels following treatment with osteogenic medium were measured by real-time PCR. As shown in Figure 1D, induction of *Cx43* mRNA was observed in response to osteogenic medium after 9 days of treatment, and *Cx43* levels remained elevated until day 17. To further explore whether the effect of osteogenic medium on *Cx43* gene expression takes place at the transcriptional level, transient cell transfections were performed with the *Cx43* promoter/gene reporter construct -2400Cx43-lux. As shown in Figure 1E, osteogenic medium induced a 6.5-fold transactivation of the *Cx43* promoter in hMSCs after 9 days of treatment. To determine whether the increase in *Cx43* gene expression in hMSCs during osteogenic differentiation is associated with gap junctional intercellular communication changes, GJIC was analyzed by FACS analysis using the parachute assay. GJIC was significantly enhanced (26-fold increase) after 17 days of incubation of hMSCs with osteogenic medium (Fig. 1F).

Together, these results demonstrated an increase in Cx43 production and subsequent cell-cell communication during the differentiation of hMSCs into osteoblasts.

Small interfering RNA against Cx43 inhibits the differentiation of hMSCs into osteoblasts

We next investigated the role of Cx43 in hMSC osteogenic differentiation. To this end, Cx43 was stably knocked down in hMSCs by transduction with a lentiviral vector. shCx43 cells were characterized by a significant (70%) reduction in Cx43 mRNA levels compared to shLacZ or parental cells used as controls (Fig. 2A). This decrease was confirmed at the protein level (Fig. 2B). No change in Cx40 or Cx45 gene expression was detected after hMSC induction with the shRNA against Cx43 (data not shown). In addition, GJIC analysis using the parachute assay demonstrated that GJIC was significantly decreased (by 50%) in shCx43 cells compared to LacZ cells or parental hMSCs (Fig. 2C).

Interestingly, a marked decrease in mineral deposition was measured in shCx43 monolayer cultures compared to that measured in LacZ cultures or in parental cultures (Fig. 2D, left panel). After 17 days of treatment with osteogenic medium, shCx43 cultures showed significantly less (60%) Alizarin red S staining compared to shLacZ or parental cultures (Fig. 2D, right panel). Furthermore, a significant decrease in *OC*, *BSP* and *ALP* expression levels was observed in shCx43 cells in response to osteogenic medium compared to those measured in LacZ cells or in parental cells. *OC* and *BSP* mRNA steady-state levels were increased by approximately 180- and 16-fold, respectively, in parental and shLacZ cells, and only by 120- and 8-fold in shCx43 cells after treatment of hMSCs with osteogenic medium for 17 days. Similarly, *ALP* mRNA steady-state levels were increased by approximately 9-fold in parental and shLacZ cells, but only by 2-fold in shCx43 cells after 7 days of incubation with osteogenic medium (Fig. 2E).

Together, these results indicate a crucial role of Cx43 during hMSC differentiation into osteoblasts.

Inhibition of GJIC with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide blocks the differentiation of hMSCs into osteoblasts

We next investigated the potential role of GJIC in the osteogenic differentiation of hMSCs. To this aim, the inhibitor 18 α -glycyrrhetic acid or the peptide Gap27 were used to block GJIC between hMSC cells. The Gap27 peptide possesses conserved sequence homology to a portion of the second extracellular loop leading into the fourth transmembrane connexin segment (amino acid sequence SRPTEKTIFII) (Chaytor *et al.*, 1998). The Gap27 peptide is expected to inhibit junctions

built of Cx40 or Cx43, since the second extracellular loop of each of these connexin isoforms contains the crucial conserved sequence SRPTEK.

As shown in Figure 3A both, 18 α -glycyrrhetic acid and Gap27 peptide significantly block GJIC between hMSCs. In the presence of 50 μ M 18 α -glycyrrhetic acid or 250 μ M Gap27 peptide, the GJIC between hMSCs was reduced by 80% and 60%, respectively, even after 24h incubation of the cells. Interestingly, a significant decrease in mineral deposition was measured in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide compared to cells cultured in the absence of GJIC inhibitors. After 17 days of treatment with osteogenic medium, hMSCs treated with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide showed significantly less Alizarin red S staining (95% and 60%, respectively) compared to cells cultured without a GJIC inhibitor (Fig. 3B).

In agreement with these data, a significant decrease in *OC*, *BSP* and *ALP* expression levels in response to osteogenic medium was observed in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide compared to hMSCs cultured without an inhibitor (Fig. 3C). Treatment of hMSCs with osteogenic medium for 17 days induced an increase in *OC* and *BSP* mRNA steady-state levels of 137- and 10-fold, respectively. By contrast, *OC* and *BSP* levels increased by only 30- and 2.3-fold in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid, and by 63- and 4.7-fold in the presence of Gap27 peptide. Similarly, *ALP* mRNA steady-state levels were increased by 8.6-fold in the absence of a GJIC inhibitor, while treatment with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide induced only a 2.2-fold and 3.2-fold increase in mRNA levels, respectively, after 7 days of incubation of hMSC in osteogenic medium.

Together, these results suggest a key role for GJIC during the differentiation of hMSC into osteoblasts.

Discussion

Previous studies have demonstrated the importance of Cx43, the most abundant connexin in bone cells, in osteoblast function (Civitelli, 2008; Stains and Civitelli, 2005). However, the role of Cx43 in the initial differentiation of hMSCs into osteoblasts remains to be demonstrated.

In the present study, we firstly demonstrate that Cx43 expression is increased at the transcriptional level during the differentiation of hMSCs into osteoblasts. Many transcription factors control osteoblastogenesis. Among them, activator protein-1 (AP-1), a dimeric transcription factor formed by Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) and Jun proteins (c-Jun, JunB, JunD) is required for bone formation and remodeling (Eferl and Wagner, 2003). Ubiquitous balanced deletion of a conditional *c-jun* allele leads to malformations of the axial skeleton (Behrens *et al.*, 2003), and JunB has been shown to be essential for osteoblast differentiation (Kenner *et al.*, 2004). Most Fos proteins are also implicated in proliferation and differentiation of osteoblasts (Grigoriadis *et al.*, 1993). Interestingly, one AP-1-binding site has been identified in human Cx43 proximal promoter P1 (approximately 150 nucleotides up- and downstream of the transcription initiation site), suggesting that this AP-1 response element could be involved in the increased expression of Cx43 during hMSC differentiation into osteoblasts. In this context, the importance of AP-1 transcription factors for the regulation of Cx43 expression in the onset of labor to allow an increase in myometrial muscle cell coupling has been demonstrated (Geimonen *et al.*, 1996; Piersanti and Lye, 1995).

This study secondly demonstrates that Cx43 and subsequent GJIC play a major role during the differentiation of hMSCs into osteoblasts. It is well recognized that gap junctional communication plays an important role in the control of differentiation into different cell types and tissues (Duval *et al.*, 2002). Specifically, it has been shown that Cx43 and GJIC are crucial in the regulation of self-renewal and maintenance of pluripotency in embryonic stem cells (Todorova *et al.*, 2008).

Here, we used two independent procedures to reduce GJIC, a pharmacological approach with GJIC inhibitors (18 α -glycyrrhetic acid and Gap27 peptide) and a molecular approach using small interfering RNA against Cx43. While pharmacological inhibitors produced a general GJIC inhibition, shRNA treatment specifically targets Cx43. This molecular approach decreased gap-junctional coupling to a lesser extent than the chemical approach. Since Cx43 protein levels were reduced by

only 60-70% after treatment with shRNA, this may explain, at least in part, the observed differences between the two approaches. Furthermore, it cannot be excluded that other connexins, such as Cx40 and Cx45, may compensate for the decrease in GJIC due to small interfering RNA against Cx43. Nevertheless, we demonstrate here that all changes in GJIC lead to an alteration in the ability of hMSCs to differentiate into osteoblasts, demonstrating that GJIC plays a role in this process.

Gap junctions can mediate the passage of nucleotides, amino acids, ions and second messengers between coupled cells allowing ionic and metabolic signaling communication (Harris, 2007). Among these messengers able to cross through gap junctional channels, there is evidence that the spatial and temporal patterns of calcium are crucial in the regulation of the differentiation process. Not only the stable increase in Ca^{2+} intracellular concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$), but also the oscillations of $[\text{Ca}^{2+}]$ is a nearly universal mode of signaling in both excitable and non-excitable cells. In bone marrow-derived stem cells, these spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations were shown to depend on Inositol P_3 -mediated Ca^{2+} release from intracellular stores followed by Ca^{2+} influx from the extracellular compartment (Kawano *et al.*, 2002). In this context, it has been shown that $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations can be phase locked by intercellular coupling through gap junctions (Dupont *et al.*, 2007). We can thus hypothesize that Cx43-mediated gap junctional intercellular communication drives the differentiation of hMSCs into osteoblasts via its ability to propagate $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations. However, future studies are required to establish the nature of the signals, Ca^{2+} or others, that drive the hMSC differentiation process.

hMSCs are of great promise in regenerative medicine, providing novel therapeutic strategies for a variety of disorders. Bone marrow-derived MSCs remain a viable alternative, and are particularly attractive in the context of bone tissue engineering and other reconstructive applications given that autologous cells may be used for eventual therapy. If indeed GJIC plays a crucial role in the control of stem cell differentiation programs, cell therapies should assure that cellular communication between stem cells is available after cell transplantation, since this interaction may be a prerequisite for proper cell commitment towards organ-specific cell types.

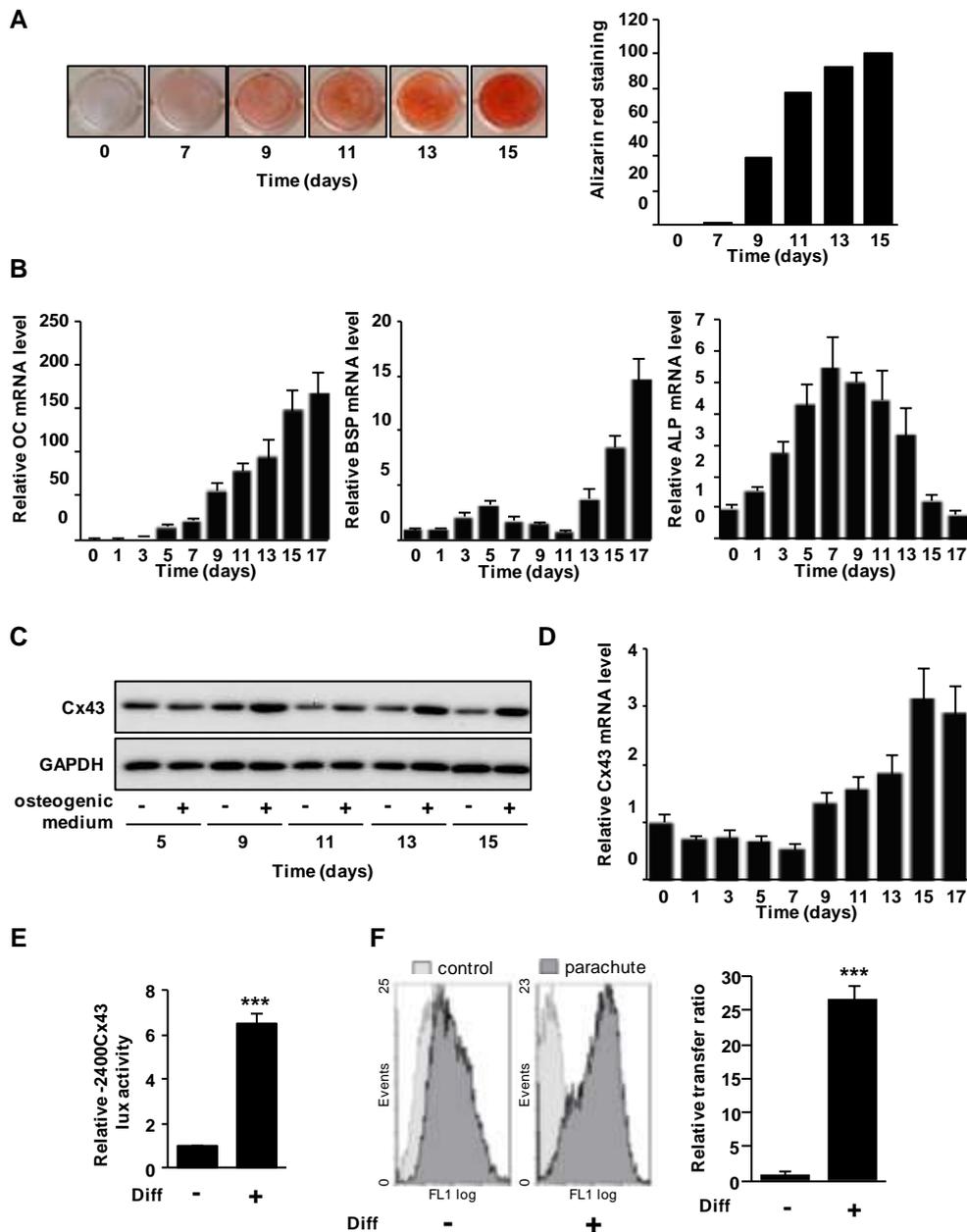


Figure 1: Increase of Cx43 production during the differentiation of hMSCs into osteoblasts

hMSCs were cultured in the presence or absence of osteogenic medium (Diff) up to 17 days.

(A) At each time point, cultures were fixed and stained with Alizarin red S.

(B) Osteocalcin (OC), Bone Sialoprotein (BSP) and Alkaline Phosphatase (ALP) mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR, and expressed relative to the control culture in absence of osteogenic medium. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

(C) Cx43 production was detected by Western Blot analysis. Result shown is representative of three independent experiments.

(D) Cx43 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR, and expressed relative to the control culture in absence of osteogenic medium. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

(E) hMSC cells were incubated in the presence or absence of osteogenic medium for 9 days. After incubation, cell cultures were transfected with the -2400Cx43-lux construct, and incubation continued for another 48h. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.01$

(F) FACS analysis of calcein transfer in hMSCs treated or not with osteogenic medium during 17 days. Histogram plots (left panel) represent the mean of fluorescence recorded in FL1 channel, which corresponds to calcein-positive cells. Control peak corresponds to cells dyed with Dil only, and parachute peak to cells double-labeled. Histograms (right panel) indicate mean of the relative transfer-ratio of calcein between cells, which represents a direct measure of the degree of dye coupling. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.01$

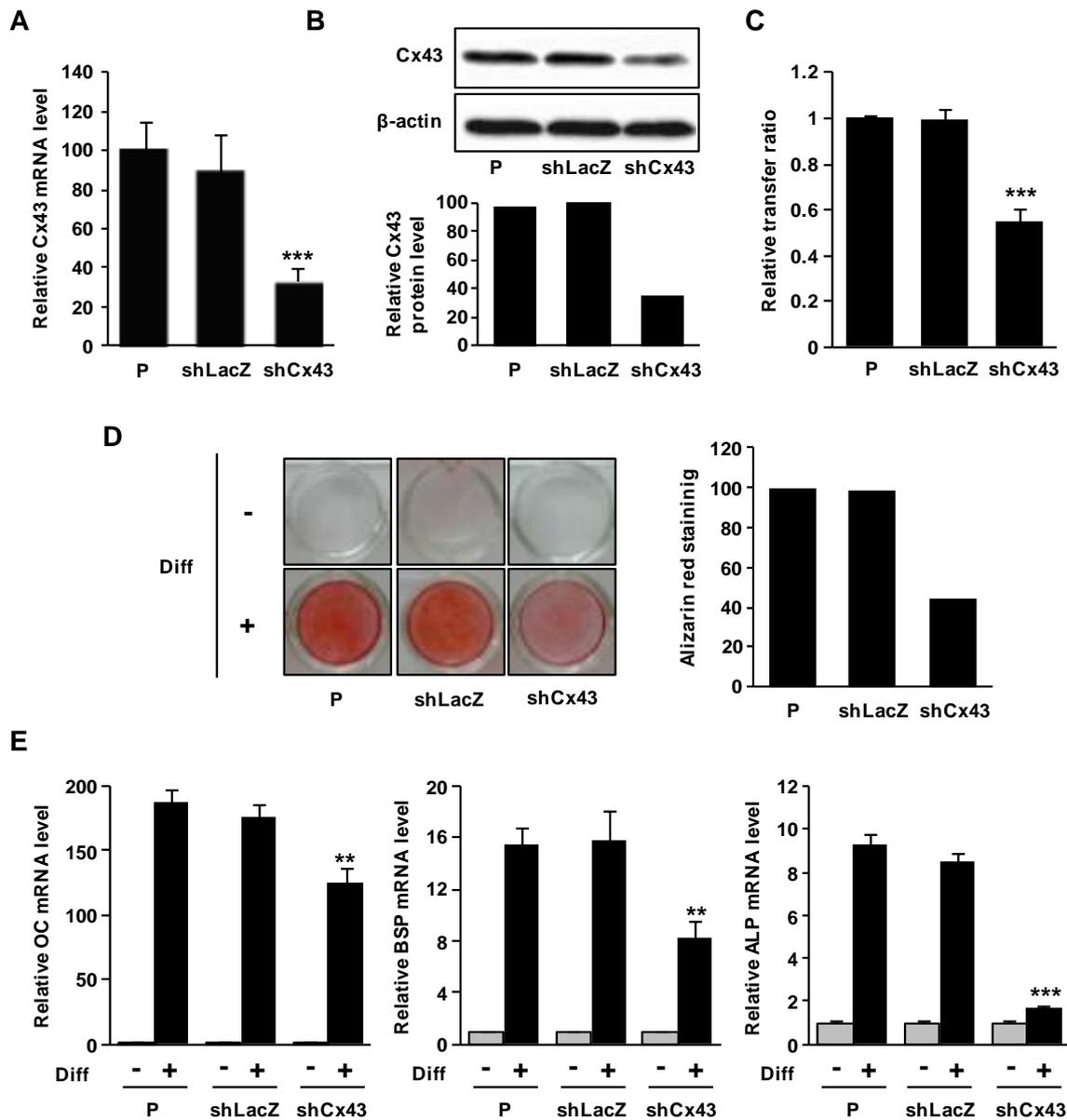


Figure 2: Small interfering RNA against Cx43 inhibits the differentiation of hMSCs into osteoblasts

(A) Cx43 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR in parental (P), shLacZ and shCx43 cells as indicated. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.01$

(B) Cx43 production was detected by Western Blot analysis in parental, shLacZ and shCx43 cells as indicated. Result shown is representative of three independent experiments.

(C) FACS analysis of calcein transfer in parental, shLacZ and shCx43 hMSCs treated or not with osteogenic medium (Diff) for 17 days. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.01$

(D) Parental, shLacZ and shCx43 hMSCs were cultured in the presence or absence of osteogenic medium. 17 days after induction of osteogenesis, cultures were fixed and stained with Alizarin red S.

(E) Parental, shLacZ and shCx43 cells were cultured in the presence or absence of osteogenic medium. After 17 days of treatment, OC and BSP mRNA steady-state levels were measured by quantitative RT-PCR. The expression of ALP was determined after incubation of hMSCs with osteogenic medium for 7 days. (**) $p < 0.05$; (***) $p < 0.01$

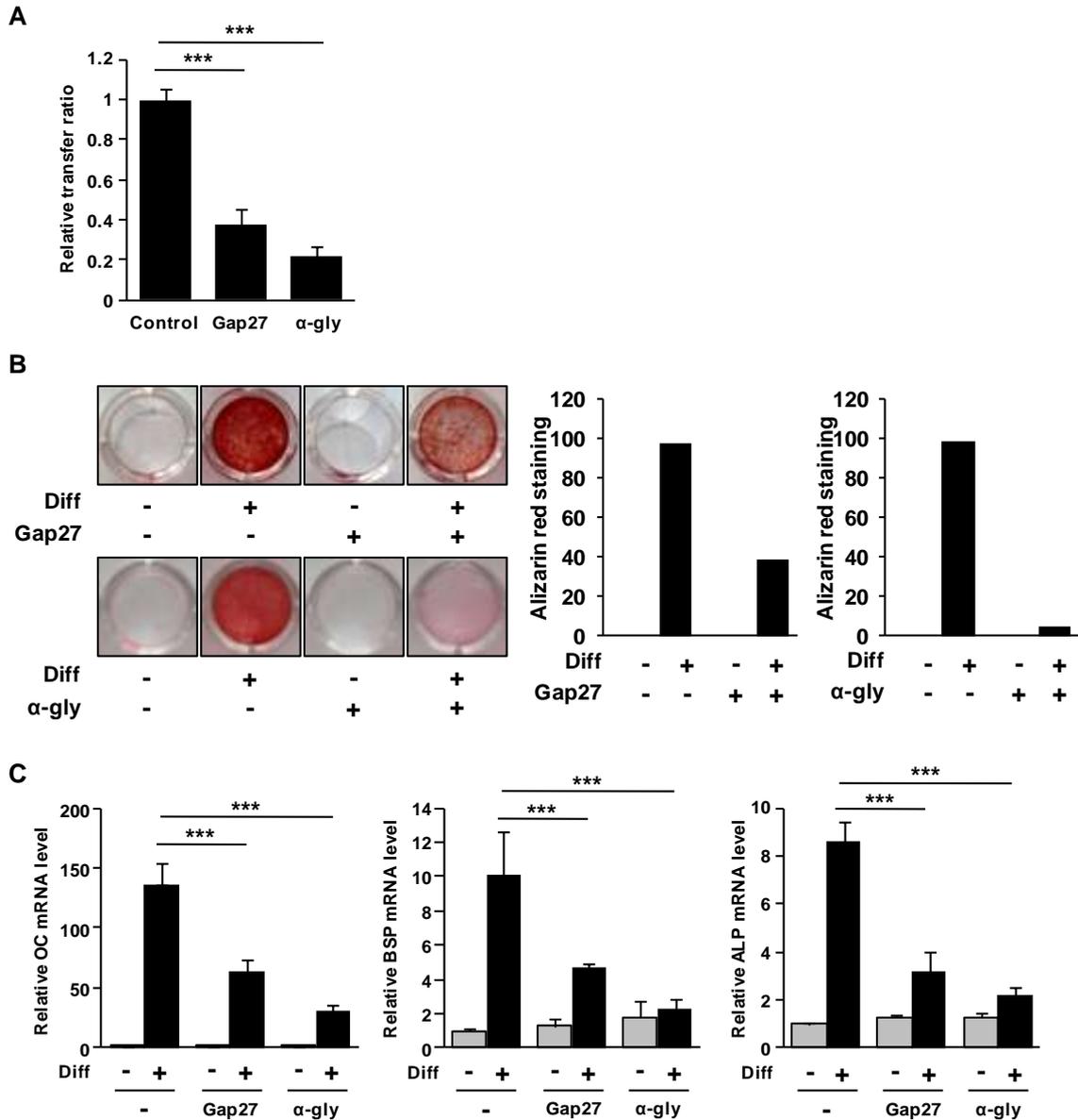


Figure 3: GJIC inhibitors block the differentiation of hMSCs into osteoblasts

(A) FACS analysis of calcein transfer in hMSCs treated or not with 18 α -glycyrrhetic acid (50 μ M) or Gap27 peptide (250 μ M) for 24h. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) p <0.01)

(B) Cultures were fixed and stained with Alizarin red S 17 days after induction of osteogenesis in the presence or absence of 18 α -glycyrrhetic acid (50 μ M) or Gap27 (250 μ M).

(C) hMSCs were cultured in the presence of GJIC inhibitors (α -glycyrrhetic acid or Gap27) as indicated. 17 days after treatment of the cells with osteogenic medium (Diff), OC and BSP mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. The expression of ALP was determined after treatment with osteogenic medium for 7 days. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (***) p <0.01)

Table 1. Primer sequence for quantitative RT-PCR

Gene	Gene (full name)	Accession number	Forward primer	Reverse primer
Cx43	Connexin43	NM_000165.3	gcctgaactgcctttcat	ctccagtcacccatgttc
OC	Osteocalcin	NM_199173.2	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc
BSP	Bone sialoprotein	NM_004967	cgaatacacgggcgtcaatg	gtagctgtactcatctcataggc
ALP	Alkaline phosphatase	NM_000478.3	aacaccaccaggggaac	ggtcacaatgccacagatt
Hprt 1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	NM_000194.1	tgacctgattatattgcatacc	cgagcaagacgtcagtcct
Cyc1	Cytochrome c-1	NM_001916	gcatggtggtgaggactacg	ggccaggaaagtaggggttg

References

- Behrens, A., Haigh, J., Mechta-Grigoriou, F., Nagy, A., Yaniv, M., & Wagner, E. F. (2003). Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development*, *130*, 103-109.
- Chaytor, A. T., Evans, W. H., & Griffith, T. M. (1998). Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *J. Physiol.*, *508*, 561-573.
- Civitelli, R. (2008). Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.*, *473*, 188-192.
- Dupont, G., Combettes, L., & Leybaert, L. (2007). Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int. Rev. Cytol.*, *261*, 193-245.
- Duval, N., Gomès, D., Calaora, V., Calabrese, A., Meda, P., & Bruzzone, R. (2002). Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *J. Cell Sci.*, *115*, 3241-3251.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, *3*, 859-868
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.*, *20*, 263-272.
- Geimonen, E., Jiang, W., Ali, M., Fishman, G. I., Garfield, R. E., & Andersen, J. (1996). Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J. Biol. Chem.*, *271*, 23667-23674.
- Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., & Wagner, E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.*, *122*, 685-701.
- Harris, A. L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, *94*, 120-143.
- Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., & Hiraoka, M. (2002). Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell calcium*, *32*, 165-174.

Kenner, L., Hoebertz, A., Beil, F. T., Beil, T., Keon, N., Karreth, F., Eferl, R., *et al.* (2004). Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J. Cell Biol.*, *164*, 613-623.

Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, *84*, 381-388.

Lecanda, F., Towler, D. A., Ziambaras, K., Cheng, S. L., Koval, M., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (1998). Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol. Biol. Cell*, *9*, 2249-2258.

Lecanda, F., Warlow, P. M., Sheikh, S., Furlan, F., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J. Cell Biol.*, *151*, 931-944.

Li, Z., Zhou, Z., Yellowley, C. E., & Donahue, H. J. (1999). Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone*, *25*, 661-666.

Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.*, *343*, 289-302.

Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci.*, *10*, 63-76.

Piersanti, M., & Lye, S. J. (1995). Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology*, *136*, 3571-3578.

Pluciennik, F., Verrecchia, F., Bastide, B., Hervé, J. C., Joffre, M., & Délèze, J. (1996). Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J. Membr. Biol.*, *149*, 169-177.

Schiller, P. C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A., & Howard, G. A. (2001). Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone*, *28*, 362-369.

Sosinsky, G. E., & Nicholson, B. J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta*, 1711, 99-125.

Stains, J. P., & Civitelli, R. (2005). Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1719, 69-81.

Tacheau, Chloé, Laboureau, J., Mauviel, A., & Verrecchia, F. (2008). TNF- α represses connexin43 expression in HaCat keratinocytes via activation of JNK signaling. *J. Cell. Physiol.*, 216, 438-444.

Tacheau, Charlotte, Fontaine, J., Loy, J., Mauviel, A., & Verrecchia, F. (2008). TGF- β induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epithelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways. *J. Cell Physiol.*, 217, 759-768.

Todorova, M. G., Soria, B., & Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J. Cell. Physiol.*, 214, 354-362.

Trichet, V., Benezech, C., Dousset, C., Gesnel, M.-C., Bonneville, M., & Breathnach, R. (2006). Complex interplay of activating and inhibitory signals received by V γ 9V δ 2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *Journal of immunology*, 177, 6129-6136.

Verrecchia, F., Duthe, F., Duval, S., Duchatelle, I., Sarrouilhe, D., & Herve, J. C. (1999). ATP counteracts the rundown of gap junctional channels of rat ventricular myocytes by promoting protein phosphorylation. *J. Physiol.*, 516, 447-459.

Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., & Millán, J. L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J. Bone Miner. Res.*, 15, 1879-1888.

Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (1998). Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.*, 13, 218-228.

III. COMPLEMENTS DE DISCUSSION DE L'ARTICLE 1

De précédentes études ont démontré l'importance de la Cx43, la principale connexine du tissu osseux, dans la fonction des ostéoblastes (Stains and Civitelli, 2005c; Civitelli, 2008). Cependant, l'implication de la Cx43 dans la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures n'a pas encore été mise en évidence.

Dans cette étude, nous avons démontré, dans un premier temps, que l'expression de la Cx43 augmentait au cours de la différenciation des hMSC en ostéoblastes. L'ostéoblastogénèse est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription, résultant en une induction d'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes et par conséquent à l'acquisition du phénotype ostéoblastique. Parmi eux, le facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) est requis pour la formation et le remodelage osseux. AP-1 est un facteur de transcription dimérique formé par un membre des familles protéiques Jun (c-Jun, JunB, JunD) et Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB, Δ FosB) (Eferl and Wagner, 2003). c-Fos a été le premier membre de la famille AP-1 à être reconnu comme régulant la prolifération des ostéoblastes ainsi que l'expression de gènes ostéoblastiques (Machwate *et al.*, 1995a, 1995b). Par la suite, des études ont montré que la plupart des protéines de la famille Fos sont impliquées dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Grigoriadis *et al.*, 1993; Marie, 2008). *In vivo*, la surexpression de Fra-1 et de Δ FosB (un variant épissé de FosB) entraîne une ostéosclérose probablement due à une accélération de la différenciation des ostéoprogéniteurs en ostéoblastes matures (Jochum *et al.*, 2000; Sabatakos *et al.*, 2000). A l'inverse, l'invalidation de Fra-1 et de JunB résulte en une réduction de la formation et de la masse osseuse chez les souris (Eferl *et al.*, 2004; Kenner *et al.*, 2004). De même, la délétion conditionnelle de c-Jun entraîne des malformations de l'axe squelettique (Behrens *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'un site AP-1 a été identifié au niveau du promoteur de la Cx43 humaine suggérant que ce site pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'expression de la Cx43 au cours de la différenciation des hMSC en ostéoblastes. En effet, un ou plusieurs sites AP-1 (le promoteur de la Cx43 de rat contient deux sites AP-1 alors que les promoteurs humain et murin n'en contiennent qu'un seul) sont localisés au niveau du promoteur proximal P1 de la Cx43 à approximativement 150 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (Oyamada *et al.*, 2005). L'importance du facteur de transcription AP-1 dans la régulation de l'expression de la Cx43 a notamment été démontrée lors de l'accouchement en permettant l'augmentation du couplage des cellules musculaires du myomètre et par conséquent une synchronisation de la

contraction utérine (Geimonen *et al.*, 1996; Mitchell and Lye, 2001). Dans ce contexte, Mitchell et Lye ont montré que les hétérodimères d'AP-1 comprenant à la fois un membre de chacune des familles protéiques Fos et Jun confèrent une meilleure activité transcriptionnelle de la Cx43 comparé aux homodimères de protéines Jun (Mitchell and Lye, 2005).

Ainsi, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse, suggérant que le site AP-1 présent au niveau du promoteur de la Cx43 serait impliqué dans l'augmentation de la transcription de cette connexine au cours de la différenciation ostéoblastique, par une étude transcriptionnelle. Cette étude transcriptionnelle pourrait être réalisée par transfection transitoire, dans des hMSC en cours de différenciation ostéoblastique, de différentes délétions en 5' du promoteur de la Cx43 afin de déterminer si ce site est impliqué dans l'augmentation de la transcription et de l'expression de la Cx43 au cours de la différenciation des hMSC en ostéoblastes. Des études complémentaires, notamment par ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) assay, permettraient également de confirmer ou non que certains membres de la famille AP-1 sont capables de s'accrocher sur le promoteur de la Cx43 lors de la différenciation des hMSC en ostéoblastes.

Cette étude a également mis en évidence le rôle crucial de la Cx43 ainsi que de la communication intercellulaire médiée par les jonctions gap (GJIC) durant la différenciation des hMSC en ostéoblastes. L'importance de la communication intercellulaire dans le contrôle de la différenciation a déjà été démontrée dans différents types cellulaires. Il a notamment été montré que la Cx43 ainsi que la GJIC jouent un rôle important dans la régulation de l'auto-renouvellement cellulaire et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonniques (Todorova *et al.*, 2008).

Dans cette étude, nous avons utilisé deux approches pour inhiber la GJIC, une approche pharmacologique avec des inhibiteurs de la GJIC (l'acide 18 α -glycyrrhétinique et le peptide Gap27) et une approche moléculaire (shRNA dirigé contre la Cx43). Alors que les inhibiteurs pharmacologiques entraînent une inhibition générale de la GJIC tout en conservant l'expression de la Cx43, l'utilisation du shRNA dirigé contre la Cx43 induit une diminution spécifique de l'expression de la Cx43 et par conséquent une réduction de la GJIC liée spécifiquement aux canaux intercellulaires constitués de Cx43. Ainsi, ces deux approches complémentaires permettaient de déterminer si le rôle de la Cx43 dans la différenciation des hMSC en ostéoblastes est dépendant ou non de la GJIC. La réduction de la GJIC a entraîné dans les deux cas un ralentissement de la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures associé à une diminution de l'expression des gènes ostéoblastiques conduisant à un défaut de minéralisation. Cependant, une différence d'efficacité de ces deux approches a pu être observée. En effet, l'approche moléculaire est apparue moins efficace à inhiber la

différenciation ostéoblastique. Cette observation est probablement due en partie au fait que seul 60-70% de la production de Cx43 ayant été inhibée par le shRNA-Cx43, la réduction de la GJIC par ce dernier était moindre comparée à celle obtenue avec les inhibiteurs pharmacologiques. De plus, il ne peut pas être exclu que les autres connexines exprimées dans les hMSC, les connexines 40 et 45, aient compensé la diminution de la GJIC induite par le shRNA-Cx43, atténuant ainsi les effets de la perte de communication intercellulaire sur la différenciation ostéoblastique. Par ailleurs, il s'est également avéré que l'habileté des inhibiteurs pharmacologiques à inhiber la différenciation cellulaire était dépendante de leur capacité à inhiber la GJIC. En effet, l'acide 18 α -glycyrrhétinique est plus efficace à inhiber la GJIC que le peptide Gap27, et entraîne un ralentissement de la différenciation ostéoblastique plus important que ce dernier.

Les jonctions gap peuvent médier le transfert de molécules informatives, telles que les nucléotides, les acides aminés, les ions et les seconds messagers entre cellules adjacentes permettant un couplage ionique et métabolique des cellules nécessaire à l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Saez *et al.*, 2003; Harris, 2007). Cette interaction cellulaire facilite la coordination ou la synchronisation de divers processus au sein d'une population cellulaire, allant du profil d'expression génique, des cascades biochimiques à la fonctionnalité. Ainsi, les jonctions gap sont impliquées dans la régulation de fonctions telles que la croissance, la différenciation, la survie et la mort cellulaire (Wei *et al.*, 2004; Krysko *et al.*, 2005). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que l'altération de la GJIC, par des inhibiteurs pharmacologiques ou un outil moléculaire, modifie l'homéostasie des hMSC, affectant ainsi leur profil d'expression génique ainsi que leurs propriétés biochimiques. Dans cette étude, nous avons démontré que toutes perturbations de la GJIC conduit à une altération de la capacité des hMSC à se différencier en ostéoblastes, indiquant ainsi le rôle essentiel de la GJIC dans ce processus. Ces résultats concordent et peuvent expliquer les altérations osseuses observées *in vivo* chez les souris KO pour la Cx43 (Lecanda *et al.*, 2000).

Parmi les seconds messagers capables de diffuser à travers les jonctions gap, il est connu que le Ca²⁺, l'IP₃ et l'AMPc sont impliqués, entre autres, dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, généralement par une modulation de l'expression de gènes ou de facteurs de transcription nécessaires à ces processus. Concernant le Ca²⁺, des études ont montré que le profil spatio-temporel de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) est crucial pour la régulation de la différenciation cellulaire. L'augmentation stable de [Ca²⁺]_i mais également les oscillations de [Ca²⁺]_i constituent un mode de signalisation calcique des cellules excitables et non excitables. Des oscillations de [Ca²⁺]_i ont ainsi été identifiées dans de nombreux types cellulaires, incluant les hépatocytes

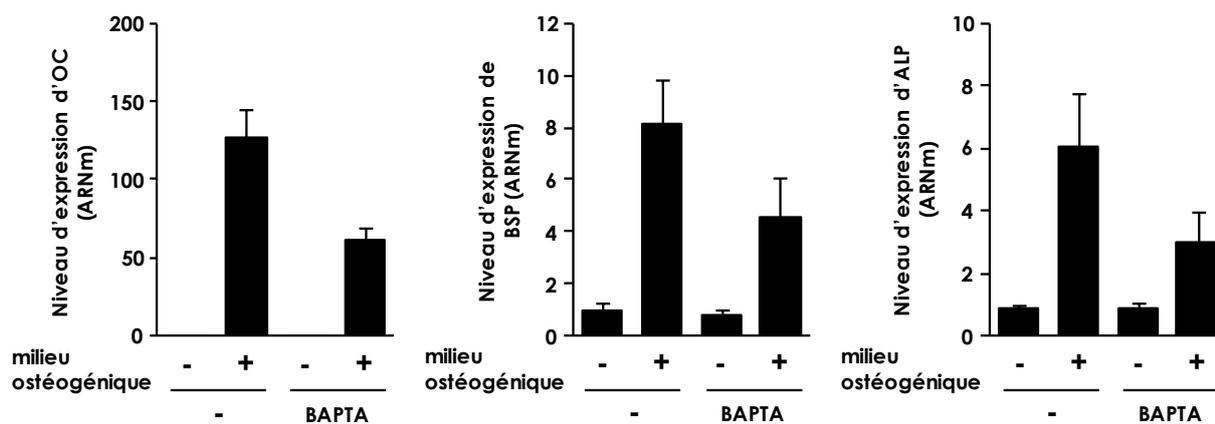


Figure 26 : Le BAPTA, un chélateur du Ca^{2+} , inhibe la différenciation des hMSC en ostéoblastes

Afin d'induire leur différenciation ostéoblastique, des hMSC sont cultivées en milieu ostéogénique. La capacité des hMSC à se différencier en ostéoblastes matures en réponse à un traitement avec un chélateur de Ca^{2+} , le BAPTA ($2 \mu\text{M}$), est évaluée par l'étude transcriptionnelle des marqueurs ostéoblastiques.

(Woods *et al.*, 1986), les fibroblastes (Vay *et al.*, 2007), les cellules acineuses pancréatiques (Menteyne *et al.*, 2006), les astrocytes (Morita *et al.*, 2003) et les cellules souches embryonniques en différenciation (Sauer *et al.*, 1998; Kapur *et al.*, 2007). Des oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ spontanées ont également été observées dans les cellules souches dérivées de la moelle osseuse. Ces oscillations sont dépendantes de l' IP_3 qui déclenche une libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique, suivie par des influx calciques provenant du milieu extracellulaire via les canaux SOC (Kawano *et al.*, 2002). Ces oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ régulent la prolifération et la différenciation de divers types cellulaires dont les cellules souches (Sauer *et al.*, 2011). Récemment, il a été montré que l'altération des oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ par une stimulation électrique, facilite l'ostéodifférenciation des hMSC traitées avec des agents ostéoinducteurs (Sun *et al.*, 2007). Dans ce contexte, il a été démontré que les oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ peuvent se propager de cellules à cellules via les jonctions gap (Dupont *et al.*, 2007).

Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous émettons l'hypothèse que la communication intercellulaire médiée par les jonctions gap formées de Cx43 contrôle la différenciation des hMSC en ostéoblastes via leur capacité à propager des oscillations de $[Ca^{2+}]_i$. Afin de vérifier cette hypothèse, une première étude a été réalisée au laboratoire sur des hMSC cultivées en milieu ostéogénique et traitées ou non avec un chélateur de Ca^{2+} , le BAPTA (2 μ M) (Figure 26). Leur différenciation en ostéoblastes a été évaluée par une étude transcriptionnelle des marqueurs ostéoblastiques OC, BSP et ALP. Les résultats obtenus montrent une inhibition de la différenciation ostéoblastique associée à une diminution d'environ 50% de l'expression des gènes ostéoblastiques. Ainsi, ces résultats démontrent que la $[Ca^{2+}]_i$ joue un rôle important dans ce processus d'ostéodifférenciation des hMSC.

Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la nature exacte des signaux, Ca^{2+} ou autres, impliqués dans le processus de différenciation des hMSC. Le signal calcique pourrait notamment être mis en évidence, au cours de la différenciation ostéoblastique, en microscopie confocale par l'utilisation d'une sonde calcique fluorescente, Fluo4-AM. Cette technique permettrait d'évaluer également l'implication des jonctions gap dans la propagation de ce signal lors du processus de différenciation par l'utilisation d'inhibiteur de la GJIC.

Par ailleurs, il ne peut pas être exclu que ces vagues calciques soit déclenchées en premier lieu par une propagation de l' IP_3 à travers les jonctions gap. L' IP_3 représente donc un second médiateur plausible capable de réguler ce processus de différenciation ostéoblastique. L'AMPC peut également diffuser à travers les jonctions gap, cependant il s'avère que cette molécule serait plutôt un régulateur négatif de l'ostéogenèse en inhibant l'expression du gène Runx2. Cet effet ne concorde donc pas avec nos résultats qui montrent

un contrôle positif de la différenciation ostéoblastique par les jonctions gap (Tintut *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008).

Notre étude souligne le fait que la GJIC est un élément essentiel dans le processus de différenciation des hMSC en ostéoblastes matures. Cependant, la nature des signaux diffusant à travers les jonctions gap, afin de réguler ce processus, reste encore à élucider. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le processus de différenciation des hMSC est cruciale pour une utilisation médicale de ces cellules. La pluripotence des MSC fait de ces cellules un outil prometteur en médecine régénérative, fournissant ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques pour de nombreuses pathologies. Les cellules autologues pouvant être utilisées en thérapie, les MSC dérivées de la moelle osseuse apparaissent particulièrement attractives dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse ainsi que de d'autres applications reconstructives. Cependant, malgré de bons résultats obtenus au cours de nombreuses études, l'ingénierie tissulaire osseuse se heurte à d'importantes limites avant de pouvoir être appliquée en thérapie clinique. En effet, l'application *in vivo* de thérapies cellulaires utilisant des hMSC se trouve actuellement entravée, en partie due au fait que les voies de signalisation, les mécanismes ainsi que les interactions cellules-cellules impliqués dans l'engagement de ces cellules dans une voie de différenciation ne sont pas encore totalement bien compris.

Ainsi au vu du rôle essentiel de la GJIC dans le contrôle de la différenciation des hMSC démontré *in vitro* dans cette étude, il serait intéressant de confirmer cette importance de la communication cellulaire *in vivo* en utilisant des modèles pré-cliniques d'ingénierie tissulaire osseuse. Au laboratoire, il a notamment été développé un modèle associant des hMSC à des matériaux synthétiques, correspondant à des particules de biocéramique phosphocalcique (BCP), permettant ainsi l'obtention d'un environnement 3D biomimétique dans lequel les hMSC sont capables de se différencier en ostéoblastes. Ce modèle, après implantation *in vivo* chez des souris nude, permet l'obtention d'une quantité osseuse importante (Cordonnier *et al.*, 2012). Cette approche, combinant cellules-matériaux, pourrait ainsi être utilisée *in vivo* en associant les hMSC modifiées avec le shRNA-Cx43 aux particules de BCP afin d'étudier si la formation osseuse normalement observée est réduite par l'altération de la GJIC engendrée.

Par ailleurs, une étude a montré que la surexpression de la Cx43 dans des MSC dérivées de la moelle osseuse murine augmente leur différenciation ostéogénique dans un modèle de culture 3D sur particules de gélatine et que la transplantation *in vivo* de ces cellules permet d'augmenter le volume de la fraction osseuse et d'uniformiser le tissu régénéré chez des souris nude (Rosselló *et al.*, 2009).

Ainsi, afin d'améliorer l'efficacité des techniques d'ingénierie tissulaire osseuse utilisant les MSC, il est important de s'assurer de l'existence d'une communication via les jonctions gap entre ces cellules souches après transplantation cellulaire.

Partie 2 :
Rôle de la Cx43 dans le
développement du sarcome
d'Ewing

I. JONCTIONS COMMUNICANTES ET CANCER

Le cancer a été la première pathologie humaine à être associée à une altération des jonctions communicantes. Durant ces 40 dernières années, de nombreuses études ont reporté que le phénotype cancéreux est souvent associé à une perte du couplage jonctionnel, et que la restauration de cette communication intercellulaire peut « normaliser » ce phénotype. Les connexines sont ainsi considérées comme des suppresseurs de tumeurs. Cependant, l'implication moléculaire réelle des jonctions communicantes et de leurs protéines structurales, les connexines, dans la cancérogenèse est encore loin d'être totalement élucidée. Depuis quelques années, de nouvelles données ont émergé suggérant un rôle beaucoup plus complexe des connexines dans la progression tumorale et probablement dépendant de la phase du processus tumoral considérée.

I.1. Jonctions gap et tumeurs primaires

C'est en 1966 que Loewenstein et Kanno ont établi pour la première fois un lien entre les jonctions gap et le cancer, en montrant une absence de couplage électrique entre des cellules tumorales hépatiques de rat (Loewenstein and Kanno, 1966). Durant la même période, des observations similaires ont été faites lors de l'étude de tumeurs thyroïdiennes chez le rongeur (Jamakosmanović and Loewenstein, 1968) et de tumeurs de l'estomac chez l'homme (Kanno and Matsui, 1968). Au vu de ces données, W.R. Loewenstein émit l'hypothèse que les jonctions gap sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Loewenstein, 1979). Selon ce précepte, le rôle principal de la GJIC serait de permettre l'échange de molécules entre les cellules afin de participer à la régulation de l'homéostasie tissulaire. Cette théorie suggère donc que la diminution de la GJIC permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper au contrôle de la prolifération cellulaire par les cellules saines environnantes via par exemple la diffusion de signaux apoptotiques. De ce fait, les cellules tumorales pourraient ainsi proliférer de manière anarchique. Par la suite, cette hypothèse a été confortée par le fait que des promoteurs tumoraux, tels que le tétradécanoyl 12-13 phorbol acétate (TPA) extrait du croton, inhibent la communication jonctionnelle de cellules en culture. Ainsi, la plupart des promoteurs tumoraux sont considérés comme des inhibiteurs de la GJIC, suggérant l'implication de la communication intercellulaire dans le processus de cancérogenèse (Budunova and Williams, 1994) (Figure 27).

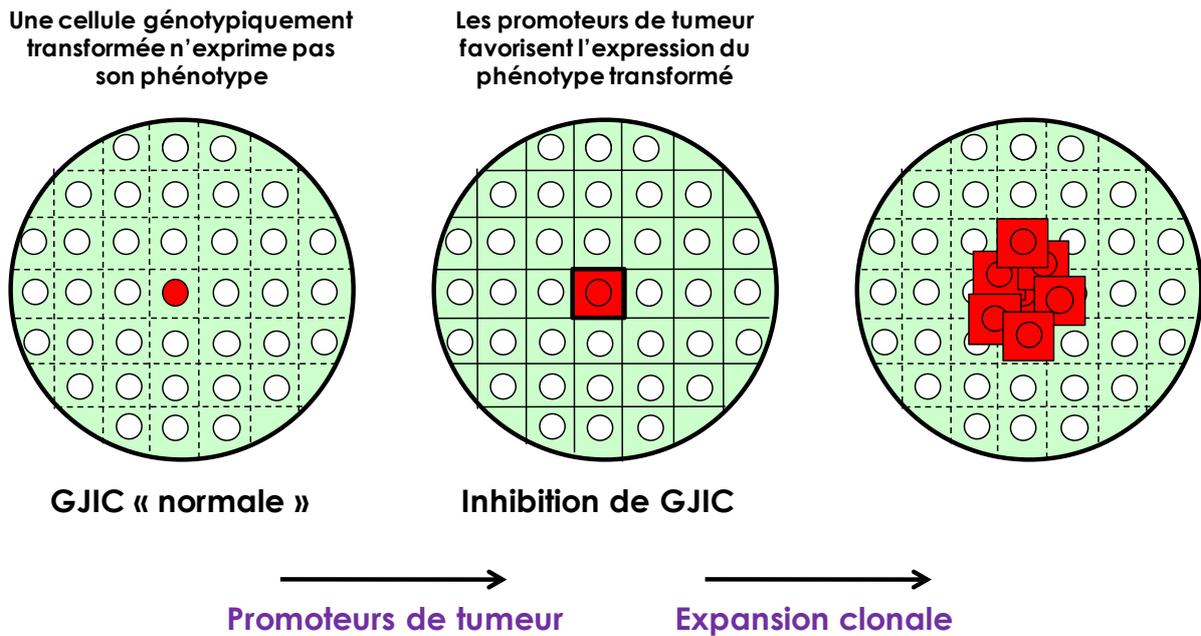


Figure 27 : Implication des jonctions communicantes durant la cancérogénèse

(modifiée d'après Mesnil, 2004)

Au sein d'une population cellulaire, une cellule génotypiquement transformée (noyau rouge) n'exprimerait pas son phénotype si toutes les cellules environnantes communiquent entre elles via les jonctions gap (traits pointillés). Les promoteurs de tumeur favoriseraient l'expression du phénotype transformé (cytoplasme rouge) en inhibant le réseau de communication jonctionnelle intercellulaire. L'expression de son phénotype transformé et le taux accru de réplication cellulaire qui s'ensuivrait conduiraient alors à la prolifération clonale de la cellule transformée.

De nombreuses études se sont alors intéressées au rôle des jonctions gap dans le développement des tumeurs primaires. La plupart de ces études, réalisées sur divers modèles (*in vitro*, modèles animaux, biopsies humaines) ont confirmé l'hypothèse de Loewenstein en démontrant que le phénotype cancéreux est fréquemment associé à une perte ou une réduction de la communication jonctionnelle (Mesnil *et al.*, 2005). Ce phénomène a notamment été retrouvé dans les gliomes (Huang *et al.*, 1999) ainsi que dans des carcinomes pulmonaires (Ruch *et al.*, 2001), rénaux, endométriaux (Saito *et al.*, 2001), mammaires (Laird *et al.*, 1999), cervicaux (King *et al.*, 2000b) et prostatiques (Tsai *et al.*, 1996). Par exemple, une diminution d'expression de la Cx43 associée à une réduction du couplage jonctionnel a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires de carcinomes pulmonaires humains et murins comparées à des cellules épithéliales pulmonaires saines (Cesen-Cummings *et al.*, 1998). Cette anomalie de communication consiste soit en une perte de communication homologue, c'est-à-dire entre les cellules cancéreuses, soit en une absence de communication entre les cellules tumorales et les cellules normales, nommée communication hétérologue (Yamasaki and Naus, 1996). Cette altération de la GJIC peut être la conséquence de deux phénomènes majeurs : une perte d'expression ou une localisation aberrante des connexines. En effet, les données moléculaires obtenues dans différentes lignées de cellules tumorales ou dans des modèles animaux, ont montré que chacune des étapes conduisant à l'établissement de la communication jonctionnelle (transcription, traduction, localisation cytoplasmique des connexines...) peut être perturbée et provoquer la perte de cette communication intercellulaire conduisant au phénomène de cancérisation (Cronier *et al.*, 2009) (Figure 28).

La perte d'expression des connexines est souvent associée à un défaut de transcription pouvant être causé par des modifications épigénétiques, telles que l'hyperméthylation de l'ADN. En effet, l'hyperméthylation des îlots CpG du gène de la Cx32 entraîne une diminution de l'expression de cette connexine observée dans des cellules de carcinome rénal humain (Hirai *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2004). De plus, le traitement de cellules HeLa déficiente pour la Cx43 avec l'agent déméthylant 5-aza-2'-deoxycytidine induit l'expression de cette connexine, suggérant que la perte d'expression de la Cx43 dans ces cellules était due à une méthylation de l'ADN (King *et al.*, 2000a). Cependant, ce n'est pas toujours le cas et les mécanismes responsables de la diminution transcriptionnelle des connexines dans les cellules tumorales restent encore à élucider.

Plusieurs études ont montré que les connexines peuvent présenter un défaut d'adressage à la membrane et ainsi se retrouver accumulées dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. C'est le cas notamment de la Cx32 dont la localisation est cytoplasmique dans les carcinomes hépatiques humains, entraînant ainsi une réduction de la

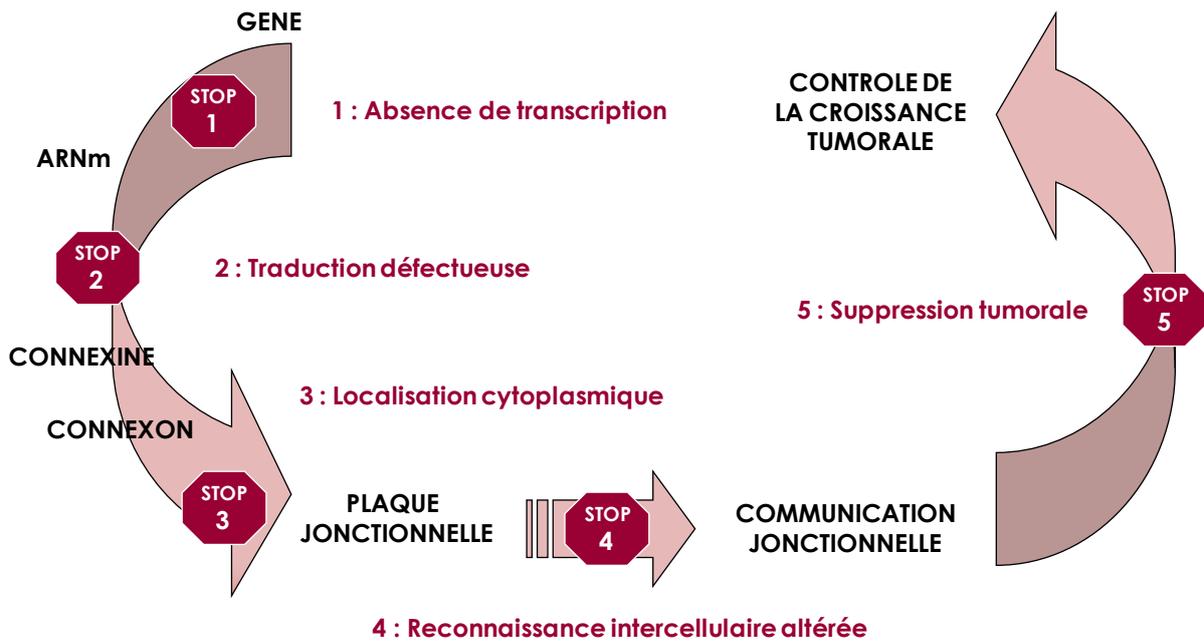


Figure 28 : Illustration de différents mécanismes pouvant mener à l'inhibition de GJC au cours de la cancérogenèse (modifiée d'après Cronier *et al.*, 2009)

Diverses données expérimentales ont montré que chacune des étapes conduisant à l'établissement de la communication jonctionnelle peut être perturbée et provoquer la perte de cette communication intercellulaire conduisant au phénomène de cancérisation. Ces données ont révélé l'existence de quatre événements majeurs (STOP) pouvant entraîner ce défaut de GJC : 1) un défaut de transcription des gènes des connexines, 2) un défaut de traduction des ARNm des connexines, 3) un défaut d'adressage à la membrane conduisant à une accumulation cytoplasmique des connexines, 4) un défaut de reconnaissance entre cellules adjacentes empêchant l'établissement d'une communication jonctionnelle intercellulaire. Des données récentes ont montré que la restauration de la GJC par réexpression des connexines n'est pas toujours suffisante pour induire une régulation de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, il semble que les connexines peuvent contrôler la croissance tumorale indépendamment de la communication intercellulaire.

la GJIC sans altération de l'expression de cette connexine (Krutovskikh *et al.*, 1994). Ceci a également été mis en évidence par exemple dans des carcinomes mammaires chez le chien, dans lesquels il a été montré une diminution de l'expression des connexines 26 et 43 accompagnée d'une délocalisation cytoplasmique de ces connexines (Torres *et al.*, 2005). Toutefois, les mécanismes conduisant à une localisation aberrante des connexines dans le cytoplasme ne sont pas connus.

Par ailleurs, il a été démontré *in vivo* que les animaux transgéniques déficients pour une connexine spécifique présentent une susceptibilité plus importante au développement de certains types de tumeurs. Par exemple, les souris Cx32^{-/-} sont plus sensibles au développement de tumeurs hépatiques (Temme *et al.*, 1997) et les souris Cx43^{-/-} au développement de tumeurs pulmonaires (Avanzo *et al.*, 2004). De plus, des études ont montré que les oncogènes, tels que v-src, altèrent la communication jonctionnelle (Loo *et al.*, 1995).

Ainsi progressivement, l'hypothèse de Loewenstein, attribuant un rôle des jonctions gap dans le contrôle de la prolifération cellulaire, est devenue un dogme affirmant que « la GJIC est perdue durant la carcinogenèse ».

Dans ce contexte, de nombreuses études ont démontré que la restauration de la GJIC ainsi que la réexpression des connexines dans des cellules cancéreuses peut inhiber leur prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vivo* (Huang *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1999). En effet, il a été montré que la surexpression de la Cx43 associée à un rétablissement de la GJIC dans des cellules de carcinomes pulmonaires humains inhibe la tumorigénicité de ces cellules tumorales (Zhang *et al.*, 1998).

Cependant, cette théorie générale semble plus complexe et moins homogène qu'il n'y paraît. En effet, des exceptions à ce dogme ont été observées. Il a été montré par exemple une augmentation de la GJIC ainsi que de l'expression des connexines 26 et 43 dans un carcinome de la vessie chez le rat (Asamoto *et al.*, 1994). Une étude a également montré que des lignées cellulaires œsophagiennes tumorigéniques présentaient des niveaux d'expression de Cx43 et de couplage jonctionnel comparables à ceux de cellules œsophagiennes saines (Garber *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a aussi été observé un autre phénomène qui consiste en l'expression de nouvelles connexines normalement absentes dans le tissu non pathologique. Ainsi, la Cx43, non exprimée dans le foie sain, apparaît dans certains cancers hépatiques avec une localisation cytoplasmique (Oyamada *et al.*, 1990). Ainsi, cette théorie générale observée dans de nombreux cancers semble toutefois dépendre, entre autres, du type de cancer considéré.

Ainsi, bien que les connexines soient considérées comme des suppresseurs de tumeur de classe II dans la plupart des cas, ce rôle suppresseur de tumeur semble complexe, car la réexpression de la communication jonctionnelle n'entraîne pas systématiquement la perte du phénotype cancéreux. En effet, suite à la transfection de différentes connexines dans des cellules HeLa déficientes en jonctions gap, il a été constaté que malgré un rétablissement de la GJIC induit par toutes les connexines testées, seule la Cx26 est capable d'inhiber la prolifération de ces cellules (Mesnil *et al.*, 1995). Ainsi, le rétablissement de la communication jonctionnelle n'est pas toujours suffisant pour normaliser la prolifération cellulaire, mais par contre, le type de connexine réexprimé apparaît déterminant. L'effet suppresseur de tumeur dépend donc du type de connexine réexprimé, et il semble que cet effet soit généralement obtenu lors de la réinduction de l'expression de la connexine d'origine (celle normalement présente dans le tissu avant cancérisation, ou dans la lignée cellulaire avant transformation) (Mesnil, 2004). Dans d'autres cas, la réexpression des connexines est capable de normaliser la prolifération cellulaire mais sans rétablissement de la GJIC. Il a notamment été montré que la surexpression des connexines 26 et 43 dans une lignée cancéreuse mammaire inhibe la croissance tumorale *in vivo* sans pour autant restaurer la GJIC, ces connexines ayant une localisation cytoplasmique (Qin *et al.*, 2002). Ainsi, cela suggère que les connexines peuvent réguler directement la croissance tumorale, indépendamment de la GJIC, en modulant probablement le profil d'expression génique des cellules cancéreuses. Cette hypothèse est supportée par la découverte d'une localisation non membranaire des connexines (cytoplasmique ou même nucléaire) leur donnant ainsi la possibilité d'interagir avec une variété de protéines intracellulaires. En plus de médier la communication intercellulaire, les connexines en tant que protéines peuvent ainsi réguler certaines fonctions cellulaires, comme la prolifération, en modulant des voies de signalisation et par conséquent l'expression de gènes.

De ce fait, de nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer les mécanismes moléculaires, GJIC dépendant ou non, impliqués dans le contrôle de l'expression génique par les connexines. Une étude par PCR array sur des astrocytes issus de souris Cx43^{-/-} a permis de détecter une altération de l'expression de plus de 250 gènes, incluant des gènes régulant l'apoptose, la prolifération cellulaire, ainsi que des facteurs de transcription (Iacobas *et al.*, 2003). De plus, plusieurs études ont démontré que les connexines modulent l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. La surexpression des connexines 43 et 32 dans, respectivement, des cellules de carcinomes pulmonaire et hépatique induit un prolongement de la phase G1 du cycle cellulaire lié à une augmentation de l'expression de p27 et une diminution de la cycline D1 (Koffler *et al.*, 2000). D'autres exemples du contrôle de

L'expression des gènes par les connexines avaient déjà été cités dans la sous partie III.5.3 (p40) du chapitre « Les jonctions communicantes » de l'Introduction Générale.

Ainsi, au vu des différents rôles des connexines, une question se pose : « les connexines sont-elles impliquées uniquement dans le contrôle de la croissance tumorale, comme le présumait W.R. Loewenstein, ou leur fonction est-elle différente selon la phase de la progression tumorale considérée ? ».

I.2. Jonctions gap et progression tumorale

Depuis quelques années, il apparaît que l'implication des connexines dans la cancérogenèse semble plus complexe que ce qui était présumé à l'origine, notamment durant la progression tumorale. Les connexines joueraient donc un rôle différent selon la phase du processus tumoral considérée.

Récemment, de nouvelles données suggèrent que les connexines seraient impliquées dans les processus invasifs et métastatiques. Les connexines semblent intervenir lors des processus de migration et d'invasion cellulaire, lors de l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales, ainsi que lors de la dissémination des métastases. Le rôle potentiel des connexines dans ces processus tardifs est illustré par les quelques exemples suivants.

L'analyse de l'expression de la Cx43 dans des tumeurs gastriques a révélé une perte d'expression de cette connexine dans les tumeurs primaires suivie d'une réexpression dans les cellules ayant métastasé dans les ganglions lymphatiques (Tang *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude a montré récemment que la surexpression de la Cx43 dans des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP, associée à un rétablissement de la GJIC, entraîne une augmentation de la capacité d'invasion et d'adhérence de ces cellules *in vitro* ainsi que l'incidence des métastases ostéolytiques *in vivo* (Lamiche *et al.*, 2012). De même, la capacité d'invasion des cellules de gliomes C6 est également augmentée suite à la surexpression de la Cx43 et est liée à une augmentation de la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 participant à la dégradation de la matrice extracellulaire (Zhang *et al.*, 2003b). L'augmentation des capacités invasives de ces cellules serait associée à l'établissement d'une communication jonctionnelle avec les astrocytes (Oliveira *et al.*, 2005).

La surexpression de la Cx43 dans une lignée cancéreuse mammaire induit une augmentation de l'adhérence de ces cellules sur l'endothélium pulmonaire, favorisant ainsi le phénomène de diapédèse et la dissémination métastatique (Elzarrad *et al.*, 2008). Cette

interaction directe entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales via les connexines a également été mise en évidence sur des cellules de mélanomes et de gliomes (Zhang *et al.*, 2003a; Saito-Katsuragi *et al.*, 2007).

A l'inverse, des études ont démontré que les connexines ralentissent le processus métastatique. En effet, il a été montré que la surexpression de la Cx43 dans des lignées tumorales pulmonaires diminue leur capacité invasive associée à une diminution d'expression de la MMP-2 (Zhao *et al.*, 2011). De plus, la Cx26 diminue la migration, l'invasion et l'adhérence des cellules tumorales mammaires (Momiyama *et al.*, 2003), et la Cx43 inhibe le développement de métastases pulmonaires (Plante *et al.*, 2011).

Ainsi, si elles peuvent être considérées comme des suppresseurs de tumeurs durant la phase initiale du processus tumoral, correspondant à la croissance de la tumeur primaire, leur rôle dans les phases tardives (invasion et dissémination métastatique), semblerait plutôt être oncogénique. Cependant, le rôle des connexines durant les phases tardives reste controversé et de futures études sont nécessaires afin d'éclaircir la réelle implication des connexines dans la progression tumorale.

1.3. Implication des connexines dans les tumeurs osseuses primitives

Si de nombreux travaux ont montré une implication des connexines dans la cancérogenèse, très peu de données existent sur le rôle des connexines dans l'apparition et le développement des tumeurs osseuses primitives comme les ostéosarcomes ou les sarcomes d'Ewing.

Zhang et ses collègues ont montré que la surexpression de la Cx43 dans des cellules d'ostéosarcome humain U2OS inhibe la croissance tumorale *in vivo* ainsi que la prolifération cellulaire *in vitro* (Zhang *et al.*, 2001). Cette inhibition de la prolifération cellulaire est associée à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire de ces cellules, lié à une augmentation de l'expression de p27, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire. Cette augmentation de p27 est liée au fait que la Cx43, indépendamment de la GJIC, stimule la dégradation de la protéine Skp2, elle-même impliquée dans l'ubiquitination de p27. La forte expression de p27 inhibe l'activité enzymatique des Cdk2 et Cdk4 (cyclin-dépendent kinases), qui à leur tour, vont entraîner une accumulation de la forme hypophosphorylée de la protéine Rb (rétinoblastome), induisant un arrêt en phase G1 (Zhang *et al.*, 2001, 2003c, 2003d).

De plus, une étude réalisée sur des ostéosarcomes de chien a montré un niveau d'expression similaire de la Cx43 entre les tissus sains et néoplasiques. Cependant, alors que

la Cx43 est localisée uniquement au niveau membranaire dans le tissu sain, elle apparaît à la fois membranaire et cytoplasmique dans le tissu néoplasique (Sanchez *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'inhibition de la croissance tumorale d'ostéosarcomes humain et de rat induite par deux agents de chimiothérapie (l'inhibiteur de protéase de Bowman-Birk et le Coleusin Factor) a été en partie attribuée à leur capacité à augmenter l'expression de la Cx43 ainsi que la GJIC dans ces cellules tumorales (Geng *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les sarcomes d'Ewing, seule une étude réalisée sur des biopsies humaines s'est intéressée à l'expression de la Cx43 dans ces tumeurs, qui apparaît essentiellement cytoplasmique. De plus, cette étude a essayé de déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression de la Cx43 et les caractéristiques clinico-pathologiques des tumeurs, notamment vis à vis du potentiel métastatique. Leurs résultats montrent qu'un niveau élevé d'expression de la Cx43 est corrélé à des taux de survie plus faibles des patients, suggérant un rôle de la Cx43 potentiellement oncogénique dans cette tumeur. Par contre, aucune corrélation entre le niveau d'expression de la Cx43 et le potentiel métastatique n'a pu être mise en évidence. Cette étude a également suggéré un potentiel rôle de la Cx43 en tant que biomarqueur pronostique des sarcomes d'Ewing, cependant, ces résultats devront être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillon (Bui *et al.*, 2011).

I.4. Objectifs de l'étude

La Cx43, connexine majoritaire du tissu osseux, joue un rôle crucial dans le développement osseux, et toute altération de son expression ainsi que de la GJIC entraîne des malformations osseuses. De plus, l'implication des connexines et de la GJIC dans le processus tumoral a été établie par de nombreux travaux. Toutefois, alors que l'expression des connexines durant le processus de cancérogenèse a été étudiée dans de nombreux types de tumeur incluant les tumeurs pulmonaires, mammaires, gastriques, hépatiques, rénales, cérébrales..., très peu de données existent concernant leur expression dans les tumeurs osseuses primitives.

Ainsi, au vu du rôle essentiel que joue la Cx43 dans la physiologie osseuse, nous nous sommes donc intéressés à son implication dans des conditions pathologiques, notamment le développement des sarcomes d'Ewing.

Dans ce contexte, les objectifs de mes travaux de thèse, présentés dans cette seconde partie, ont donc été d'étudier, dans un premier temps, le niveau d'expression de la Cx43 dans plusieurs lignées cellulaires humaines de sarcome d'Ewing, puis de déterminer le

rôle de cette connexine dans le développement de la tumeur primitive ainsi que sur les lésions osseuses associées.

II. ARTICLE 2

« La perte de l'expression de la connexine 43 dans les sarcomes d'Ewing favorise le développement de la tumeur primitive et de l'ostéolyse associée »

Talbot Julie, Brion Régis, Picarda Gaëlle, Amiaud Jérôme, Chesneau Julie, Stresing Verena, Tirode Franck, Heymann Dominique, Redini Françoise and Verrecchia Franck

Soumis à **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**

Le sarcome d'Ewing est une tumeur osseuse primitive caractérisée par une translocation chromosomique entre le gène EWS et un gène de la famille ETS (FLI1 dans 85% des cas), générant un facteur de transcription aberrant, EWS-FLI1. EWS-FLI1 est capable d'induire ou de réprimer l'expression de gènes oncogéniques. Les jonctions communicantes sont des structures membranaires constituées de canaux intercellulaires, permettant le transfert direct de molécules informatives entre cellules adjacentes. Diverses études ont montré que la tumorigenèse est généralement associée à une perte ou à une réduction de la communication jonctionnelle.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une perte de l'expression et de la production de la connexine 43 (Cx43, protéines constitutives des canaux intercellulaires) dans des lignées humaines de sarcome d'Ewing comparativement au niveau d'expression mesuré dans les cellules souches mésenchymateuses humaines issues de différents donneurs sains. De plus, l'extinction de l'expression de la protéine EWS-FLI1 à l'aide d'un shRNA inductible dans la lignée de sarcome d'Ewing A673 a entraîné une augmentation de l'expression et de la production de la Cx43 ainsi que de la communication jonctionnelle. *In vivo*, la surexpression de la Cx43 dans des cellules de sarcome d'Ewing A673 ou TC71 ralentit très significativement la croissance de la tumeur primitive augmentant ainsi la survie des souris traitées. Des expériences *in vitro* ont montré que la surexpression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing augmente la production de p27 associée à une diminution de la phosphorylation de la protéine Rb. Ces résultats expliquent l'arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire observé dans ces cellules. Par ailleurs, l'analyse de la microarchitecture osseuse, évaluée par micro-CT, a montré une augmentation du volume osseux induit par la surexpression de la Cx43. Des analyses histologiques ont démontré que la surexpression de la Cx43 dans des cellules

tumorales de sarcome d'Ewing inhibe l'activité des ostéoclastes et par conséquent la résorption osseuse.

Ainsi, notre étude a démontré que la perte de l'expression de la Cx43 dans les sarcomes d'Ewing joue un rôle crucial dans le développement de la tumeur primitive et de l'ostéolyse associée.

Loss of connexin43 expression in Ewing's sarcoma cells favors the development of the primary tumor and the associated bone osteolysis

Talbot Julie^{1,2,3,4}, Brion Régis^{1,2,3,4}, Picarda Gaëlle^{1,2,3,4}, Amiaud Jérôme^{1,2,3,4}, Chesneau Julie^{1,2,3,4}, Stresing Verena^{1,2,3,4}, Tirode Franck⁵, Heymann Dominique^{1,2,3,4}, Redini Françoise^{1,2,3,4} and Verrecchia Franck^{1,2,3,4}

¹LUNAM Université, France; ²INSERM, UMR 957, Nantes, France; ³Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France; ⁴CHU Hôtel Dieu, Nantes, France, ⁵Institut Curie, INSERM U830, Paris, France

Running title: Role of Connexin43 in Ewing's sarcoma

Financial support: INSERM; Région Pays de la Loire (R09010NN-REGIONPDL); Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2012)

Address correspondence to: Franck Verrecchia, INSERM U957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France, Phone: +33 240412842, Fax: +33 240412860, E-mail: franck.verrecchia@inserm.fr

Disclose any potential conflicts of interest: NO

Abstract

Ewing's sarcoma (ES) is a primary bone tumor characterized by a chromosomal translocation between the EWS gene and a member of the ETS gene family, mainly FLI1, which leads to an aberrant transcription factor EWS-FLI1 that promotes tumorigenicity. Gap junctions are intercellular channels composed of transmembrane proteins (connexin: Cx), that allow direct intercellular communication between adjacent cells. Numerous studies have shown that tumorigenesis may be associated with a loss of gap junctional intercellular communication (GJIC).

Loss of Cx43 expression was observed at the protein and mRNA levels in ES cell lines compared to those measured in human mesenchymal stem cells. A673 ES cells stably transfected with an shRNA targeting EWS-FLI1 showed an increase in Cx43 expression (at the mRNA, protein and transcriptional levels) and GJIC. In an osteolytic murine model of ES, the overexpression of Cx43 in ES cells dramatically reduced tumor growth, leading to a significant increase in animal survival. In vitro assays showed that Cx43 overexpression increases the p27 level with an associated marked decrease of Rb phosphorylation, consistent with the observed blockade of the cell cycle in G0/G1 phase. In addition, the bone microarchitectural parameters, assessed by micro-CT analysis, showed an increased bone volume when Cx43 expression was enhanced. Histological analysis demonstrated that the overexpression of Cx43 in ES tumor cells inhibits osteoclast activity and therefore bone resorption.

Our study demonstrated that the loss of Cx43 expression in ES cells plays a crucial role in the development of the primary tumor and the associated bone osteolysis.

Keywords: connexin43, Ewing's sarcoma, EWS-FLI1, osteolysis, tumor growth

1. Introduction

Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent pediatric bone cancer after osteosarcoma. It is a rare, aggressive, poorly differentiated tumor of bone and soft tissue which occurs primarily in children, adolescents and young adults [1–3]. ES is characterized by a rapid proliferation of tumor cells with small round nuclei that causes extensive and rapidly progressive bone destruction [4]. ES is a classic example of a malignancy driven by a fusion oncogene, 85% of ES tumor specimens harboring the t(11;22)(q24;q12) chromosomal rearrangement [5]. The resultant fusion transcript EWS-FLI1 is formed by the N-terminal part of the EWS protein linking to the DNA-binding domain (ETS domain) of the FLI1 transcription factor [6]. FLI1 possesses carcinogenic properties of cell cycle induction, aberrant transcription and promotion of cell survival when associated with EWS [7]. Alternative rarer translocations are known such as, EWS/ERG occurs in approximately 10% of cases, EWS/ETV, EWS/EIAP and EWS/FEV each in <1% of cases. Although the cell origin of ES remains unknown, there is a growing body of evidence that suggests ES is derived from mesenchymal stem cells (hMSC). Indeed, strong arguments indicate that the fusion gene EWS/FLI1 may induce the transformation of hMSC into ES cells [8].

Connexins, the structural proteins of gap junctions, are a family of transmembrane proteins that oligomerize into hemichannels containing six connexin subunits [9]. Upon reaching the cell surface, two hemichannels pair to complete an intercellular gap junction channel, which directly links the cytoplasm of neighboring cells and mediate the exchange of low-molecular-mass molecules (<1000 Da), including cAMP, inositol trisphosphate, and Ca^{2+} [10]. The permeability of gap junctions is finely regulated at the transcriptional [11,12] and posttranslational level via cycles of connexin phosphorylation [13], intracellular Ca^{2+} or H^+ concentrations [14,15]. A critical role in the progression of a variety of tumors has been attributed to gap junction intercellular communication (GJIC) [16,17]. Reduced or loss of gap junctional activity through different mechanisms including reduced expression has been implicated in various human cancers [18]. The crucial role of altered GJIC in tumor progression was further demonstrated by the exogenous expression of connexins in gap junction-deficient cell lines, which was shown to restore functional communication and to delay tumor growth [19,20].

Despite many studies having demonstrated the importance of connexin43 (Cx43), the most

abundant connexin in bone cells, for bone development and turnover during the last decade [21], little is currently known about GJIC and Cx43 in primary bone tumors. In this report, we analyzed the specific role of Cx43-driven GJIC in ES tumor growth. Using a combination of in vitro and in vivo experimental approaches, we demonstrated: i) a lack of Cx43 gene expression in ES cells, ii) that the expression level of Cx43 is associated with that of EWS-FLI1, iii) that Cx43 inhibits ES tumor growth via modulation of cell proliferation, and iv) Cx43 reduces tumor cell-driven osteoclast activity.

2. Materials and Methods

2.1. Cell cultures

Human ES cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, Basel, Switzerland) or RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Perbio, Bezons, France). A673 ES cells stably transfected with an inducible shRNA against EWS-FLI1 were treated with doxycycline (1 µg/ml) to induce shRNA expression (A673-1c cells) [8]. Bone marrow, harvested by iliac crest aspiration from donors (age=46±12; range=36–67), were obtained from the "Etablissement Français du Sang" with informed consent and ethical approval from the Nantes University Hospital Ethics Committee. hMSCs were cultured in DMEM, 10% FBS, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (R&D systems, Lille, France). Adherent cells were characterized by flow cytometry (CD45⁻, CD34⁻, CD105⁺, CD73⁺ and CD90⁺, purity ≥ 99%) prior to further experiments.

All in vitro experiments were made with identical number of cells at the same density.

2.2. Western blot analysis

Cells were lysed in a lysis buffer (SDS 1%, Tris pH 7.4 10mM, Sodium orthovanadate 1 mM) and protein concentration was determined by BCA kit (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). Total protein extracts in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were immunoblotted with anti-Connexin43 (Sigma), anti-Flil1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GAPDH (Abcam, Paris, France), or anti-β-actin (Sigma) antibodies. Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, Illkirch, France). For quantification, luminescence was detected with a Charge Couple Device (CCD) camera and analyzed using the GeneTools program (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

2.3. Cell cycle analysis

Cells were incubated in serum free medium during 12h and then in medium supplemented with 10% serum. Cell cycle distribution was studied by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Villepinte, France) based on 2N and 4N DNA content (50 µg/mL propidium iodide) and analyzed by using DNA Cell Cycle Analysis Software (Phoenix FlowSystems, San Diego, CA, USA).

2.4. Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using NucleoSpin[®]RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany) and used for first strand cDNA synthesis using ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNase I treatment (25 units, 15 min) of total RNA was performed to eliminate genomic contamination. Real-time PCR was performed with a Chromo4 instrument (Biorad, Richmond, CA, USA) using SYBR Green Supermix reagents (Biorad). Primers sequences are provided in Supplementary Table 1.

2.5. Transient cell transfections, reporter assays and plasmid constructs

Transient cell transfections were performed with jetPEI[™] (Polyplus-transfection, Illkirch, France). The phRLMLP-*Renilla* luciferase expression vector was cotransfected in every experiment to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Charbonnières, France). The *Cx43* promoter/gene reporter construct -2400Cx43-lux has been described previously [22]. The expression vector of the *Cx43* gene was generated by PCR using the Cx43-EGFP plasmid [23] as template and cloned in pncDNA3.1 vector.

2.6. Parachute assay

GJIC was determined by parachute assay, as previously described [24,25]. This method utilizes fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis to study intercellular dye transfer. Briefly, cell cultures were divided into “acceptor” and “donor” cell groups. Adherent acceptor cells were loaded with Dil (Sigma), a nontransferable membrane dye for 1h, and confluent donor cells were dyed with calcein-acetoxymethylester (calcein-AM; Sigma) for 45 min. After loading, cells were washed in PBS to remove the excess dye. Then, the calcein-AM-dyed cells were trypsinized and parachuted on the Dil-dyed acceptor cell layer at a cell ratio of 1/10 and incubated for 2h at 37°C to allow dye transfer

via gap junctions. Dye coupling was analyzed using flow cytometry conducted with a FACS FC500 cytometer. For the analysis of results, gates were established on the day of each experiment using non-dyed cells, cells dyed with calcein-AM, and cells dyed with Dil. The quantification of dye transfer is explained in more detail in Supplementary Figure S1 Legend.

2.7. Ewing's sarcoma model.

Four-week-old female Rj:NMRI-nude mice (Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were maintained under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA Pays de la Loire n°06; CEEA-2010-23) and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane/air mixture (1.5%, 1 L/min) before receiving an intramuscular injection of $2 \cdot 10^6$ TC71 or A673 cells in close proximity to the tibia, leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. Tumors appeared at the injection site 8 days later. The tumor volume (V) was calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper, according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times (S)^2$, in which L and S are, respectively, the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Mice were sacrificed when the tumor volume reached 3000 mm^3 for ethical reasons.

2.8. Micro-CT analysis.

Analyses of bone microarchitecture were performed using the high-resolution X-ray micro-CT system for small-animal imaging SkyScan-1072 (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium). Analyses were performed both on live and anesthetized animals [xylazine (Rompun®; Bayer)-ketamine (Imalgène®1000; Merial) 8% and 13%, respectively, in PBS; $100 \mu\text{L}/10 \text{ g}$], at different tumor volumes (500 and 1000 mm^3), and at necropsy (3000 mm^3). All tibiae/fibulae were scanned using the same parameters (pixel size $18 \mu\text{m}$, 50kV, 0.5-mm Al filter and 0.8 degree of rotation step). Three-dimensional reconstructions and analysis of bone parameters were performed using CTvol and CTan software (Skyscan).

2.9. Bone histology.

After sacrifice, the tibiae were conserved and fixed in 10% buffered formaldehyde, decalcified (4% EDTA, 0.2% paraformaldehyde, pH 7.4), and embedded in paraffin. $3\text{-}\mu\text{m}$ sections of tumor-bearing

tibiae were cut and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) to analyze osteoclast activity. Quantification of osteoclastic areas was done using ImageJ (National Institutes of Health, USA).

2.10. Immunohistochemistry.

3- μ m sections of tumor tissues (embedded in paraffin) were cut and stained for Ki-67, active caspase 3 and osterix, respectively, with monoclonal mouse anti-human Ki-67 (Dako, Trappes, France), rabbit polyclonal anti-active Caspase 3 (Abcam) or rabbit polyclonal anti-osterix (Abcam) antibodies. Immunodetection was performed using DAB Substrate-Chromogen (Dako) and counterstained with hematoxylin.

2.11. Statistical analysis.

All analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). In vitro experiments results were analyzed with the unpaired t-test and are given as mean \pm SD. For in vivo experiments, results from groups overexpressing Cx43 were compared with control groups (Parental and Mock) using the ANOVA test followed by Dunnett's multiple comparison test and are given as mean \pm SEM. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Loss of Cx43 gene expression in ES cells

To evaluate the Cx43 production in ES cells, Western-Blot analysis was performed to compare Cx43 protein levels in seven ES cell lines with those measured in hMSC from five healthy donors. As shown in Figure 1A, Cx43 protein levels were dramatically reduced in all tested ES cell lines (by approximately 80%) with regard to the mean level measured in hMSC. To determine whether this decrease occurred via modulation of the corresponding gene, Cx43 mRNA steady-state levels were measured by qRT-PCR. As shown in Figure 1B, the Cx43 mRNA levels are dramatically reduced in ES cells.

Given the crucial role played by EWS-FLI1 in ES tumor growth, we hypothesized that EWS-FLI1 may regulate Cx43 gene expression. To test this theory, A673 ES cells stably transfected with an inducible shRNA targeting EWS-FLI1 were treated with doxycycline to induce shRNA expression (A673-1c cells) [8]. As expected, the presence of doxycycline induced a decrease in EWS-FLI1 protein levels in a time-dependent manner (Fig. 2A). Interestingly, when EWS-FLI1 production was decreased, this caused a subsequent increase in Cx43 protein levels (Fig. 2A). A673-1c cells exhibited a 7-fold higher production of Cx43 8 days after addition of doxycycline. To determine whether this increase in Cx43 protein production occurred via modulation of the corresponding gene, Cx43 mRNA steady-state levels were measured by qRT-PCR. As shown in Figure 2B, Cx43 expression was induced under doxycycline treatment. At day 2, 4 and 8 after addition of doxycycline, A673-1c cells respectively exhibited 2-, 6- and 10-fold higher Cx43 mRNA steady state levels. To determine whether this effect of EWS-FLI1 on Cx43 gene expression takes place at the transcriptional level, transient cell transfections were performed with the Cx43 promoter/gene reporter construct-2400Cx43-lux. Doxycycline stimulation induced a 38-fold transactivation of the Cx43 promoter (Fig. 2C). To determine whether the increase of Cx43 gene expression in A673-1c under doxycycline stimulation is associated with gap junctional intercellular communication changes, GJIC was quantified by FACS analysis using the parachute assay. Doxycycline-induced Cx43 protein expression (Fig. 2A) significantly enhanced GJIC 8 days after addition of doxycycline (Fig. 2D).

Together, these results demonstrated that EWS-FLI1 represses Cx43 gene expression and also the cell-cell communication between ES cells.

3.2. Overexpression of Cx43 in TC71 and A673 ES cell lines dramatically inhibits in vivo tumor growth

Since a reduced GJIC activity has been implicated in the development of various human cancers, we hypothesized that the decrease of Cx43 gene expression observed in ES cells plays a role in ES tumor growth. Since we observed a loss of Cx43 gene expression in ES cells, a gain of function approach instead of a loss of function was used to test this hypothesis.

We stably transfected two human ES cell lines (TC71 and A673) with Cx43 cDNA to examine this issue. Clones were generated, selected and analyzed in comparison with parental cell lines (P) and mock-transfected cells (M) for their Cx43 expression. To avoid the phenotypic artifacts that may result from the selection and propagation of individual clones derived from single transfected cells, a cell pool was generated. This pool, composed of cells from fifteen positive clones, was analyzed in comparison with parental cells and a pool of mock-transfected cells for their Cx43 mRNA and protein levels. Both Cx43-TC71 and Cx43-A673 cells expressed significantly higher levels of Cx43 mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) compared to parental and mock-transfected cells. In addition, we examined whether increased Cx43 expression in TC71 and A673 cells may affect their GJIC. In contrast to the low transfer-ratio measured in parental and mock-transfected cells, a significant increase in GJIC was observed in Cx43 overexpressing cells indicating that these cells were coupled forming interconnecting networks where they were able to communicate (Fig. 3C).

Next, a preclinical experimental model of ES induced by paratibial injection of either TC71 (Fig. 4) or A673 (Supplementary Fig. S2) ES cells was developed. Cx43 overexpression dramatically inhibited tumor growth in both TC71 and A673 injected mice (Fig. 4 and Supplementary Fig. S2). While 100% of mice injected with parental TC71 and 87.5% of mice receiving mock-transfected cells developed tumor volumes $\geq 1000 \text{ mm}^3$ 17 days after injection, only 25% of mice injected with Cx43-transfected cells developed a tumor volume $\geq 1000 \text{ mm}^3$ (Fig. 4A). The mean tumor sizes at day 17 were respectively $2384 \pm 293 \text{ mm}^3$ and $2219 \pm 331 \text{ mm}^3$ in mice injected with parental and mock-transfected TC71 cells, whereas the mean tumor size in mice injected with the Cx43-transfected cells was $995 \pm 233 \text{ mm}^3$ (mean \pm SEM, $p < 0.001$; Fig. 4B). Similar results were obtained in the A673 experimental model (Supplementary Fig. S2). The reduced mean tumor sizes indicated that Cx43 overexpression slowed tumor growth in both, the TC71 and A673 model by 55% ($p < 0.05$) compared with control mice. Consequently, Cx43 overexpression increased animal survival by 70% ($p < 0.05$) and 50% ($p < 0.01$),

respectively, in the TC71 (Fig. 4C) and A673 (Supplementary Fig. S2C) model compared with control animals.

Tumors excised from sacrificed animals were then assessed for proliferation and apoptosis by immunohistochemical staining for Ki-67 and caspase-3, respectively. Staining for Ki-67 positive cells revealed that Cx43 overexpression resulted in a significant inhibition of cell proliferation in both ES experimental models (Fig. 5A), which is consistent with the smaller size of the Cx43 tumors. The mean number of Ki-67 positive cells counted by microscopy (x20) in six random fields was 31 ± 0.8 and 33 ± 1.8 , respectively, in tumors from mice injected with parental and mock-transfected TC71 cells, whereas this number was 20 ± 1.4 in Cx43-expressing tumors ($***p < 0.01$; Fig. 5A). Contrarily, staining for caspase-3 positive cells revealed no significant differences between the groups (data not shown) suggesting that the effect of Cx43 tumor growth is mainly due to inhibition of tumor cell proliferation rather than induction of tumor cell death.

To understand the mechanisms underlying the effect of Cx43 on cell proliferation, we carried out several in vitro experiments. First, a cell growth curve assay demonstrated that Cx43-transfected TC71 or A673 cells display a reduced proliferation rate (50% lower at day 7) compared to parental or mock-transfected cells ($***p < 0.01$; Fig. 5B). Next, we performed flow cytometry of parental, mock- and Cx43-transfected TC71 and A673 cells to assess DNA content after 24h of culture growth. Cx43 overexpression resulted in cell cycle arrest in G0/G1 phase (Fig. 5C), as demonstrated by an 50% increase in the number of cells in G0/G1 phase in Cx43-transfected cells compared with parental or mock-transfected cells in TC71 ES cells. Western blot analysis was then used to examine which DNA check points in cells were involved in mediating cell cycle arrest. As shown in Figure 5D, Cx43 overexpression increased p27 levels with an associated marked decrease of Rb phosphorylation, consistent with the observed blockade of the cell cycle in G0/G1 phase. Similar results were obtained with A673 model (Fig. 5D).

Together these results demonstrated that Cx43 regulates Ewing's tumor growth via modulation of cell proliferation.

3.3. Overexpression of Cx43 in TC71 and A673 ES cells inhibits bone resorption

Since ES altered bone remodeling plays a central role in the development and progression of ES bone tumors, we evaluated the ability of Cx43 to alter tumor-induced bone resorption. To this aim, the

microarchitecture of bone was examined after animal sacrifice using a high-resolution X-ray micro-CT system. Analysis of the tibiae/fibulae suggests that Cx43 overexpression decreased tumor-induced bone osteolysis in A673 ES model and favors the bone formation in TC71 ES model. To confirm this observation, the bone volumes were measured after three-dimensional reconstruction (Fig. 6A and B). The mean of bone volumes were $12.5 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ and $12.7 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ in mice injected with parental or mock-transfected TC71 cells, respectively, whereas the mean bone volume in mice carrying Cx43-TC71 tumors was $15 \pm 0.3 \text{ mm}^3$ (mean \pm SEM;*** $p < 0.01$; Fig. 6A). Similarly, Cx43 enhanced bone volume in mice injected with A673 cells (** $p < 0.05$; Fig. 6B). To fully evaluate the ability of Cx43 to increase bone volume, these measures were compared for equivalent tumor volumes at, respectively, 500, 1000 and 3000 mm^3 . At a tumor volume of 3000 mm^3 , the mean bone volume was $13.3 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ in mice injected with mock-transfected TC71 cells, compared to $16.4 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ in mice injected with Cx43-transfected cells (mean \pm SEM;*** $p < 0.01$; Fig. 6C). Furthermore, while bone volumes of control mice remained constant (around 13 mm^3), the bone volumes of mice injected with Cx43-transfected TC71 cells gradually increased with tumor size (from $14.4 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ to $16.4 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ when tumor volumes increased from 500 to 3000 mm^3 , Fig. 6C). Similar results were obtained with mice injected with A673 ES cells (Supplementary Fig. S3).

To understand the mechanisms underlying the effect of Cx43 on tumor-induced bone formation, the activity of osteoclasts and osteoblasts, two cell lineages implicated in bone remodeling, was assessed. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining in sections of tumor-bearing tibiae showed that Cx43-TC71 tumor cells reduced the number and size of TRAP+ multinucleated cells, both in growth plate (Fig. 7A) and at the interface bone-tumor (Fig. 7B), relative to the control conditions. By contrast, osterix immunostaining of the same samples showed no significant difference between mice injected with Cx43-transfected cells and animals receiving parental or mock-transfected cells (Fig. 7C). Similar results were obtained in the A673 model (data not shown).

Taken together, our results demonstrated that Cx43-induced bone formation may be due to inhibition of osteoclast activity rather than to a stimulation of osteoblast activity.

4. Discussion

Observations indicating a role of connexin in tumorigenesis are supported by many in vitro analyses demonstrating the down-regulation or loss of connexin expression in a wide range of neoplastic cells and primary tumors [26–28]. Here, we demonstrated a loss of Cx43 gene expression in ES cell lines. Early works using the NIH3T3 cell model have demonstrated that EWS-FLI1 acts as a transcriptional activator that allows oncogenic transformation [29,30]. Current opinion holds that EWS-FLI1 functions as an aberrant transcription factor supported by works which demonstrated that EWS-FLI1 localizes to the nucleus, binds DNA in a site-specific manner and possesses a powerful transcriptional activator that is more potent than the native FLI1 [7]. Gene expression studies have further demonstrated that EWS-FLI1 is able to enhance the expression of many genes implicated in transformation and/or tumor progression, including MYC [31], ID2 [32], CCND1 [33] and PDGFC [34]. Other studies have revealed that EWS-FLI1 is able to decrease the expression of many genes including those encoding p21 [35], p57kip [36], TGF β RII [37] and IGFBP3 [38]. Among these, only the TGF β RII and IGFBP3 genes, which are down-regulated by EWS-FLI1, have been identified as direct EWS-FLI1 targets [39]. Here, using a EWS-FLI1 knock-down approach, we demonstrated that EWS-FLI1 affects the Cx43 gene expression, suggesting that Cx43 is a EWS-FLI1 target gene. However, we cannot exclude that Cx43 induction in response to EWS-FLI1 silencing is a consequence of modified cell differentiation for example. The exact mechanisms underlying the down-regulation of Cx43 gene by EWS-FLI1 remain to be elucidated.

Through a molecular gain-of-function approach, we demonstrated that Cx43 overexpression inhibits in vivo ES tumor growth, providing the first experimental evidence indicating that the decrease of Cx43 gene expression is one mechanism through which ES cells can acquire high tumor growth potential. Since the main function of connexins is the formation of intercellular channels, the mechanisms by which connexins modulate cell proliferation and thus tumor growth were firstly proposed to depend on the ability of these channels to promote exchange of molecules that regulate the cell cycle [40]. Over the past 40 years, numerous studies have demonstrated a loss or at least a decrease of GJIC between cancer cells or between cancer cells and their surrounding normal cells, supporting the link between gap junction defects and tumor growth [17]. In agreement with this dogma, numerous studies reported that many tumor promoters were indeed inhibitors of GJIC [41] supporting

the idea that the inhibition of GJIC during the tumor promoting stage may favor the clonal expansion of initiated cells [17,42]. It was thus proposed that the recovery of GJIC between cancer cells could inhibit their proliferation and by consequence in vivo tumor growth. In this context, over-expression of connexins in different tumor cells was shown to restore GJIC and therefore inhibit cell proliferation [17,18,26]. Although we showed that Cx43 overexpression in ES cells restores GJIC, we cannot exclude that the effect of Cx43 overexpression on cell proliferation and in vivo tumor growth was not associated with the restoration of GJIC. Indeed, numerous studies have provided evidence for a dissociation of GJIC and the ability of connexins to inhibit cell proliferation and tumor growth [18]. Molecular mechanisms of connexin-induced tumor suppression thus appear not so simple as expected by initial works made by Loewenstein and colleagues [17,43]. Mechanistic studies demonstrated that Cx43 overexpression may inhibit cell proliferation via the inhibition of the expression of S phase kinase associated protein 2 (skp2), the protein that promotes the ubiquitination of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip [40]. With regard to primary bone tumors, a down-regulation of cyclin D1 associated with a blockade of the cell cycle in G0/G1 phase was observed in osteosarcoma after Cx43 overexpression [44]. Supporting this observation, we demonstrated that Cx43 overexpression in ES cells increases p27 levels with an associated marked decrease of Rb phosphorylation, consistent with the observed blockade of the cell cycle in G0/G1 phase.

The presence of a "vicious cycle" established between tumor proliferation and paratumor osteolysis plays a crucial role in the development of primary bone tumors [45]. Cancer cells produce soluble factors that activate directly or indirectly *via* osteoblasts, osteoclast differentiation and maturation [46,47]. In turn, during bone degradation, osteoclasts release tumor supportive growth factors stocked in the mineralized bone matrix [48]. Studies about the cellular mechanisms underlying the rapid bone resorption in ES indicate that ES cells activate osteoclast activity [4]. According with these findings, we demonstrated that the increase in bone volume observed after Cx43 overexpression in ES cells is due in large part to inhibition of osteoclast activity rather than to stimulation of osteoblast activity. The decrease of TRAP activity at the level of the growth plate, that is, not in direct contact with the tumor, suggests that the overexpression of Cx43 affects the ability of the tumor cells to produce a soluble factor able to regulate osteoclast activity, such as RANKL or M-CSF. This hypothesis is supported by previous reports demonstrating that Ewing's sarcoma cells support osteoclast formation by a RANKL- and M-CSF-dependent mechanism [4].

In conclusion, this report provides new insights regarding the role of the tumor suppressor gene Cx43 in the first stage of ES development, specifically during the primary bone tumor growth. We specifically demonstrated: 1) that Cx43 gene expression affects tumor growth by a blockade of the cell cycle in G0/G1 phase consistent with an increase of p27 level, and 2) that Cx43 gene expression plays a crucial role in the "vicious cycle" established between tumor proliferation and paratumor osteolysis by its ability to decrease osteoclast activity. The role of Cx43 in the more late stage of ES development like metastatic dissemination remains to be elucidated. Indeed, the role of connexins in invasion and metastasis seems to be even more complex, and several reports suggest that connexins might facilitate invasion, intravasation, extravasation and metastasis [49].

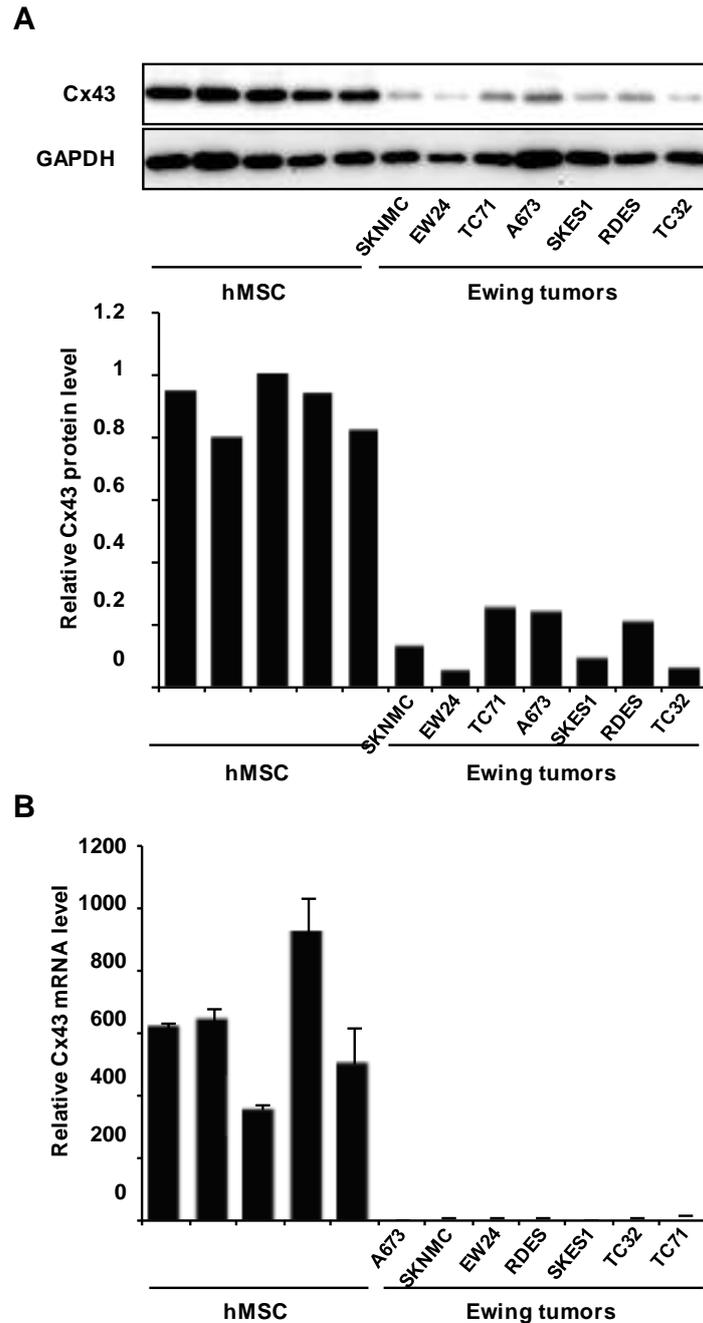


Figure 1: Loss of Cx43 gene expression in ES cell lines

(A) Cx43 production was detected by Western Blot analysis of whole cell lysates of hMSC from five healthy donors and seven ES cell lines (upper panel). Specificity of the modulation was confirmed with an anti-GAPDH antibody (middle panel). The ratio of Cx43 to GAPDH is plotted from the values of one representative experiment of three experiments (lower panel).

(B) Cx43 mRNA steady-state levels in hMSC and ES cell lines were determined by qRT-PCR. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed, each with duplicate samples.

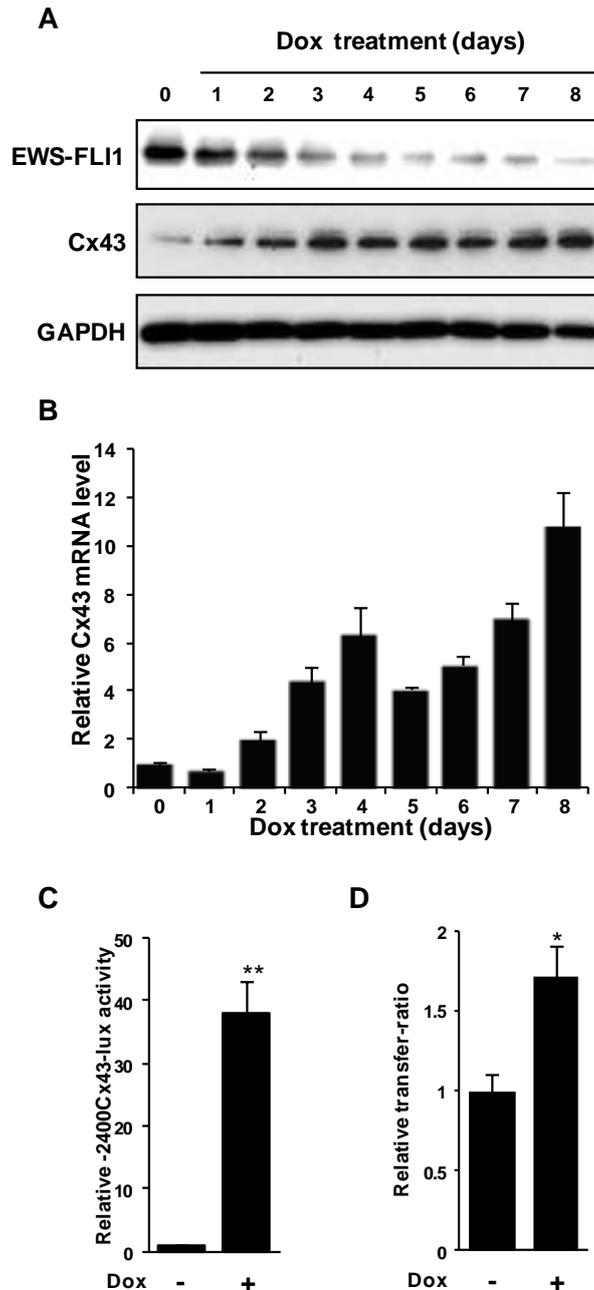


Figure 2: Correlation between EWS-FLI1 and Cx43 gene expression

(A) A673-1c ES cells were treated with doxycycline (1 μ g/ml) during 8 days. Cx43 and EWS-FLI1 production were detected by Western Blot analysis.

(B) A673-1c ES cells were treated with doxycycline (1 μ g/ml) during 8 days. Cx43 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments each performed in duplicate.

(C) A673-1c ES cells were treated with doxycycline (1 μ g/ml) during 3 days. After incubation, cell cultures were transfected with -2400Cx43-lux construct. 12h after transfection, doxycycline was added and incubation continued for another 48h. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments each performed in duplicate. (** $p < 0.05$)

(D) FACS analysis of calcein transfer in A673-1c cells treated with doxycycline (1 μ g/ml) during 8 days compared to A673-1c untreated control cells. Histograms indicate mean \pm SD of the relative transfer-ratio of calcein between cells measured in three independent experiments, carried out in duplicate. (* $p < 0.05$)

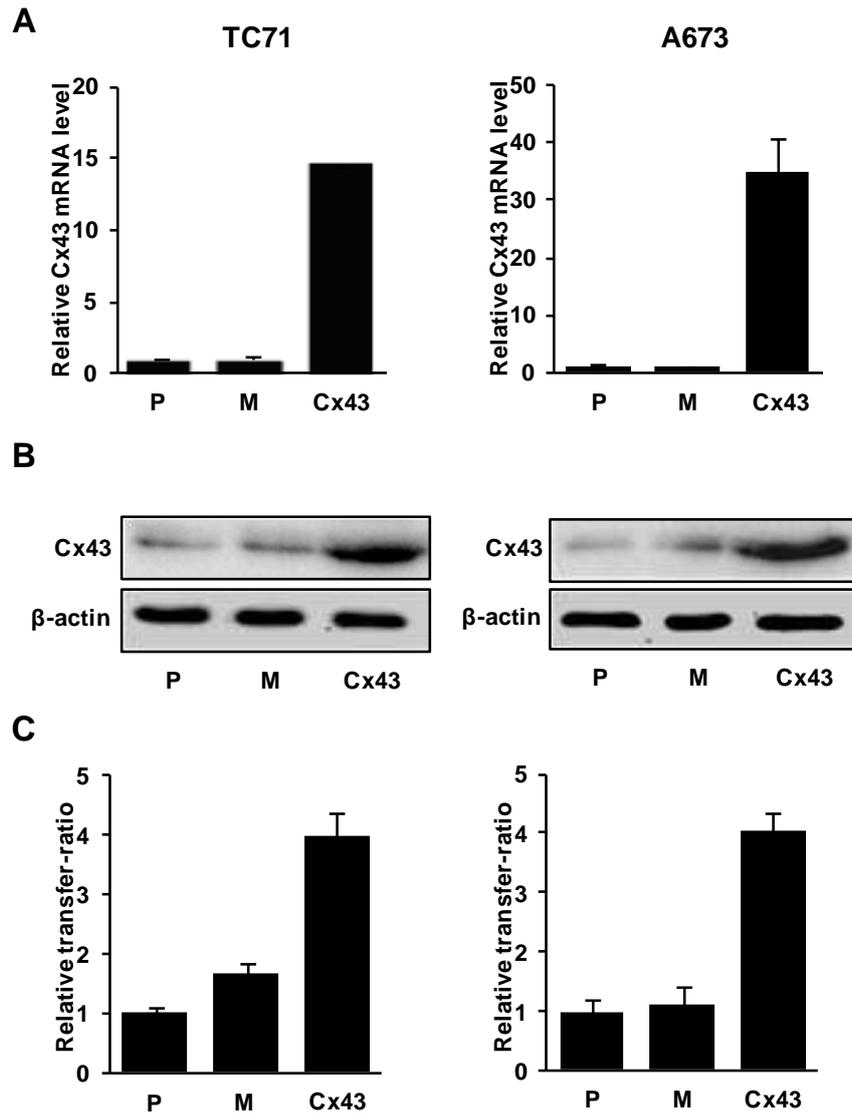


Figure 3: Overexpression of Cx43 in TC71 and A673 ES cell lines

(A) Cx43 mRNA steady-state levels in TC71 or A673 ES cells (parental (P), mock- (M), Cx43-transfected (Cx43)) were determined by quantitative RT-PCR.

(B) Cx43 production in TC71 and A673 ES cell were determined by Western Blot.

(C) FACS analysis of parachute studies in TC71 and A673 ES cells. Histograms indicate mean \pm SD of the relative transfer-ratio of calcein between cells measured in three independent experiments performed, each with duplicate samples.

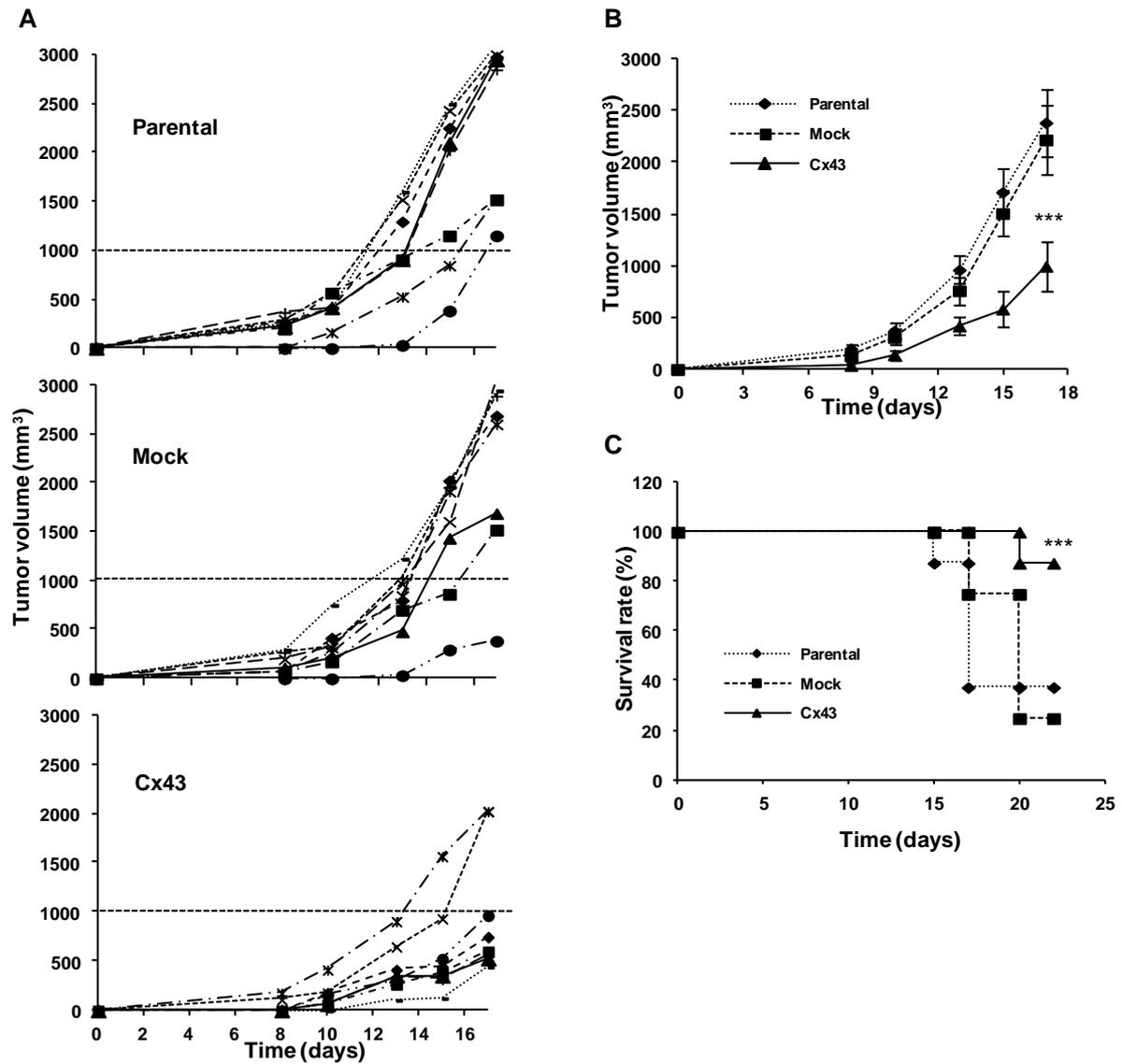


Figure 4: Overexpression of Cx43 inhibits tumor growth in ES and improves animal survival

Intramuscular paratibial injections of 2.10^6 TC71 tumor cells were performed in 3 groups of 8 nude mice: parental, mock or Cx43-overexpressing. The results are representative for 2 independent experiments. (Mean \pm SEM; *** $p < 0.05$)

(A) Evolution of tumor volumes of individual animal.

(B) Mean tumor volume of each group.

(C) Overall survival rates for the 3 groups over a 22-day period.

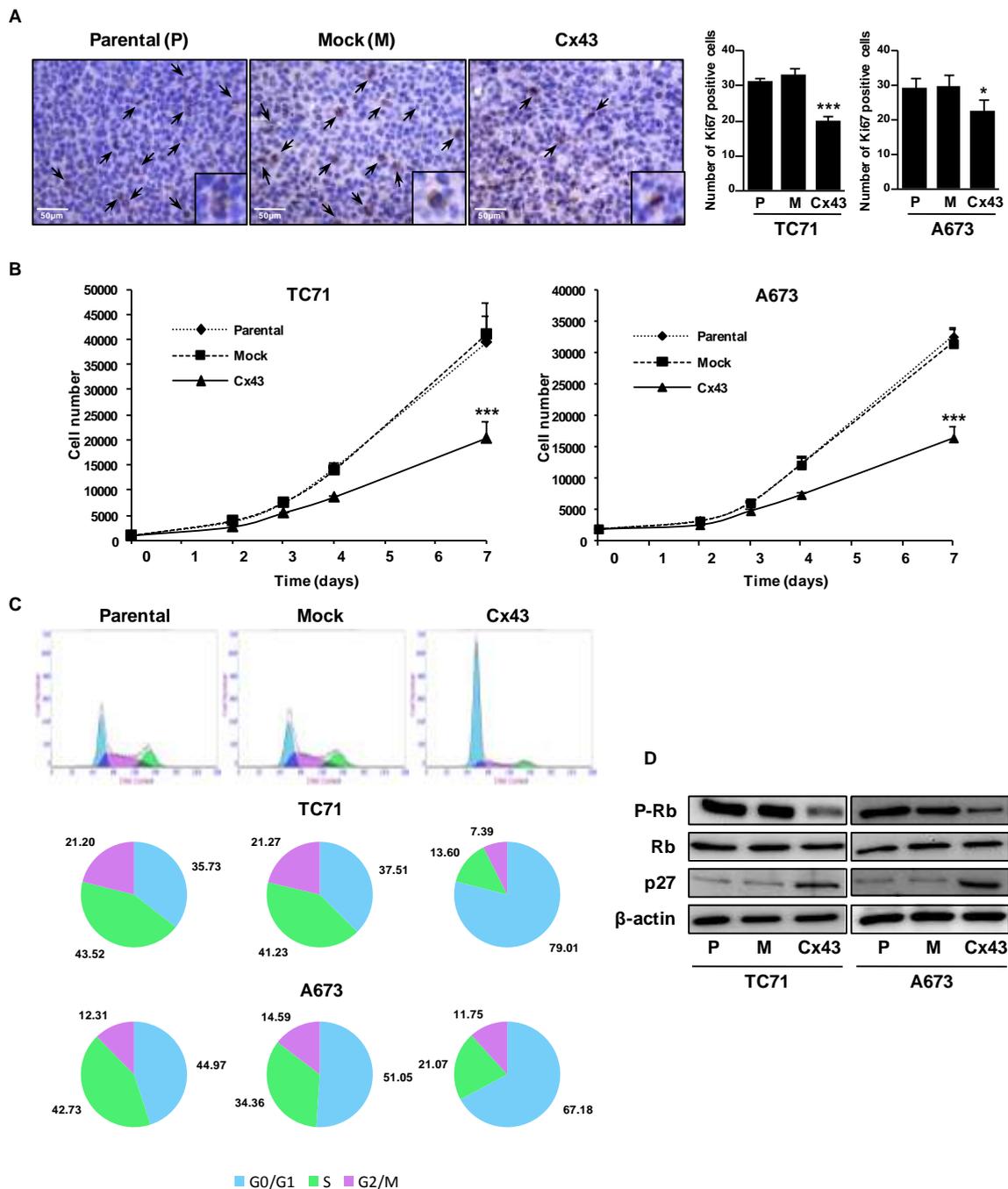


Figure 5: Overexpression of Cx43 inhibits tumor cell proliferation in ES by a cell cycle arrest in G0/G1 phase

(A) Tumor samples (volume = 3000 mm³) of each group were fixed, included, sectioned and immunostained with anti-human Ki-67. One representative photomicrograph per group in TC71 ES model was shown for immunostaining Ki-67 (magnification x40). Ki-67 positive tumor cells (in brown and indicated by arrows) were quantified by manual counting in six random fields microscopy (magnification x20) in 3 animals per group of each ES experimental model. Histograms represent the mean number of Ki-67 positive cells counted by field. (Mean \pm SEM; * p <0.05, *** p <0.01)

(B) Proliferation assays were performed by cell counting with Trypan Blue to compare the cell proliferation rate between the group overexpressing Cx43 and control groups (parental and mock). (Mean \pm SD; *** p <0.01)

(C) After 24h of culture growth, cell cycle distribution of parental, mock- and Cx43-transfected TC71 (upper and middle panels) and A673 (lower panel) cells was analyzed by propidium iodide staining and flow cytometry.

(D) The expression of cell cycle proteins was analyzed by Western blot.

Results shown (B, C and D) are representative of 3 independent experiments performed in duplicate.

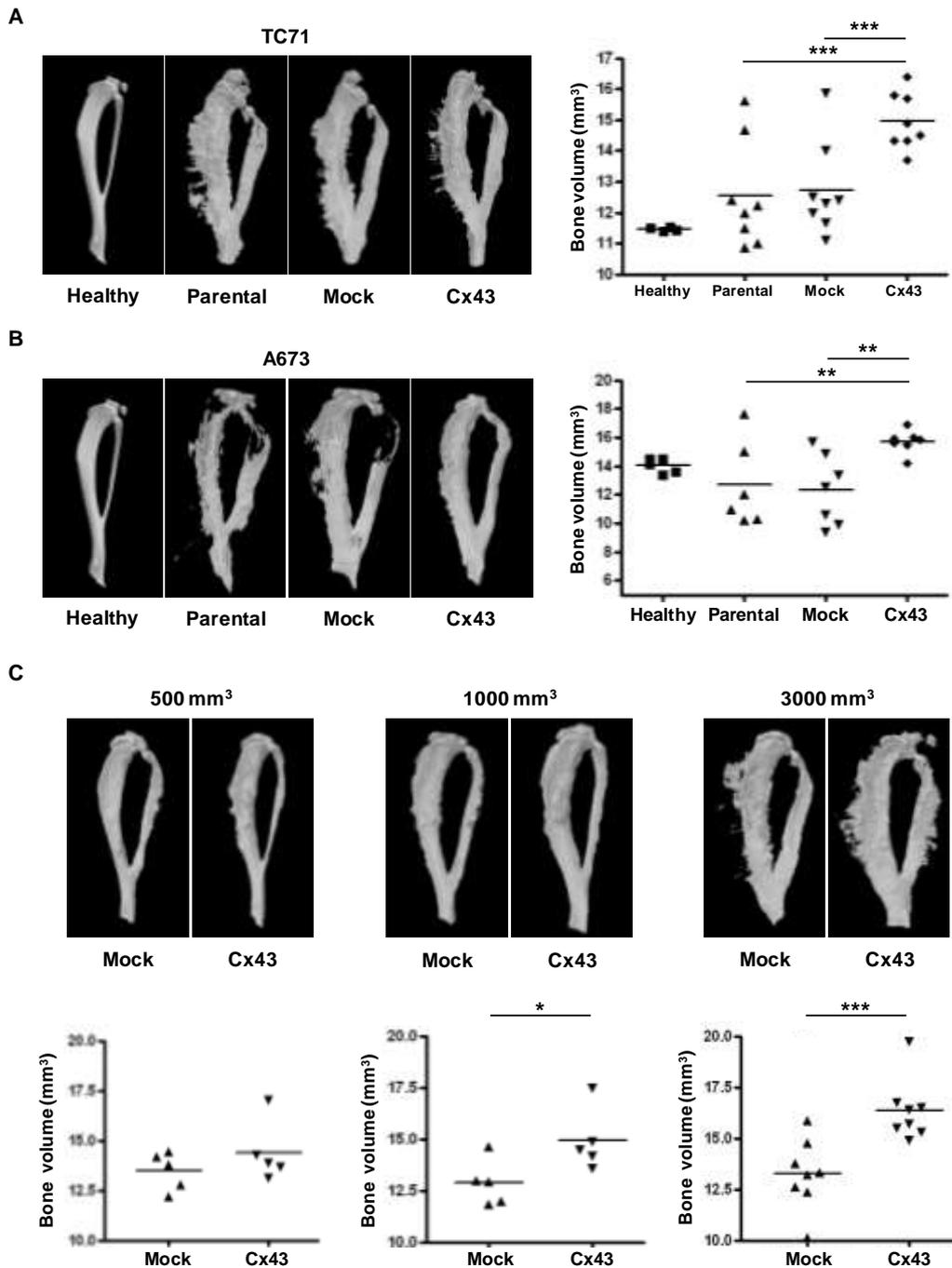


Figure 6: Overexpression of Cx43 in tumor cells favors bone formation

Intramuscular paratibial injections of TC71 or A673 tumor cells were performed in 3 groups of 8 nude mice: parental, mock or Cx43-overexpressing. These results are representative for 2 independent experiments in each ES experimental model.

(A) 3D reconstructions of one representative tibia/fibula (left panel) of each group of TC71 ES model (parental, mock and Cx43-overexpressing) were performed at day 17, and compared to healthy group corresponding to mice bearing no tumors. Tumor volumes in the control group are around 3000 mm³ whereas the tumor volume in the Cx43-overexpressing group is around 1500 mm³. Graphs (right panel) represent the bone volume of each animal per group at day 17. (**p<0.01)

(B) 3D reconstructions of one representative tibia/fibula (left panel) of each group in the A673 ES model were performed at day 21, as shown in Figure 6A. Graphs (right panel) represent the bone volume of each animal per group at day 21. (**p<0.05)

(C) 3D reconstructions of tibiae/fibulae (top panel) and bone volume (bottom panel) of animals in the Cx43-overexpressing group compared to mock group in the TC71 model, at the same tumor volumes: 500 mm³ (left panel), 1000 mm³ (middle panel) and 3000 mm³ (right panel). (Mean; *p<0.05, ***p<0.01)

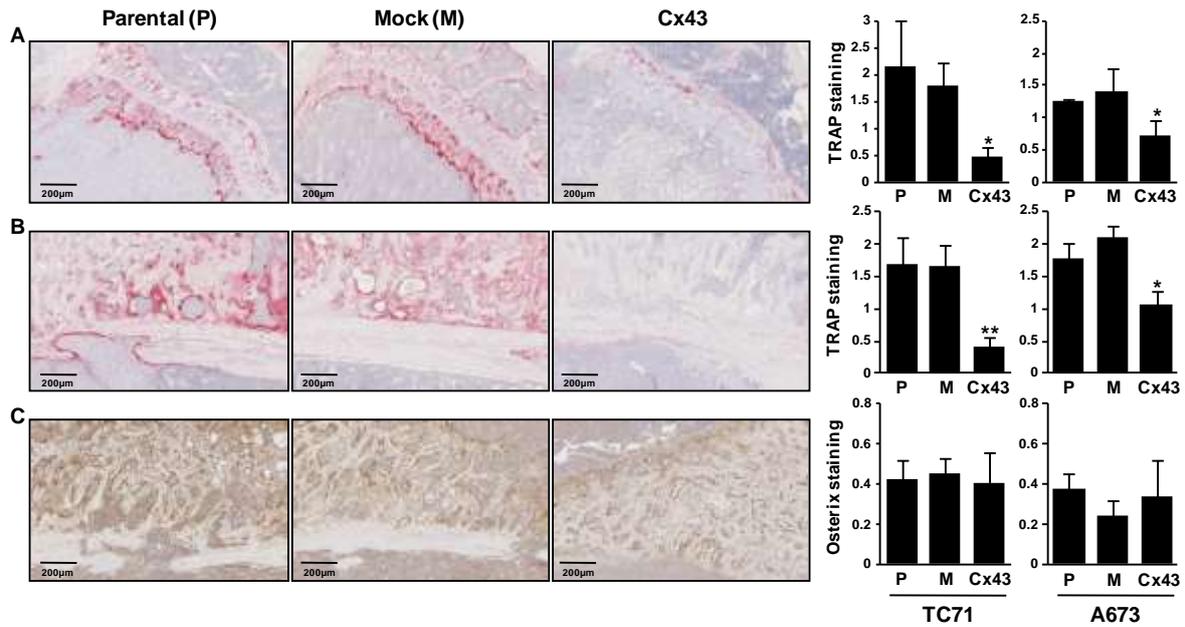


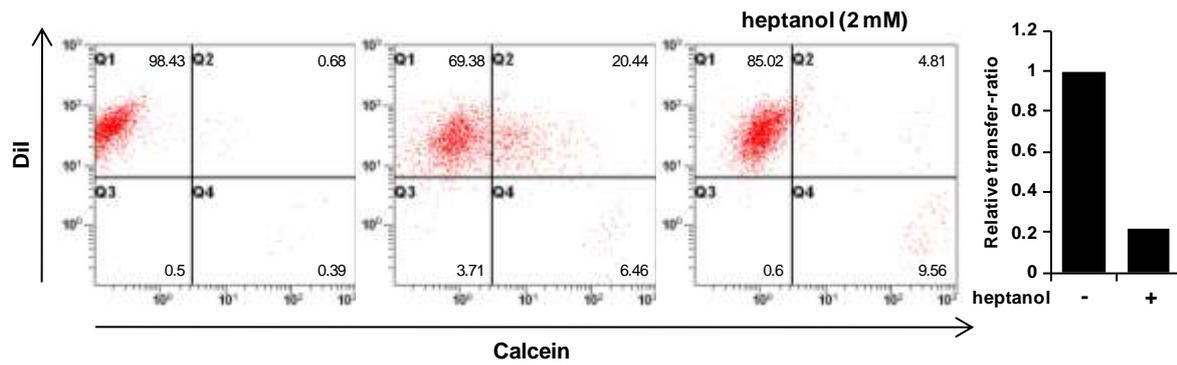
Figure 7: Overexpression of Cx43 inhibits osteolysis associated with tumor growth of ES

Tumor samples (volume = 3000 mm³) of each group were fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with TRAP or osterix. One representative photomicrograph per group for TC71 ES mice was shown for TRAP and osterix staining (magnification x10). For TRAP staining, positives osteoclasts were quantified using ImageJ software. Results are expressed as the percentage of osteoclast surface. Histograms represent the mean of positive staining \pm SEM of 2 independent experiments (n=8 per group) in each ES experimental model. (*p<0.05, **p<0.01)

(A) TRAP staining was performed to identify osteoclast activity at the level of the growth plate.

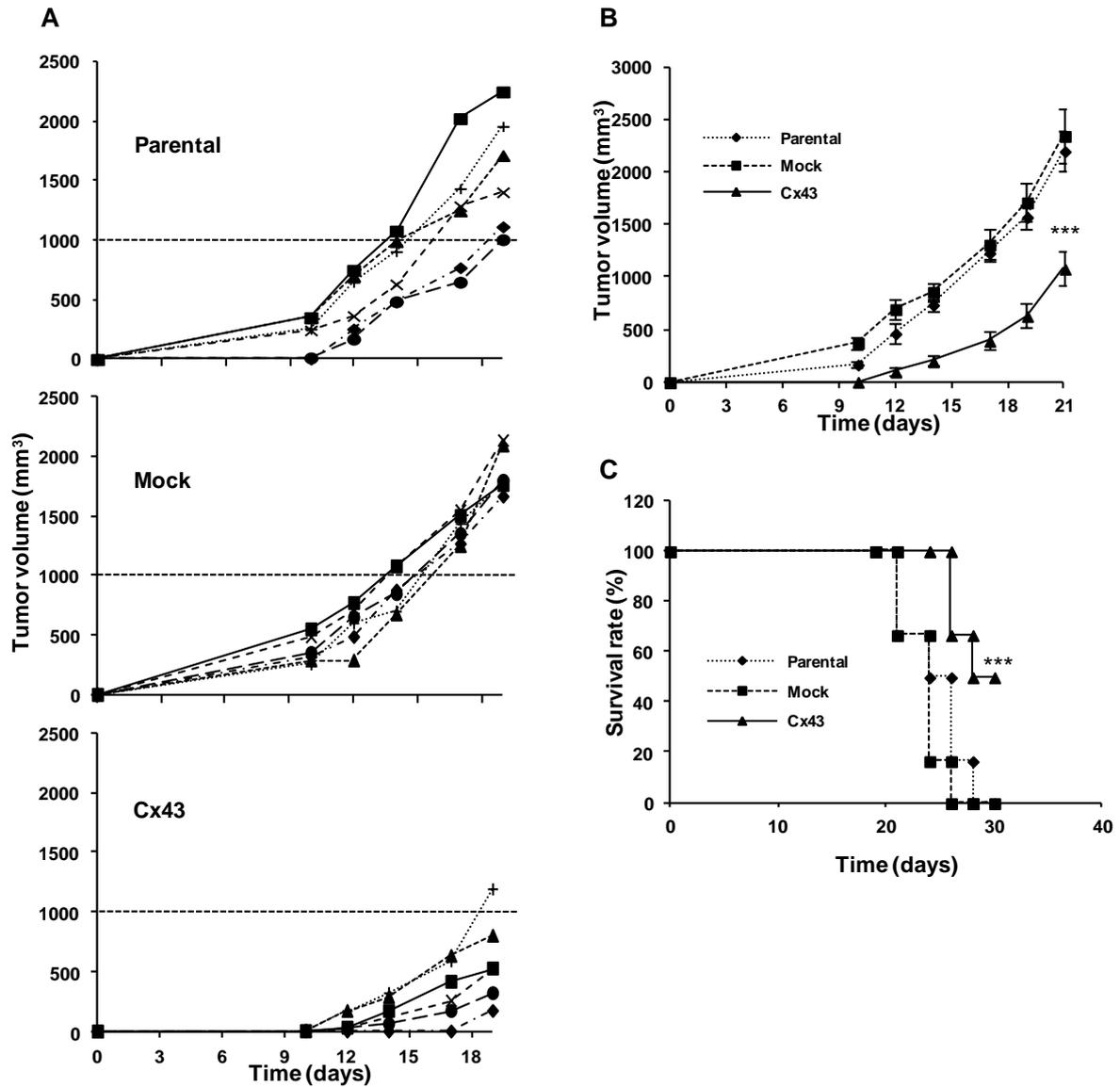
(B) TRAP staining was performed to identify osteoclast activity at the interface between tumor and cortical bone at the level of ectopic bone neoformation.

(C) Osterix immunostaining was performed to identify osteoblasts at the interface between tumor and cortical bone at the level of ectopic bone neoformation.



Supplementary Figure S1: FACS analysis of parachute assay to study GJIC between cells

FACS analysis of calcein transfer in hMSC treated with heptanol (2 mM; Sigma; right panel) compared to untreated control cells (middle panel). Heptanol, a rapid inhibitor of GJIC, is used to assess the specificity of dye transfer across gap junctions. Donor cells loaded with calcein-AM (quadrant 4) were parachuted for 2h on the Dil-dyed acceptor cell layer (quadrant 1) to a ratio of 1:10 donor to acceptor cells. The acceptor cells that have taken calcein from donor cells via gap junctions (double-labeled cells) are in quadrant 2. The number of these double-labeled acceptor cells (quadrant 2) as a percent of the total number of potential acceptor cells (quadrant 2+1) is defined as the transfer-ratio, and represents a direct measure of the degree of dye coupling. Histograms indicate mean of the relative transfer-ratio of calcein between cells. Left panel represents the Dil-dyed acceptor cells alone, used to establish a gate for the analysis of results.



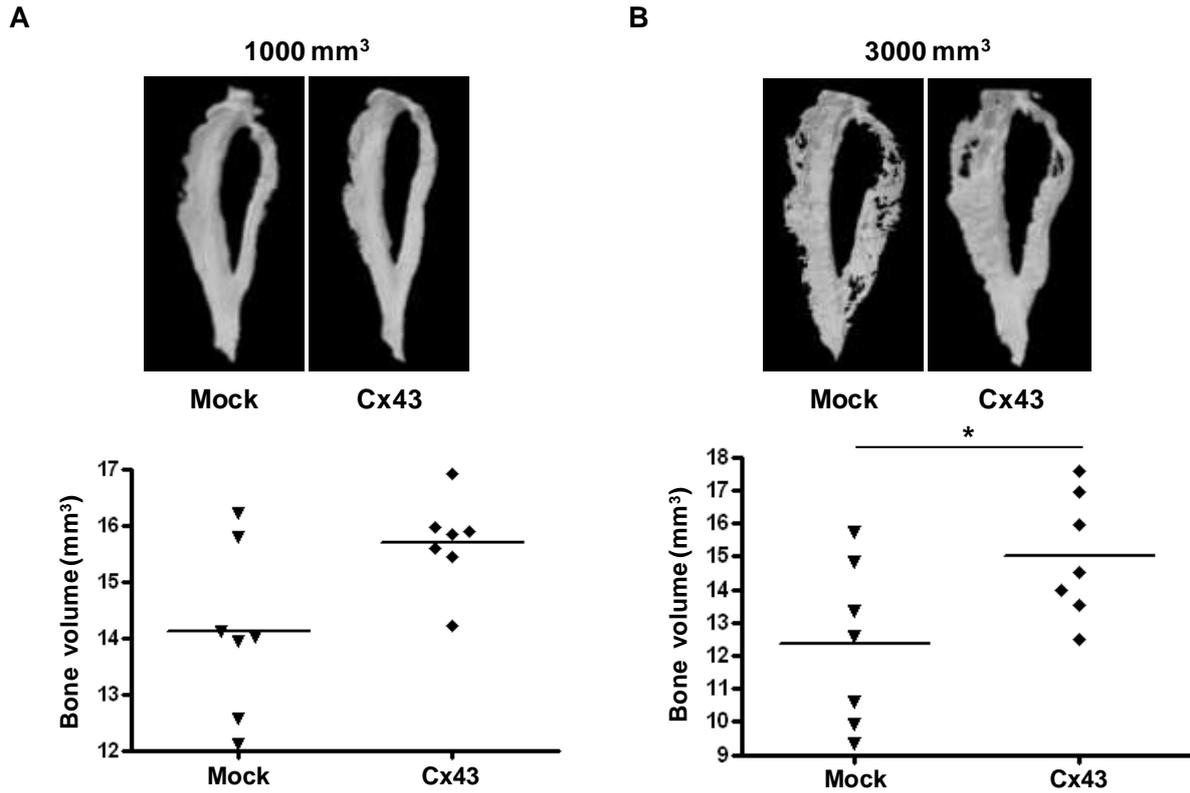
Supplementary Figure S2: Overexpression of Cx43 inhibits tumor growth in the A673 ES model and improves animal survival

Intramuscular paratibial injections of 2.10^6 A673 tumor cells were performed in each 3 groups of 8 nude mice. These results are representative for 2 independent experiments. (Mean \pm SEM; ***p<0.01)

(A) Evolution of tumor volumes of individual animal.

(B) Mean tumor volume of each group.

(C) Overall survival rates for the 3 groups over a 28-day period.



Supplementary Figure S3: Overexpression of Cx43 in A673 tumor cells favors bone formation

Intramuscular paratibial injections of A673 tumor cells were performed in 2 groups of 8 nude mice: mock or Cx43-overexpressing. The results are representative for 2 independent experiments. 3D reconstructions of tibiae/fibulae (top panel) and bone volume analysis (bottom panel) of the Cx43-overexpressing group compared to the mock group in A673 ES model, at equal tumor volumes: 1000 mm³ (A), 3000 mm³ (B). (Mean; *p<0.05)

References

- [1] A. Bleyer, R. Barr, B. Hayes-Lattin, D. Thomas, C. Ellis, B. Anderson, The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 288–298.
- [2] N.J. Balamuth, R.B. Womer, Ewing's sarcoma, *Lancet Oncol.* 11 (2010) 184–192.
- [3] P. Jedlicka, Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3 (2010) 338–347.
- [4] R. Taylor, H.J. Knowles, N.A. Athanasou, Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis, *J. Pathol.* 225 (2011) 195–202.
- [5] C. Turc-Carel, A. Aurias, F. Mugneret, S. Lizard, I. Sidaner, C. Volk, J.P. Thiery, S. Olschwang, I. Philip, M.P. Berger, Chromosomes in Ewing's sarcoma I An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12), *Cancer Genet. Cytogenet.* 32 (1988) 229–238.
- [6] O. Delattre, J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau, Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours, *Nature* 359 (1992) 162–165.
- [7] N. Riggi, I. Stamenkovic, The Biology of Ewing sarcoma, *Cancer Lett.* 254 (2007) 1–10.
- [8] F. Tirode, K. Laud-Duval, A. Prieur, B. Delorme, P. Charbord, O. Delattre, Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors, *Cancer Cell* 11 (2007) 421–429.
- [9] G.E. Sosinsky, B.J. Nicholson, Structural organization of gap junction channels, *Biochim. Biophys. Acta* 1711 (2005) 99–125.
- [10] N.M. Kumar, N.B. Gilula, The gap junction communication channel, *Cell* 84 (1996) 381–388.
- [11] C. Tacheau, J. Fontaine, J. Loy, A. Mauviel, F. Verrecchia, TGF-beta induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epithelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways, *J. Cell. Physiol.* 217 (2008) 759–768.

- [12] C. Tacheau, J. Laboureau, A. Mauviel, F. Verrecchia, TNF-alpha represses connexin43 expression in HaCat keratinocytes via activation of JNK signaling, *J. Cell. Physiol.* 216 (2008) 438–444.
- [13] F. Verrecchia, F. Duthe, S. Duval, I. Duchatelle, D. Sarrouilhe, J.C. Herve, ATP counteracts the rundown of gap junctional channels of rat ventricular myocytes by promoting protein phosphorylation, *J. Physiol.* 516 (1999) 447–459.
- [14] F. Verrecchia, J. Hervé, Reversible inhibition of gap junctional communication by tamoxifen in cultured cardiac myocytes, *Pflugers Arch.* 434 (1997) 113–116.
- [15] F. Pluciennik, F. Verrecchia, B. Bastide, J.C. Hervé, M. Joffre, J. Délèze, Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes, *J. Membr. Biol.* 149 (1996) 169–177.
- [16] C.C.G. Naus, Gap junctions and tumour progression, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (2002) 136–141.
- [17] M. Mesnil, S. Crespín, J.-L. Avanzo, M.-L. Zaidan-Dagli, Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process, *Biochim. Biophys. Acta* 1719 (2005) 125–145.
- [18] L. Cronier, S. Crespín, P.-O. Strale, N. Defamie, M. Mesnil, Gap junctions and cancer: new functions for an old story, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 323–338.
- [19] V.A. Krutovskikh, S.M. Troyanovsky, C. Piccoli, H. Tsuda, M. Asamoto, H. Yamasaki, Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo, *Oncogene* 19 (2000) 505–513.
- [20] M. Momiyama, Y. Omori, Y. Ishizaki, Y. Nishikawa, T. Tokairin, J. Ogawa, K. Enomoto, Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells, *Cancer Sci.* 94 (2003) 501–507.
- [21] R. Civitelli, Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 188–192.

- [22] J.R. De Leon, P.M. Buttrick, G.I. Fishman, Functional analysis of the connexin43 gene promoter in vivo and in vitro, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (1994) 379–389.
- [23] K. Kimura, S. Teranishi, T. Nishida, Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin43, *Exp. Eye Res.* 90 (2010) 4–9.
- [24] G.S. Goldberg, J.F. Bechberger, C.C. Naus, A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer, *BioTechniques* 18 (1995) 490–497.
- [25] K. Ziambaras, F. Lecanda, T.H. Steinberg, R. Civitelli, Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 218–228.
- [26] C.C. Naus, J.F. Bechberger, S. Caveney, J.X. Wilson, Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells, *Neurosci. Lett.* 126 (1991) 33–36.
- [27] S. Jamieson, J.J. Going, R. D'Arcy, W.D. George, Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours, *J. Pathol.* 184 (1998) 37–43.
- [28] M.M. Saunders, M.J. Seraj, Z. Li, Z. Zhou, C.R. Winter, D.R. Welch, H.J. Donahue, Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication, *Cancer Res.* 61 (2001) 1765–1767.
- [29] W.A. May, M.L. Gishizky, S.L. Lessnick, L.B. Lunsford, B.C. Lewis, O. Delattre, J. Zucman, G. Thomas, C.T. Denny, Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 5752–5756.
- [30] S.L. Lessnick, B.S. Braun, C.T. Denny, W.A. May, Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene, *Oncogene* 10 (1995) 423–431.
- [31] R.A. Bailly, R. Bosselut, J. Zucman, F. Cormier, O. Delattre, M. Roussel, G. Thomas, J. Ghysdael, DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 3230–3241.

- [32] M. Fukuma, H. Okita, J.-I. Hata, A. Umezawa, Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma, *Oncogene* 22 (2003) 1–9.
- [33] D.H. Wai, K.-L. Schaefer, A. Schramm, E. Korsching, F. Van Valen, T. Ozaki, W. Boecker, L. Schweigerer, B. Dockhorn-Dworniczak, C. Poremba, Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays, *Int. J. Oncol.* 20 (2002) 441–451.
- [34] J.P. Zwerner, W.A. May, PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors, *Oncogene* 20 (2001) 626–633.
- [35] F. Nakatani, K. Tanaka, R. Sakimura, Y. Matsumoto, T. Matsunobu, X. Li, M. Hanada, T. Okada, Y. Iwamoto, Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 15105–15115.
- [36] L. Dauphinot, C. De Oliveira, T. Melot, N. Sevenet, V. Thomas, B.E. Weissman, O. Delattre, Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression, *Oncogene* 20 (2001) 3258–3265.
- [37] K.B. Hahm, K. Cho, C. Lee, Y.H. Im, J. Chang, S.G. Choi, P.H. Sorensen, C.J. Thiele, S.J. Kim, Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein, *Nat. Genet.* 23 (1999) 222–227.
- [38] A. Prieur, F. Tirode, P. Cohen, O. Delattre, EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7275–7283.
- [39] S.L. Lessnick, M. Ladanyi, Molecular pathogenesis of ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets, *Annu Rev Pathol* 7 (2012) 145–159.
- [40] J. Czyz, The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 13 (2008) 92–102.

- [41] I.V. Budunova, G.M. Williams, Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication, *Cell Biol. Toxicol.* 10 (1994) 71–116.
- [42] M. Mesnil, H. Yamasaki, Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis, *Mol. Carcinog.* 7 (1993) 14–17.
- [43] M. Vinken, T. Vanhaecke, P. Papeleu, S. Snykers, T. Henkens, V. Rogiers, Connexins and their channels in cell growth and cell death, *Cell. Signal.* 18 (2006) 592–600.
- [44] Y.W. Zhang, I. Morita, M. Ikeda, K.W. Ma, S. Murota, Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27, *Oncogene* 20 (2001) 4138–4149.
- [45] K.G. Halvorson, M.A. Sevcik, J.R. Ghilardi, T.J. Rosol, P.W. Mantyh, Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer, *Clin. J. Pain.* 22 (2006) 587–600.
- [46] M. Grano, G. Mori, V. Minielli, F.P. Cantatore, S. Colucci, A.Z. Zallone, Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (2000) 1097–1100.
- [47] T.A. Guise, J.J. Yin, S.D. Taylor, Y. Kumagai, M. Dallas, B.F. Boyce, T. Yoneda, G.R. Mundy, Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 1544–1549.
- [48] J. Pfeilschifter, G.R. Mundy, Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 2024–2028.
- [49] C.C. Naus, D.W. Laird, Implications and challenges of connexin connections to cancer, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 435–441.

III. COMPLEMENTS DE DISCUSSION DE L'ARTICLE 2

De nombreux travaux ont démontré que la tumorigenèse est souvent associée à une perte ou à une réduction de l'expression des connexines et/ou de GJIC. Ces observations ont été réalisées sur un large spectre de cellules tumorales et de tumeurs primaires (Naus *et al.*, 1991; Jamieson *et al.*, 1998; Mesnil *et al.*, 2005). Cependant, très peu de données existent concernant l'implication des connexines dans le développement des tumeurs osseuses primitives, en particulier les sarcomes d'Ewing.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une perte de l'expression de la Cx43 dans différentes lignées humaines de sarcome d'Ewing par rapport au niveau d'expression présent dans les hMSC issues de différents donneurs sains. L'origine cellulaire des sarcomes d'Ewing est encore controversée, mais serait mésenchymateuse d'après la majorité des études (Tirode *et al.*, 2007). Ainsi, nous avons choisi les hMSC comme contrôle pour nos expériences.

Dans la plupart des cas, les mécanismes responsables de la diminution transcriptionnelle des connexines dans les cellules tumorales restent encore à élucider. Le sarcome d'Ewing est une tumeur caractérisée par une translocation chromosomique entre le gène EWS et un gène de la famille ETS (FLI1 dans 85% des cas), générant un gène de fusion EWS-FLI1. Cette protéine de fusion EWS-FLI1 agit comme un facteur de transcription aberrant capable d'induire ou de réprimer l'expression de gènes oncogéniques. En effet, des travaux sur des cellules NIH3T3 ont démontré qu'EWS-FLI1 agit comme un activateur transcriptionnel induisant une transformation oncogénique des cellules (May *et al.*, 1993a; Lessnick *et al.*, 1995). La fonction d'EWS-FLI1 en tant que facteur de transcription aberrant est également supportée par le fait que cette protéine est capable d'être transloquée dans le noyau et de se fixer à l'ADN sur des sites spécifiques du promoteur de certains gènes cibles afin de réguler leur expression. De plus, EWS-FLI1, par la substitution du domaine N-terminal natif de FLI1 (domaine activateur de la transcription) par le domaine N-terminal d'EWS, possède un potentiel activateur de la transcription plus puissant que la protéine FLI1 native (May *et al.*, 1993b; Riggi and Stamenkovic, 2007). Diverses études ont ainsi mis en évidence un grand nombre de gènes cibles d'EWS-FLI1. Cependant, le type de régulation (directe ou indirecte) n'a pas toujours été défini (Mackintosh *et al.*, 2010). Il a notamment été démontré qu'EWS-FLI1 contribue à la tumorigenèse des sarcomes d'Ewing soit en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la transformation et la progression tumorale, tels que MYC (Bailly *et al.*, 1994), ID2 (Fukuma *et al.*, 2003), CCND1 (Wai *et al.*, 2002) et PDGFC (Zwerner and May, 2001),

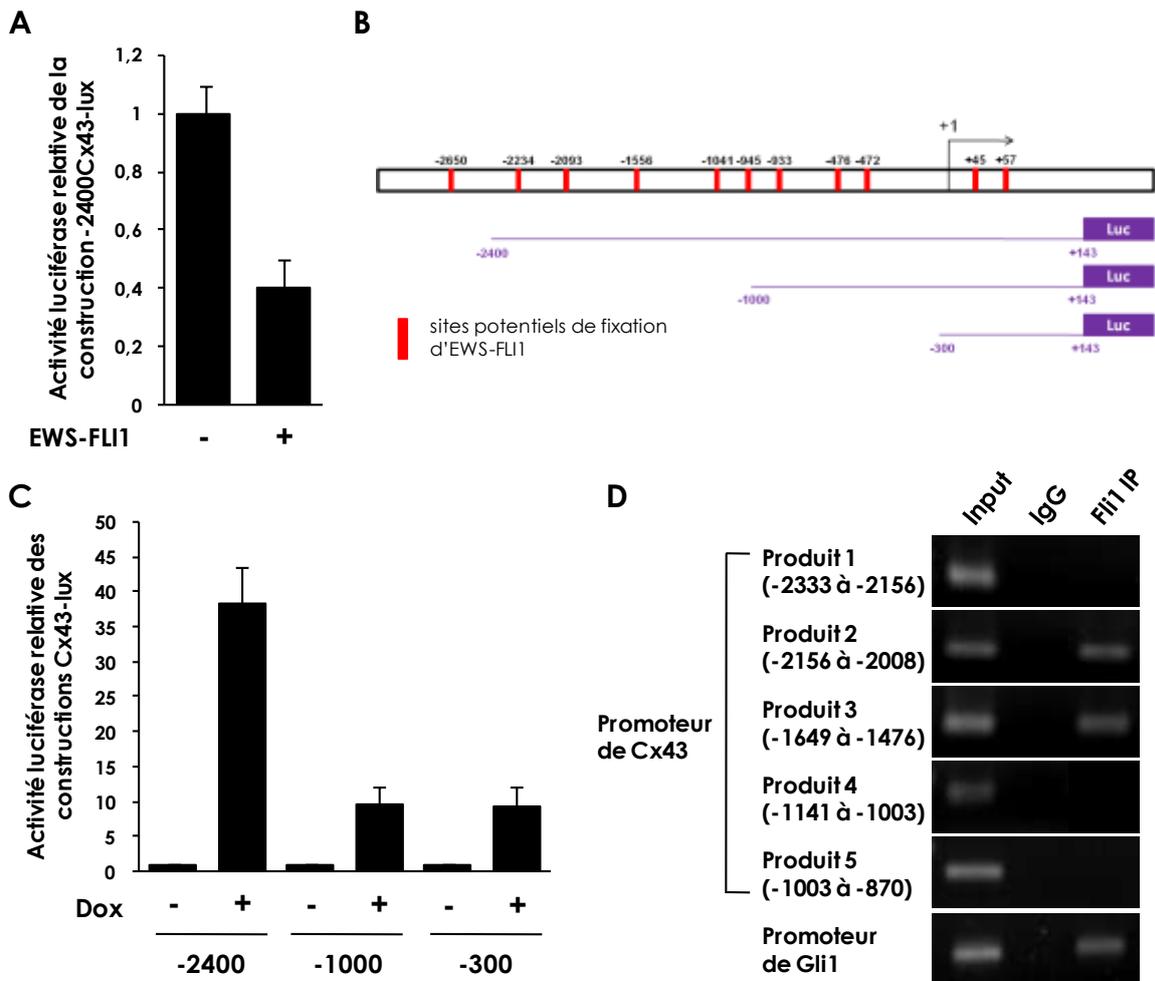


Figure 29 : EWS-FLI1 réprime l'activité transcriptionnelle de la Cx43

A) Les hMSC sont transfectées avec le vecteur gène/rapporteur -2400Cx43-lux en présence ou absence du vecteur d'expression d'EWS-FLI1. 48h après transfection des cellules, l'activité transcriptionnelle de la Cx43 est évaluée par mesure de l'activité luciférase.

B) Sur cette figure est représenté le promoteur de la Cx43 sur lequel les sites potentiels de fixation d'EWS-FLI1 ont été localisés. Les différentes délétions 5' du promoteur de la Cx43 utilisées lors des expériences suivantes (C et D) sont également représentées.

C) Les cellules de sarcome d'Ewing A6731c (transfectées de façon stable avec un shRNA pour EWS-FLI1 inducible par la doxycycline, voir le « Matériels et Méthodes » de l'article 2) sont traitées ou non avec 1 µg/ml de doxycycline. 48h après le début du traitement, les cellules sont transfectées avec différentes délétions en 5' du promoteur de la Cx43 et le traitement est poursuivi pendant 24h. La réponse des différentes délétions du promoteur de la Cx43 est ensuite évaluée par mesure de l'activité luciférase.

D) Une expérience de ChIP est réalisée en suivant le protocole du kit « MAGnify Chromatin Immunoprecipitation System » d'Invitrogen. Brièvement, les cellules de sarcome d'Ewing A673 sont lysées après ajout de formaldéhyde pour fixer les complexes ADN/protéines (« crosslinking »). Puis, l'ADN est cassé en fragments de 100 à 300 pb par sonication. L'immunoprécipitation de l'ADN est réalisée à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles un anticorps anti-FLI1 (reconnaissant la protéine de fusion EWS-FLI1) a été fixé au préalable, puis l'ADN est élué. Cinq amorces différentes de PCR ont été dessinées afin de couvrir les quatre sites potentiels de fixation d'EWS-FLI1 sur le promoteur de la Cx43. Les amorces du promoteur de Gli1 ont été utilisées comme contrôle positif de la fixation d'EWS-FLI1 (Beauchamp *et al.*, 2009). L'échantillon IgG correspond au contrôle négatif de l'immunoprécipitation réalisé sans anticorps. L'échantillon « input » (ou contrôle positif) représente l'ADN total avant immunoprécipitation.

soit en réprimant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et l'inhibition de la prolifération, tels que TGF- β 2 (Hahm *et al.*, 1999), p21 (Nakatani *et al.*, 2003), p57Kip (Dauphinot *et al.*, 2001) et IGFBP3 (Prieur *et al.*, 2004). Parmi ces gènes, ceux du TGF- β 2, d'IGFBP3, d>ID2 et de p21 ont été identifiés comme des cibles directes d'EWS-FLI1 (Mackintosh *et al.*, 2010).

Ainsi, dans le cas des sarcomes d'Ewing, il nous a semblé intéressant de savoir si la perte d'expression de la Cx43 dans ces cellules tumorales était liée à l'expression d'EWS-FLI1. Nous avons démontré dans ces travaux que l'extinction d'EWS-FLI1 à l'aide d'un shRNA, augmentait l'expression transcriptionnelle de la Cx43, suggérant que la Cx43 était un gène cible du facteur de transcription EWS-FLI1. Par ailleurs, la surexpression d'EWS-FLI1 par transfection transitoire des cellules avec un vecteur d'expression pour EWS-FLI1 réprimait la transcription de la Cx43 dans des hMSC, suggérant ainsi une action transcriptionnelle d'EWS-FLI1 sur la Cx43 (Figure 29A). Cependant, les mécanismes impliqués dans la répression du gène de la Cx43 par EWS-FLI1 ne sont pas totalement élucidés. Dans le but de déterminer si la Cx43 était une cible directe ou indirecte du facteur de transcription EWS-FLI1, nous avons réalisé deux études complémentaires :

1) l'effet de l'extinction d'EWS-FLI1 a été testé sur différentes délétions en 5' du promoteur de la Cx43 par transfection transitoire (Figure 29C). Comme on peut le voir sur la figure 29B, l'extinction d'EWS-FLI1, suite à un traitement avec de la doxycycline, augmente la trans-activation de la construction -2400Cx43-lux de plus de 35 fois. Dans les mêmes conditions expérimentales, les constructions -1000 et -300 ne sont induites que de 10 fois, suggérant qu'il existe un élément de réponse principal à EWS-FLI1 situés entre les bases -2400 et -1000 du promoteur de la Cx43. Toutefois, on ne peut pas exclure l'existence d'un ou plusieurs autres éléments de réponse à EWS-FLI1 en aval de -300.

2) la capacité d'EWS-FLI1 à se fixer physiquement sur cette région du promoteur a ensuite été étudiée par immunoprécipitation (ChIP assay). La figure 29D indique qu'EWS-FLI1 est capable de se fixer sur des séquences d'ADN présentes entre les bases -2156 et -2008, et les bases -1649 et -1476 du promoteur de la Cx43. A l'inverse, nos résultats montrent qu'EWS-FLI1 ne semble pas en mesure de se fixer sur les séquences d'ADN du promoteur de la Cx43 situées entre les bases -2333 et -2156, -1141 et -1003, et -1003 et -870.

Des études récentes ont démontré qu'EWS-FLI1 se fixe sur des séquences microsatellites contenant des répétitions GGAA afin de réguler le mécanisme de transcription (Gangwal *et al.*, 2008; Guillon *et al.*, 2009). On peut noter la présence de quatre répétitions GGAA dans cette région du promoteur de la Cx43. Ainsi, ces travaux préliminaires suggèrent que la Cx43 pourrait être une cible directe du facteur de transcription EWS-FLI1 et que ce facteur se fixe sur une région située entre les bases -2156 et -1476 en amont du site d'initiation

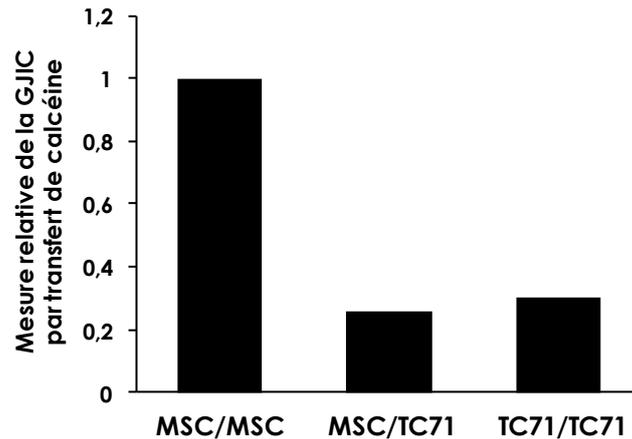


Figure 30 : Altération de la communication homologue et hétérologue dans les cellules de sarcome d'Ewing

La capacité des cellules tumorales de sarcome d'Ewing TC71 à communiquer entre elles via les jonctions gap ainsi qu'avec des cellules saines (hMSC) a été évaluée par la technique du parachute assay, et comparée au niveau de GJIC présent dans les hMSC. Pour cela, les cellules « donneuses » ont été préchargées avec de la calcéine-acétoxyméthylester (AM) à 1 μ M, perméable aux jonctions gap. Ces cellules sont ensuite « parachutées » après trypsination à un ratio de 1/10 sur un tapis cellulaire de cellules « acceptrices » marquées avec du Dil (dialkylcarbocyanines ; 5 μ M), un colorant membranaire non transférable via les jonctions gap. Ces deux populations cellulaires sont ensuite incubées durant 4h à 37°C, permettant ainsi à la calcéine-AM de diffuser des cellules « donneuses » vers les cellules « acceptrices » via uniquement les jonctions gap, faisant apparaître une troisième population de cellules qui sont elles double-marquées. Ce transfert de calcéine, mesuré par FACS, permet alors d'évaluer le taux de communication intercellulaire médiée par les jonctions gap (GJIC) présent entre les cellules. La quantification du transfert de calcéine est expliquée plus en détails dans la légende de la figure supplémentaire 1 de l'article 2. Selon les conditions, les cellules « donneuses » et « acceptrices » correspondent soit aux hMSC soit aux cellules de sarcome d'Ewing. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée A673 de sarcome d'Ewing.

de la transcription (+1). Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, il est indispensable de muter les sites GGAA de fixation potentielle d'EWS-FLI1 identifiés sur le promoteur de la Cx43, et de montrer qu'après mutation de ces sites, EWS-FLI1 n'est plus capable de se fixer à l'ADN et que cette absence de fixation entraîne une perte de la réponse de la Cx43 à EWS-FLI1. Cette expérience permettrait ainsi de vérifier la fonctionnalité de ces sites. A ce stade de nos expériences, il reste envisageable que la Cx43 soit une cible indirecte d'EWS-FLI1.

Nos travaux ont également démontré *in vivo* que la surexpression de la Cx43 inhibe la croissance de la tumeur primitive des sarcomes d'Ewing. Cette étude met donc en évidence pour la première fois que la diminution d'expression de la Cx43 est un des mécanismes permettant aux cellules cancéreuses de sarcome d'Ewing d'acquérir leur fort potentiel prolifératif. Durant ces 40 dernières années, de nombreuses études ont démontré que la tumorigenèse est souvent associée à une perte ou à une réduction de la GJIC entre les cellules cancéreuses (communication homologue), ou entre les cellules cancéreuses et les cellules saines environnantes (communication hétérologue) (Mesnil, 2004). Ainsi, au vu de ces observations, il a été suggéré que les connexines modulent la prolifération cellulaire et par conséquent la croissance tumorale via leur habileté à former des canaux intercellulaires permettant des échanges de molécules informatives entre cellules adjacentes, impliquées par exemple dans la régulation du cycle cellulaire (Czyz, 2008). De plus, il a été montré que de nombreux promoteurs de tumeur inhibent la GJIC, renforçant ainsi l'idée que l'inhibition de la communication jonctionnelle durant la phase initiale de promotion tumorale favorise l'expansion clonale des cellules transformées (Mesnil and Yamasaki, 1993; Budnova and Williams, 1994). Dans ce contexte, de nombreuses études ont démontré que la restauration de la GJIC ainsi que la réexpression des connexines dans des cellules cancéreuses peuvent inhiber leur prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vivo* (Mesnil *et al.*, 2005; Cronier *et al.*, 2009).

En plus de la perte d'expression de la Cx43 observée dans les cellules tumorales de sarcome d'Ewing, nous avons également mis en évidence par la technique de parachute, une diminution de 70-80% de la GJIC entre les cellules cancéreuses de sarcome d'Ewing ainsi qu'entre les cellules de sarcome d'Ewing et des hMSC (Figure 30). Ces cellules tumorales présentent donc à la fois une réduction de la communication homologue et hétérologue. Cette altération de la GJIC peut être due soit à une perte d'expression des connexines, ce qui est le cas dans ces cellules, ou soit à une localisation aberrante des connexines. En effet, plusieurs études ont montré que les connexines peuvent présenter un défaut d'adressage à

la membrane et ainsi se retrouver accumulées dans le cytoplasme des cellules cancéreuses (Mesnil *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant pour compléter ces travaux d'étudier par immunomarquage la localisation de la Cx43 dans les cellules tumorales de sarcome d'Ewing parentales et surexprimant la Cx43. Toutefois, dans notre étude, la surexpression de la Cx43 dans les cellules tumorales de sarcome d'Ewing a permis d'augmenter la communication jonctionnelle, suggérant donc une localisation, en partie, membranaire de la Cx43 dans ces cellules modifiées.

De plus, cette restauration de la GJIC suggère que l'effet suppresseur de tumeur observé pourrait être lié à la capacité des cellules tumorales à communiquer. En effet, il peut être supposé que les jonctions gap, de part leur fonction, puissent permettre un transfert intercellulaire direct de régulateurs positifs ou négatifs de la prolifération cellulaire. Cependant, l'identité biochimique de ces messagers reste encore à clarifier. Dans ce contexte, plusieurs candidats plausibles sont suspectés, tels que le Ca^{2+} , l'AMPc ou l' IP_3 (Vinken *et al.*, 2011). Il a notamment été montré dans des cellules tumorales hépatiques humaines que l'arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire induit par un traitement au fucoxanthine serait dû à une augmentation de vagues calciques intercellulaires médiées par les jonctions gap (Liu *et al.*, 2009). L'AMPc, est quant à lui, connu pour augmenter la production de p27, qui est un inhibiteur du cycle cellulaire (Zhang *et al.*, 2003 c et d). De plus, le taux d'AMPc est le plus élevé en phase G1 et diminue à l'entrée de la phase S (Stork and Schmitt, 2002), ce qui corrèle avec la diminution de la GJIC observée au moment de la transition G1/S du cycle cellulaire dans divers types cellulaires dont des hépatocytes en prolifération (Temme *et al.*, 2000). En ce qui concerne l' IP_3 , il joue un rôle clé dans la signalisation calcique et par conséquent dans la régulation du cycle cellulaire. Pour vérifier si l'effet suppresseur de tumeur observé est lié à la restauration de la GJIC, il serait intéressant de réaliser un test de prolifération *in vitro* en inhibant la GJIC dans les cellules de sarcome d'Ewing surexprimant la Cx43, afin de déterminer si la surexpression de la Cx43 est toujours capable d'inhiber la prolifération de ces cellules tumorales.

Cependant, bien que la surexpression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing restaure la GJIC, il ne peut pas être exclu que le rôle de la Cx43 dans le contrôle de la prolifération cellulaire soit indépendant de la GJIC. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence ces dernières années que les connexines en tant que protéines peuvent réguler des fonctions cellulaires, comme la prolifération, en modulant directement l'expression de certains gènes. De ce fait, de nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer les mécanismes moléculaires, GJIC dépendante ou non, impliqués dans le contrôle de l'expression génique par les connexines. Il a ainsi été démontré que les connexines,

indépendamment ou non de la GJIC, peuvent réguler l'expression et/ou l'activité de nombreux régulateurs de la prolifération cellulaire, incluant p27, cyclin A, cyclin D1, cyclin D2, Cdk5, Cdk6, ERK1/2, STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein 3), Src, HER2 (human EGF receptor 2), FGF1 et FGFR3 (FGF receptor 3) (Vinken *et al.*, 2011). Ainsi, les mécanismes impliqués dans l'effet suppresseur de tumeur des connexines sont loin d'être aussi simples que le laissent présumer à l'origine les travaux initiaux de Loewenstein et de ses collègues (Vinken *et al.*, 2006, 2011; Cronier *et al.*, 2009). Ce concept est notamment illustré par les travaux de Zhang et ses collaborateurs réalisés sur des cellules d'ostéosarcome humain, qui ont montré que la surexpression de la Cx43 entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire, via une coopération entre des mécanismes à la fois dépendants ou non de la GJIC. En effet, la surexpression de la Cx43 entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G1, résultant d'une accumulation de la forme hypophosphorylée de la protéine Rb, induite par une diminution de l'activité des protéines Cdk2 et Cdk4 associée à une augmentation de l'expression de p27. Cette augmentation de l'expression de p27 résulte d'une part de la restauration de la GJIC, qui permet un flux intercellulaire d'AMPc, connu pour augmenter l'expression de p27. D'autre part, la surexpression de la Cx43, indépendamment de la GJIC, stimule la dégradation de la protéine Skp2, impliquée dans l'ubiquitination et donc la dégradation de p27. Ainsi, la coopération entre des mécanismes dépendants ou non de la GJIC induit une accumulation de p27 et par conséquent une inhibition de la prolifération (Zhang *et al.*, 2001, 2003c, 2003d). Un effet similaire a également été observé suite à la surexpression des connexines 43 et 32 dans, respectivement, des cellules de carcinomes pulmonaire et hépatique. Dans ces cellules, un prolongement de la phase G1 du cycle cellulaire a été de façon similaire associé à une augmentation de l'expression de p27, mais également à une diminution de la cycline D1 (Koffler *et al.*, 2000).

Nos travaux ont démontré, de façon similaire, que la surexpression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing augmente la production de p27 associée à une forte diminution de la phosphorylation de la protéine Rb, entraînant un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. Ainsi, notre étude supporte ce concept, en mettant en évidence que la Cx43 régule la prolifération cellulaire par une modulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Cependant, les mécanismes exacts par lesquels les connexines peuvent réguler directement l'expression génique, restent encore obscurs. Il semblerait que de part leur localisation non membranaire (cytoplasmique ou même nucléaire), les connexines puissent moduler la prolifération cellulaire par des interactions avec certaines protéines intracellulaires. Des études récentes ont même suggéré que les connexines ou au moins une

partie de cette protéine pouvait être transloquée dans le noyau afin de modifier l'expression de certains gènes cibles (Cronier *et al.*, 2009; Vinken *et al.*, 2011).

Par ailleurs, le développement des tumeurs osseuses primitives génère l'apparition de lésions ostéolytiques, à l'origine de fortes douleurs et de fractures chez les patients. Chez l'adulte, l'intégrité du squelette est assurée par un équilibre entre résorption et apposition osseuse. Lors du développement tumoral, cet équilibre est altéré et aboutit à la formation de lésions de type ostéolytique ou ostéocondensant. Par ailleurs, l'interaction entre les cellules tumorales, les facteurs qu'elles produisent et le microenvironnement osseux est essentielle à l'implantation et au développement de la tumeur. Ainsi, la présence d'un cercle vicieux établi entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée joue un rôle crucial dans le développement des tumeurs osseuses primitives (Halvorson *et al.*, 2006). Les cellules cancéreuses produisent des facteurs solubles qui vont stimuler directement ou indirectement via les ostéoblastes, la maturation, la différenciation et la survie des ostéoclastes (Guise *et al.*, 1996; Grano *et al.*, 2000). A leur tour, durant la résorption osseuse, les ostéoclastes libèrent des facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse minéralisée, et de ce fait, favorisent le développement de la tumeur (Pfeilschifter and Mundy, 1987). Des études concernant les mécanismes cellulaires impliqués dans la résorption osseuse rapide et importante engendrée par les sarcomes d'Ewing indiquent que les cellules tumorales de sarcome d'Ewing activent l'activité ostéoclastique (Taylor *et al.*, 2011).

En accord avec ces études, nous avons démontré que l'augmentation du volume osseux engendrée par la surexpression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing est, en majeure partie, due à une inhibition de l'activité ostéoclastique plutôt qu'à une stimulation de l'activité ostéoblastique. La diminution de l'activité enzymatique TRAP observée au niveau de la plaque de croissance, qui n'est pas en contact direct avec la tumeur, suggère que la surexpression de la Cx43 altère la capacité des cellules tumorales à produire un facteur soluble capable de réguler l'activité ostéoclastique, tels que RANKL ou le M-CSF. Cette hypothèse est notamment supportée par le fait que des travaux ont récemment démontré que les cellules de sarcome d'Ewing régulent l'ostéoclastogenèse via un mécanisme dépendant de RANKL (Taylor *et al.*, 2011). De plus, l'OPG, une cytokine anti-résorptive produite également par les cellules de sarcome d'Ewing (Taylor *et al.*, 2011), est également un candidat plausible. Cette autre hypothèse est notamment appuyée par les travaux de M. Watkins et ses collègues qui ont démontré que des ostéoblastes déficients pour la Cx43 présentent une chute de la production d'OPG, induisant une forte ostéoclastogenèse en co-culture *in vitro* et par conséquent une importante résorption osseuse chez les souris présentant un KO conditionnel pour la Cx43 (Watkins *et al.*, 2011). Ainsi,

à l'inverse de cette étude, les cellules de sarcome d'Ewing surexprimant la Cx43 pourraient voir leur production d'OPG augmenter, inhibant ainsi l'activité ostéoclastique.

Cependant, l'identité de ce facteur soluble reste encore à élucider, et il serait, dans un premier temps, intéressant d'étudier l'expression de ces trois candidats potentiels (RANKL, M-CSF et OPG) dans les cellules tumorales de sarcome d'Ewing surexprimant ou non la Cx43.

En conclusion, cette étude démontre le rôle crucial de la Cx43 dans le développement des sarcomes d'Ewing, en particulier durant la croissance de la tumeur primitive. Nous avons notamment mis en évidence : dans un premier temps, que l'expression de la Cx43 altère la croissance tumorale par un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1, résultant d'une augmentation de l'expression de p27, et dans un second temps, que l'expression de la Cx43 joue un rôle essentiel dans le cercle vicieux, établi entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée de par sa capacité à inhiber l'activité ostéoclastique.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes focalisés uniquement sur le rôle de la Cx43 dans le développement de la tumeur primitive des sarcomes d'Ewing. Ainsi, le rôle de la Cx43 dans les phases plus tardives du développement de cette tumeur, en particulier la dissémination métastatique, reste donc à élucider. Des données récentes ont montré que les connexines seraient impliquées dans la progression tumorale, notamment durant les processus invasifs et métastatiques. Certaines études ont même suggéré que les connexines auraient plutôt un rôle oncogénique durant ces phases tardives du processus tumoral, en facilitant l'invasion, l'extravasation et la dissémination des métastases (Naus and Laird, 2010). Cependant, le rôle des connexines durant les phases tardives reste controversé.

Dans notre étude, nous avons montré un rôle de la Cx43 plutôt suppresseur de tumeur dans le développement des sarcomes d'Ewing, suggérant que cette connexine pourrait constituer une nouvelle cible dans le traitement de cette tumeur osseuse primitive. Toutefois, il ne peut pas être exclu que la Cx43 pourrait avoir un rôle pro-métastatique. En effet, les résultats obtenus récemment par M. Bui et ses collègues sur des biopsies humaines de sarcome d'Ewing ont montré qu'une forte expression cytoplasmique de la Cx43 serait corrélée à un phénotype plus agressif de ces tumeurs et par conséquent à un mauvais pronostic vital des patients (Bui *et al.*, 2011). Cependant, ces résultats ont été obtenus sur un nombre restreint d'échantillons et devront donc être confirmés à plus grande échelle. De plus, contrairement aux observations réalisées par cette équipe, dans le cadre de notre étude, la surexpression de la Cx43 augmente fortement la GJIC, suggérant une localisation principalement membranaire de la Cx43 dans notre modèle. Ainsi, le rétablissement de la

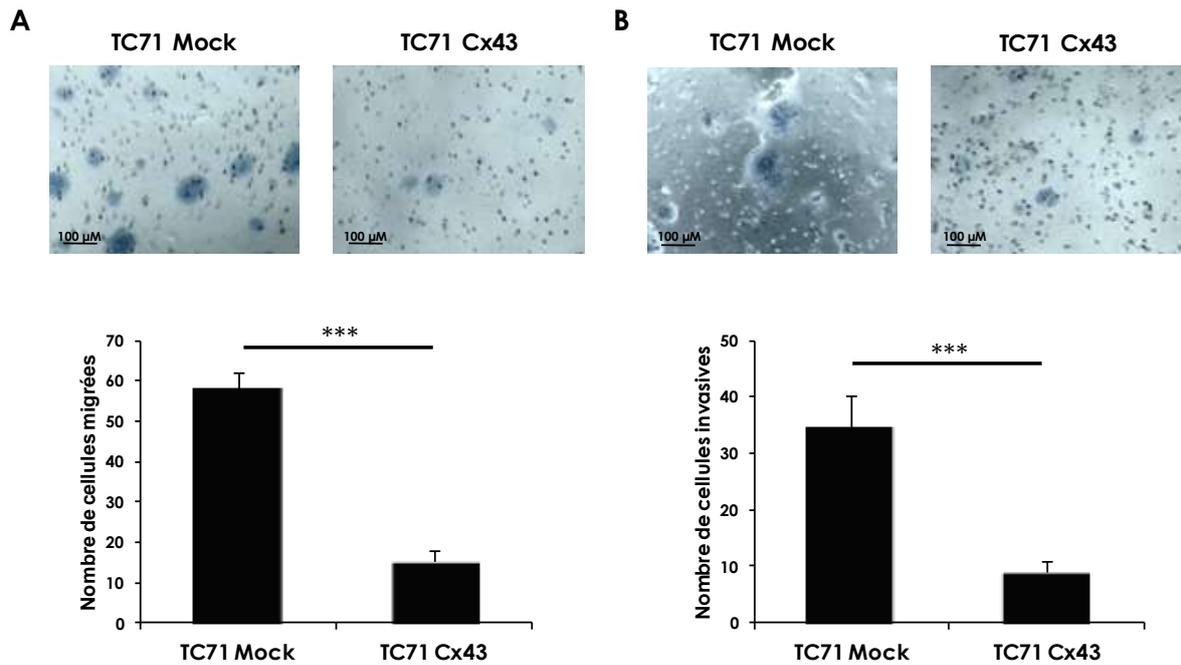


Figure 31 : La surexpression de la Cx43 inhibe la migration et l'invasion des cellules de sarcomes d'Ewing TC71

L'impact de la surexpression de la Cx43 a été évalué *in vitro* sur la migration (**A**) et l'invasion (**B**) des cellules de sarcome d'Ewing TC71 par l'utilisation des chambres de Boyden. 5000 cellules tumorales TC71 resuspendues dans du milieu RPMI à 1% SVF sont ensemencées sur l'insert. Les filtres des inserts possèdent des pores de 8 μm de diamètre et sont préalablement recouverts de 2 μg de Matrigel pour les tests d'invasion. Du milieu RPMI à 10% SVF est déposé dans le compartiment inférieur afin de créer un gradient de sérum, qui grâce à son effet chimioattracteur, va permettre le passage des cellules à travers le filtre de l'insert. Après 48h d'incubation à 37°C, les cellules se trouvant sur la face inférieure du filtre sont fixées avec une solution de PFA 4% puis colorées au bleu de méthylène. Le comptage des cellules est réalisé sur cinq champs microscopiques aléatoires (grossissement x100) de l'insert. Les résultats présentés correspondent à une expérience réalisée en triplicats représentative de trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SD. *** $p < 0,001$ (t-test). Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée A673 de sarcome d'Ewing.

communication jonctionnelle semble être un facteur essentiel au rôle suppresseur de tumeur de la Cx43 dans les sarcomes d'Ewing. En effet, les deux effets majeurs de la Cx43 mis en évidence dans notre étude, à savoir la forte inhibition de la croissance de la tumeur primitive ainsi que de l'ostéolyse associée au développement tumoral, ne sont pas en faveur d'un développement métastatique dans notre modèle. De plus, nous avons également démontré *in vitro* par des tests de migration et d'invasion en utilisant des chambres de Boyden, que la surexpression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing A673 et TC71, inhibe d'environ 70% la migration et l'invasion de ces cellules tumorales (Figure 31). Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de la Cx43 associée à une restauration de la GJIC ne favoriserait pas la dissémination métastatique des sarcomes d'Ewing.

Ainsi, la Cx43 en inhibant à la fois les deux acteurs du cercle vicieux, la croissance tumorale et la résorption osseuse, pourrait être une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le traitement des sarcomes d'Ewing.

Conclusion Générale et Perspectives

L'importance physiologique des jonctions communicantes est incontestable. Ces structures jouent notamment un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le développement, le contrôle de l'apoptose, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Dans le contexte de la biologie de l'os, la Cx43 joue un rôle crucial dans le développement du squelette, et toute altération de l'expression des connexines ou de la communication jonctionnelle conduit au développement de pathologies osseuses. Ainsi, les objectifs de mes travaux de thèse ont été de comprendre l'implication de la Cx43 dans la physiologie et la physiopathologie osseuse.

La première partie de ces travaux de thèse a démontré que la présence de la Cx43 ainsi que la communication intercellulaire sont essentielles pour la différenciation des hMSC en ostéoblastes matures. Cependant, la nature des signaux diffusant à travers les jonctions gap, afin de réguler ce processus, reste encore à élucider.

Au vu du rôle important de la Cx43 dans la physiologie des hMSC ainsi que dans le remodelage osseux, la seconde partie de mon travail de thèse a porté sur l'implication de la Cx43 dans le développement de la seconde tumeur osseuse primitive, le sarcome d'Ewing, qui dériverait des hMSC. De nombreuses études ont montré que la tumorigenèse est fréquemment associée à une perte ou à une réduction de l'expression des connexines ainsi que de la communication jonctionnelle. Les travaux présentés dans cette seconde partie ont démontré le rôle crucial de la Cx43 dans le développement des sarcomes d'Ewing, en particulier durant la croissance de la tumeur primitive. Cette étude a notamment mis en évidence, dans un premier temps, une perte de l'expression de la Cx43 dans les cellules de sarcome d'Ewing induite par EWS-FLI1 via des mécanismes partiellement élucidés. De plus, nos résultats ont montré que l'expression de la Cx43 altère la croissance tumorale par un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1, résultant d'une augmentation de l'expression de p27. Pour finir, ces travaux ont également démontré que l'expression de la Cx43 joue un rôle essentiel dans le cercle vicieux, établi entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée de par sa capacité à inhiber l'activité ostéoclastique. La Cx43 en inhibant à la fois les deux acteurs du cercle vicieux pourrait être une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le traitement des sarcomes d'Ewing. Toutefois, afin de confirmer le rôle suppresseur de tumeur de la Cx43 dans les sarcomes d'Ewing, il est nécessaire de déterminer l'implication de cette connexine sur le potentiel métastatique de ces cellules tumorales.

Ce travail de thèse apporte une meilleure compréhension du rôle de la Cx43 dans la physiologie et la pathologie osseuse. Le rôle crucial des connexines dans l'apparition et le développement du phénotype tumorigénique fait de cette protéine une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, la restauration de

L'expression des connexines pourrait représenter une approche prometteuse dans l'inhibition de la croissance tumorale. Cependant, le fait que les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression des connexines dans les cellules tumorales ne soient pas totalement définis, constitue un des principaux obstacles au développement de cette stratégie. De plus, à l'heure actuelle, l'application clinique de la thérapie génique, qui permettrait de restaurer l'expression des connexines dans les cellules tumorales, présente encore des limites telles que la faible efficacité de transfection généralement observée.

De ce fait, des méthodes alternatives, permettant de restaurer la communication jonctionnelle entre les cellules tumorales, sont étudiées, en particulier, l'induction chimique de la production de connexines. Plusieurs composés naturels ou synthétiques, tels que l'AMPc, les glucocorticoïdes, les rétinoïdes et les caroténoïdes, sont connus pour augmenter l'expression des connexines dans diverses lignées cellulaires (Trosko and Ruch, 2002). De plus, des modulateurs épigénétiques de l'expression des gènes, comme les ADN méthyltransférases (DNMT) et les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC) sont également capables de réguler l'expression des connexines, et ont montré un potentiel anticancéreux (Reid *et al.*, 2002; Balakin *et al.*, 2007). Les HDAC, enzymes impliquées dans le remodelage de la chromatine, sont des cibles thérapeutiques anti-cancéreuses (Balakin *et al.*, 2007). De nombreux inhibiteurs des HDAC testés ont montré qu'au moins une partie de leurs effets étaient dépendants de la GJIC. Par exemple, le 4-phenylbutyrate, un inhibiteur des HDAC, augmente la communication jonctionnelle entre les cellules tumorales pancréatiques (Ammerpohl *et al.*, 2007). Il a également été montré que le traitement des cellules tumorales prostatiques avec un inhibiteur des HDAC, le Trichostatin A, restaurait l'expression de la Cx43 et la GJIC (Hernandez *et al.*, 2006). Par ailleurs, la méthylation aberrante de l'ADN constitue une autre cible dans la thérapie des cancers (Reid *et al.*, 2002) et plusieurs études ont montré un rôle de cette modification épigénétique dans la régulation de l'expression des gènes des connexines. En effet, la chute de l'expression de la Cx32 observée dans les cellules de carcinome rénal humain est due à une hyperméthylation de son promoteur. Dans cette même étude, il a également été démontré que l'agent déméthylant de l'ADN, 5-aza-2'-deoxycytidine, supprimait la croissance tumorale de carcinome rénal humain dans un modèle de xénogreffe, en restaurant l'expression de la Cx32 dans ces cellules tumorales (Hagiwara *et al.*, 2008). Une autre stratégie envisagée consiste à associer un modulateur de l'acétylation ou de la méthylation de l'ADN permettant de stimuler la transcription des connexines, avec un agent capable d'augmenter par phosphorylation la fonction des jonctions gap.

Par ailleurs, il a été découvert récemment que les miARN (micro-ARN) sont impliqués dans la régulation de l'expression des connexines. Ces petits ARN non codants sont des

régulateurs post-transcriptionnels capables d'éteindre l'expression d'un gène par leur hybridation séquence-spécifique à un ARNm cible. La Cx43 est notamment régulée négativement par le miR-1 et le miR-206 (Anderson *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Ainsi, la modulation de la fonction des miARN ciblant les ARNm des connexines peut affecter la GJIC. Cette découverte offre donc de nouvelles perspectives thérapeutiques tant dans le traitement des cancers que dans celui des maladies osseuses. En effet, des souris transgéniques surexprimant le miR-206 présentent une masse osseuse faible due à une inhibition de la différenciation ostéoblastique. La Cx43 étant une cible de ce miARN, la ré-expression de cette connexine dans des ostéoblastes exprimant le miR-206 restaure leur capacité à se différencier (Inose *et al.*, 2009). Ainsi, l'inhibition de l'expression des miARN pourrait représenter une stratégie thérapeutique dans le traitement des pathologies osseuses associées à une perte d'expression des connexines. Les miARN peuvent notamment être réprimés par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens, les « antagomirs » (Krützfeldt *et al.*, 2005). De plus, il a récemment été montré que l'expression de Dnd1 (Dead end 1), une protéine de liaison à l'ARN, inhibe la fonction de certains miARN, dont les miRNA-1 et miR-206, en empêchant leur liaison à leurs ARN cibles (Kedde *et al.*, 2007; Kandouz and Batist, 2010). Bien que l'état des connaissances actuelles sur les miARN doive encore être enrichi, ces derniers ayant démontré une efficacité dans de nombreux cas, l'utilisation des miARN est envisagée comme stratégie thérapeutique des cancers.

Les stratégies thérapeutiques actuelles utilisées en cancérologie sont malheureusement fréquemment associées à l'apparition d'une importante toxicité systémique. Ainsi, les recherches actuelles se concentrent sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques plus localisées, ciblant uniquement les cellules tumorales sans affecter les cellules saines environnantes. Dans ce contexte, l'utilisation de gènes suicides tels que le gène HSV-tk (herpes simplex virus-thymidine kinase) semble une approche prometteuse dans le traitement des tumeurs. Cette approche repose sur la transfection des cellules tumorales avec le gène HSV-tk, suivi d'un traitement systémique avec une pro-drogue, le ganciclovir (GCV). Une fois à l'intérieur de la cellule, le GCV va être spécifiquement phosphorylé par HSV-tk, formant ainsi la molécule GCV monophosphate, qui à son tour, sera phosphorylée par des kinases cellulaires en GCV triphosphate. Ces phosphorylations consécutives entraînent l'activation de la pro-drogue GCV en agent cytotoxique, qui par inhibition compétitive de l'incorporation du déoxyguanosine triphosphate dans l'ADN, conduit à l'apoptose des cellules transfectées (Mesnil and Yamasaki, 2000; Vinken *et al.*, 2006). Cependant, cette thérapie génique n'a pas eu pour l'instant l'effet escompté, dû principalement à une faible efficacité de la transfection

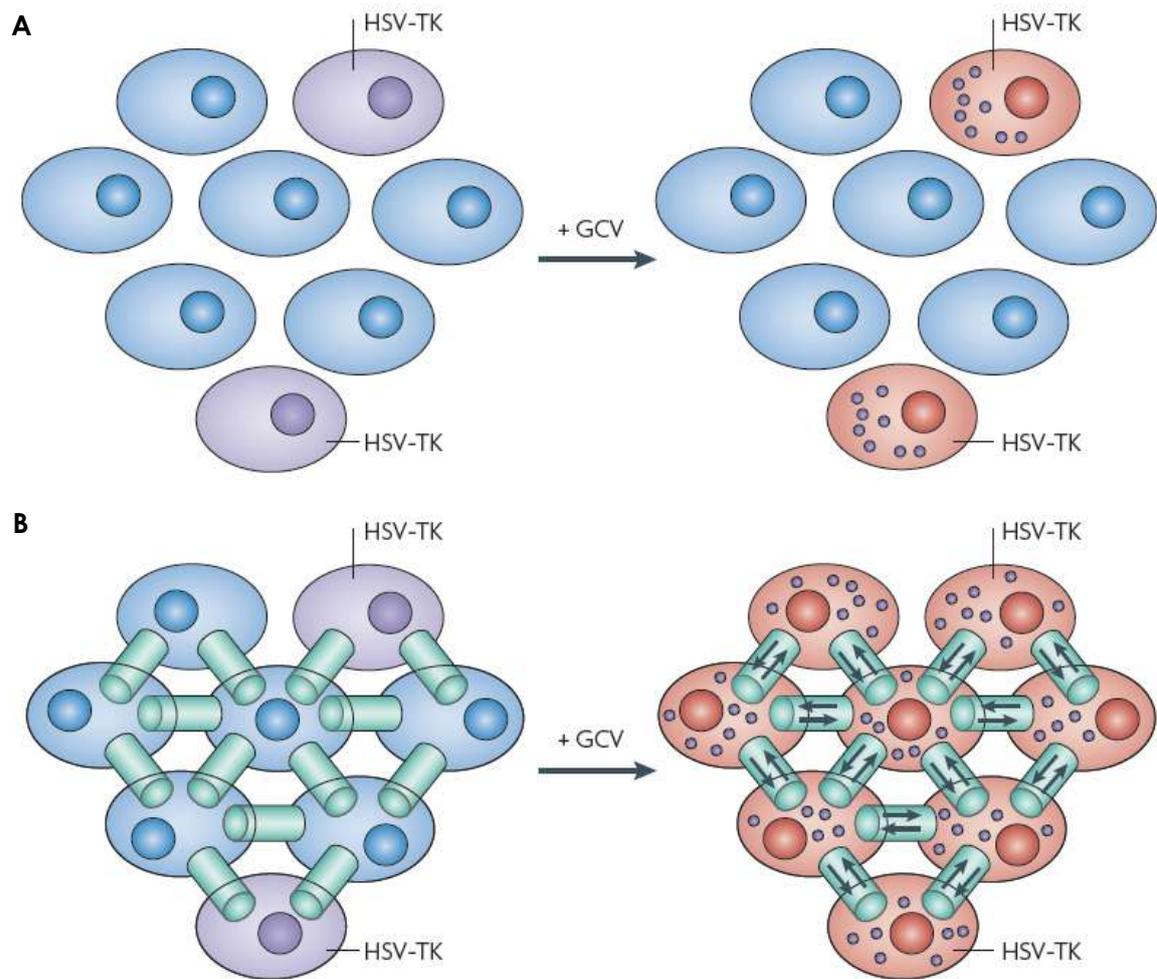


Figure 32 : Illustration du rôle des jonctions gap dans l'effet bystander

(d'après Naus and Laird, 2010)

Cette approche thérapeutique, dont l'objectif est de tuer les cellules cancéreuses, repose sur la transfection des cellules tumorales avec le gène HSV-tk, suivi d'un traitement systémique avec une pro-drogue, le ganciclovir (GCV). Sur ce schéma, seules les cellules en violet ont été efficacement transfectées avec le gène HSV-tk. **A)** En absence de GJIC, le traitement avec le GCV entraîne uniquement la mort des cellules (rouge) exprimant la protéine HSV-tk. La mort cellulaire est induite par l'activation de la pro-drogue GCV en agent cytotoxique (représenté par les points violets) via tout d'abord une phosphorylation par HSV-tk puis par des kinases cellulaires. **B)** Au contraire, en présence de GJIC fonctionnelle, la mort cellulaire est augmentée par la diffusion de l'agent cytotoxique des cellules transfectées vers les cellules adjacentes qui n'expriment pas la protéine HSV-tk.

intratumorale du gène suicide. Néanmoins, il s'est avéré fréquemment que la toxicité ne se limitait pas à la cellule transfectée mais atteignait également les cellules adjacentes. Ce phénomène est appelé l'effet de proximité ou « effet bystander ». Cet effet a notamment été corrélé au niveau de la GJIC encore présent dans les cellules tumorales. Ainsi, les jonctions communicantes favorisent l'effet bystander en permettant la diffusion de la molécule cytotoxique de GCV triphosphate depuis la cellule transfectée vers les cellules adjacentes, induisant leur mort (Figure 32). L'effet bystander permettrait ainsi d'obtenir une résorption complète de la tumeur sans nécessiter l'expression du gène suicide dans toutes les cellules tumorales (Mesnil and Yamasaki, 2000; Mesnil, 2004). Cependant, la GJIC est fréquemment absente ou très réduite dans les cellules tumorales. Ainsi, afin d'améliorer l'efficacité de la thérapie du gène suicide sur des tumeurs déficientes en GJIC, il est nécessaire de restaurer la communication jonctionnelle entre ces cellules tumorales, en transfectant simultanément le gène HSV-tk et le gène de la connexine (Nicholas *et al.*, 2003). Ce concept a notamment été démontré sur des cellules HeLa, qui présentent un niveau de GJIC très faible. Ainsi, la stratégie du gène suicide HSV-tk/GCV inefficace sur ces cellules, le devient lors de la transfection du gène de la Cx43 (Yamasaki *et al.*, 1999; Mesnil and Yamasaki, 2000). Par la suite, des agents capables d'augmenter la GJIC ainsi que l'expression des connexines ont été testés afin d'améliorer l'efficacité de cette stratégie. Par exemple, l'augmentation de la GJIC et de l'expression de la Cx43 par un traitement au 8-bromo-AMPC potentialise l'effet de la thérapie HSV-tk/GCV via l'effet bystander (Carystinos *et al.*, 1999). De même, l'association de la thérapie HSV-tk/GCV avec un traitement au 4-phenylbutyrate, un inhibiteur de HDAC augmentant l'expression de la Cx43, s'est avérée très efficace à induire la mort des cellules de gliomes (Ammerpohl *et al.*, 2004).

Ainsi, les jonctions communicantes pourraient donc améliorer l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques en permettant la diffusion de signaux pro-apoptotiques et également diminuer leur toxicité par l'utilisation de quantité plus faible de produits. Il a notamment été démontré que l'utilisation combinée du dibutyryl-AMPC et de l'acide tout-trans-rétinoïque augmente la chimiosensibilité des cellules de neuroblastome à la Doxorubicine, au Melphalan et au bis-chloronitrosourea, via une augmentation de la GJIC et de l'expression de la Cx43 (Carystinos *et al.*, 2001). De plus, la restauration de l'expression de la Cx43 dans des cellules de glioblastome humain supprime la tumorigénicité de ces cellules, et augmente leur sensibilité à plusieurs agents chimiothérapeutiques incluant l'Etoposide, le Paclitaxel (Taxol) et la Doxorubicine, via des mécanismes qui semblent indépendants de la GJIC (Huang *et al.*, 2001). Il a également été montré récemment que la surexpression de la

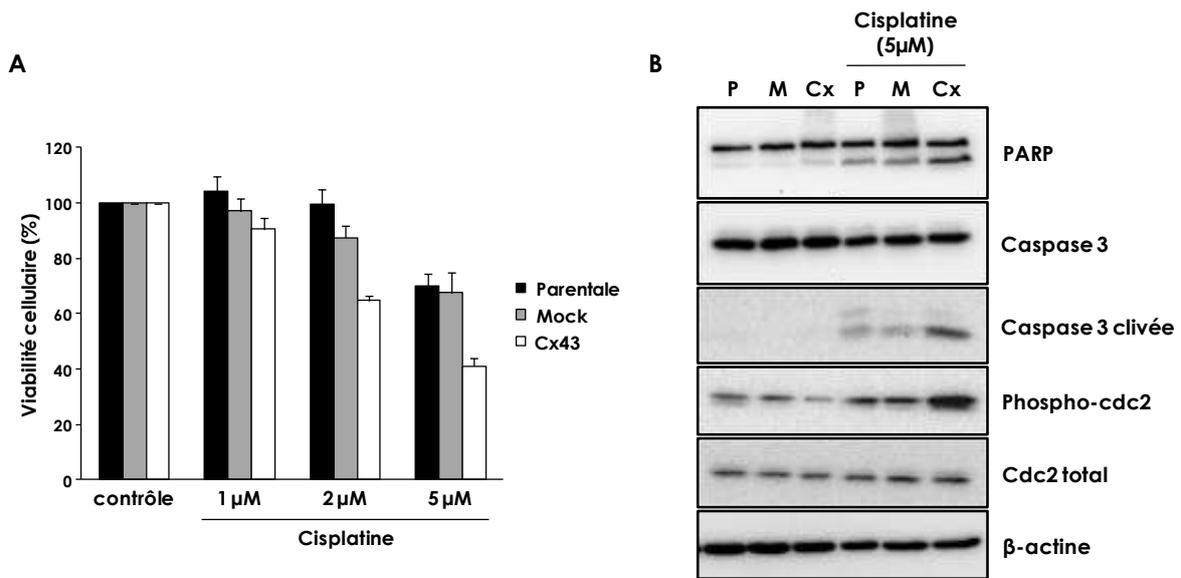


Figure 33 : La surexpression de la Cx43 dans des cellules de sarcome d'Ewing TC71 augmente la mort cellulaire induite par le Cisplatine

A) Les cellules de sarcome d'Ewing TC71 Parentale, Mock et surexprimant la Cx43 sontensemencées à 2000 cellules/puits en plaque 96 puits. Après adhésion des cellules, celles-ci sont traitées pendant 48h avec trois concentrations croissantes de Cisplatine (1 μ M, 2 μ M et 5 μ M). Au bout des 48h de traitement, la viabilité de ces cellules est évaluée par un test XTT. Le test colorimétrique XTT (Cell proliferation Kit II, Roche) est une technique non radioactive d'évaluation de la viabilité cellulaire, basée sur le clivage du sel de tétrazolium XTT en formazan par l'activité métabolique des cellules (activité déshydrogénase des mitochondries). Le formazan, soluble en solution aqueuse, est quantifiable par une mesure de la densité optique à 490 nm. Ce dosage nécessite le mélange de deux réactifs : le réactif de marquage XTT (sodium 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) et le réactif de couplage électronique à diluer au 1/50^{ème} dans le premier réactif. Ce test est réalisé par l'ajout de 50 μ l du mélange XTT dans chaque puits. Après une incubation des cellules à 37°C d'au minimum 2h, une lecture de la densité optique est effectuée à 490 nm.

B) Les cellules de sarcome d'Ewing TC71 Parentale, Mock et surexprimant la Cx43, ensemencées à 2×10^5 cellules/puits en plaque 6 puits, sont traitées pendant 48h avec 5 μ M de Cisplatine. Après lyse des cellules et dosage protéique, l'expression des protéines est évaluée par la technique de Western Blot décrite dans la partie « Matériels et Méthodes » de l'article 2).

Cx32 potentialise *in vitro* et *in vivo* la cytotoxicité induite par un traitement à la Vinblastine dans des cellules de carcinome rénal. Cet effet est dû au fait que la Cx32 augmente l'apoptose induite par la Vinblastine par une diminution de l'expression de la protéine MDR-1 (multidrug resistance gene-1) qui empêche normalement l'accumulation de la Vinblastine à l'intérieur des cellules (Sato *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'efficacité de certains agents chimiothérapeutiques est en partie attribuée à leur capacité à augmenter l'expression des connexines ainsi que la GJIC dans les cellules tumorales.

Au vu des résultats encourageants obtenus lors de la surexpression de la Cx43 sur le développement des sarcomes d'Ewing, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'effet de cette surexpression de la Cx43 sur la réponse des sarcomes d'Ewing aux agents de chimiothérapie, qui reste à l'heure actuelle encore insuffisante. Ainsi, dans le contexte du traitement des sarcomes d'Ewing, l'efficacité de quatre agents chimiothérapeutiques (le Cisplatine, la Doxorubicine, le Mafosfamide et le Méthotrexate) a été testée *in vitro* par un test XTT sur la viabilité des cellules tumorales TC71 en fonction de l'expression de la Cx43. Seule l'efficacité du Cisplatine a été fortement augmentée par la surexpression de la Cx43. Nos résultats présentés sur la figure 33A montrent que l'application de doses croissantes de Cisplatine induit la mort des cellules tumorales TC71 et que cet effet est augmenté par la surexpression de la Cx43. En effet, suite à un traitement de 48h à 5 μ M de Cisplatine, 70% des cellules tumorales TC71 Parentale et Mock sont encore vivantes contre seulement 40% des cellules TC71 surexprimant la Cx43. L'expression de la Cx43 sensibilise donc la réponse des cellules de sarcome d'Ewing au Cisplatine. Toutefois, afin de confirmer que cette sensibilisation à la chimiothérapie résulte bien de l'expression de la Cx43, des études complémentaires devront être réalisées :

1) d'une part, en surexprimant la Cx43 par transfection transitoire des cellules TC71 Parentales avec un vecteur d'expression pour la Cx43, et en évaluant si cette surexpression sensibilise également les cellules TC71 au Cisplatine.

2) d'autre part, à l'inverse, en réprimant l'expression de la Cx43 dans les cellules TC71 surexprimant cette connexine par transfection transitoire avec un siRNA anti-Cx43, et en déterminant si l'extinction de la Cx43 réverse les effets chimiosensibles observés précédemment.

De plus, il serait également intéressant de déterminer si l'augmentation de la sensibilité au Cisplatine des cellules de sarcome d'Ewing induite par la surexpression de la Cx43 est dépendante ou non de la GJIC. Cette hypothèse pourra être testée en évaluant *in vitro* la viabilité des cellules TC71 par un test XTT en présence ou non d'inhibiteurs de la GJIC afin de déterminer si la surexpression de la Cx43 est toujours capable de sensibiliser les cellules au Cisplatine en absence de GJIC. Par ailleurs, afin de comprendre les mécanismes

impliqués dans l'effet potentialisateur de la Cx43 sur la réponse au Cisplatine des cellules de sarcome d'Ewing, une étude de l'expression des protéines du cycle cellulaire et de l'apoptose a été réalisée par Western Blot. Nos résultats montrent que la surexpression de la Cx43 augmente l'apoptose des cellules induite par le Cisplatine, évaluée par le clivage de la caspase 3 et de PARP (poly ADP-ribose polymérase). De plus, cette augmentation de l'apoptose induite par la surexpression de la Cx43 s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de la protéine cdc2, suggérant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Figure 33B). Ce blocage du cycle cellulaire sera confirmé par une analyse FACS. La validation de ces résultats *in vivo* est actuellement en cours d'étude sur un modèle murin préclinique de sarcome d'Ewing induit en site para-osseux par injection intramusculaire de cellules tumorales TC71 surexprimant ou non la Cx43. Le traitement au Cisplatine (0,5 mg/kg) débute lorsque le volume tumoral atteint 200 mm³ et est réalisé une fois par semaine avec une injection intra-péritonéale.

Il serait également très intéressant d'évaluer sur des biopsies humaines de sarcome d'Ewing s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la Cx43 dans les sarcomes d'Ewing et la réponse à certains traitements chimiothérapeutiques. Si tel est le cas, alors le niveau d'expression de la Cx43 pourrait ainsi prédire la réponse des tumeurs à certains agents chimiothérapeutiques et par conséquent améliorer l'efficacité des traitements de ce cancer.

Annexe

Références Bibliographiques

- Ahmad, S., Diez, J.A., George, C.H., and Evans, W.H. (1999). Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem. J.* 339 (Pt 2), 247–253.
- Ahmad, S., and Evans, W.H. (2002). Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem. J.* 365, 693–699.
- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M., and Fishman, G.I. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 105, 161–171.
- Ammerpohl, O., Thormeyer, D., Khan, Z., Appelskog, I.B., Gojkovic, Z., Almqvist, P.M., and Ekström, T.J. (2004). HDACi phenylbutyrate increases bystander killing of HSV-tk transfected glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 8–14.
- Ammerpohl, O., Trauzold, A., Schniewind, B., Griep, U., Pilarsky, C., Grutzmann, R., Saeger, H.-D., Janssen, O., Sipos, B., Kloppel, G., *et al.* (2007). Complementary effects of HDAC inhibitor 4-PB on gap junction communication and cellular export mechanisms support restoration of chemosensitivity of PDAC cells. *Br. J. Cancer* 96, 73–81.
- Anderson, C., Catoe, H., and Werner, R. (2006). MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res.* 34, 5863–5871.
- Anzini, P., Neuberg, D.H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U., and Martini, R. (1997). Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J. Neurosci.* 17, 4545–4551.
- Arita, K., Akiyama, M., Tsuji, Y., McMillan, J.R., Eady, R.A.J., and Shimizu, H. (2002). Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1493–1500.
- Asamoto, M., Takahashi, S., Imaida, K., Shirai, T., and Fukushima, S. (1994). Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis* 15, 2163–2166.
- Atkinson, M.M., Lampe, P.D., Lin, H.H., Kollander, R., Li, X.R., and Kiang, D.T. (1995). Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 9), 3079–3090.
- Avanzo, J.L., Mesnil, M., Hernandez-Blazquez, F.J., Mackowiak, I.I., Mori, C.M.C., da Silva, T.C., Oloris, S.C.S., Gárate, A.P., Massironi, S.M.G., Yamasaki, H., *et al.* (2004). Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25, 1973–1982.
- Ayad, W.A., Locke, D., Koreen, I.V., and Harris, A.L. (2006). Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J. Biol. Chem.* 281, 16727–16739.
- Bailly, R.A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G., and Ghysdael, J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3230–3241.

- Balakin, K.V., Ivanenkov, Y.A., Kiselyov, A.S., and Tkachenko, S.E. (2007). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: latest developments, trends and medicinal chemistry perspective. *Anticancer Agents Med Chem* 7, 576–592.
- Batra, N., Kar, R., and Jiang, J.X. (2011). Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- Beauchamp, E., Bulut, G., Abaan, O., Chen, K., Merchant, A., Matsui, W., Endo, Y., Rubin, J.S., Toretsky, J., and Uren, A. (2009). GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 284, 9074–9082.
- Behrens, A., Haigh, J., Mechta-Grigoriou, F., Nagy, A., Yaniv, M., and Wagner, E.F. (2003). Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development* 130, 103–109.
- Benini, S., Zuntini, M., Manara, M.C., Cohen, P., Nicoletti, G., Nanni, P., Oh, Y., Picci, P., and Scotlandi, K. (2006). Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. *Int. J. Cancer* 119, 1039–1046.
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R.L., Schuck, A., Teot, L.A., and Juergens, H. (2006). Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 11, 503–519.
- Berthoud, V.M., Minogue, P.J., Guo, J., Williamson, E.K., Xu, X., Ebihara, L., and Beyer, E.C. (2003). Loss of function and impaired degradation of a cataract-associated mutant connexin50. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 209–221.
- Bertolotti, A., Lutz, Y., Heard, D.J., Chambon, P., and Tora, L. (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* 15, 5022–5031.
- Bevans, C.G., and Harris, A.L. (1999). Regulation of connexin channels by pH. Direct action of the protonated form of taurine and other aminosulfonates. *J. Biol. Chem.* 274, 3711–3719.
- van Bezooijen, R.L., ten Dijke, P., Papapoulos, S.E., and Löwik, C.W.G.M. (2005). SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 319–327.
- Bittman, K.S., and LoTurco, J.J. (1999). Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cereb. Cortex* 9, 188–195.
- Boissy, P., Malaval, L., and Jurdic, P. (2000). Ostéoblastes et ostéoclastes : une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques. *Hématologie.* 6, 6-16.
- Bonewald, L.F., and Johnson, M.L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42, 606–615.
- Bosco, D., Haefliger, J.-A., and Meda, P. (2011). Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol. Rev.* 91, 1393–1445.
- Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1–27.

- Bry, C., Maass, K., Miyoshi, K., Willecke, K., Ott, T., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2004). Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. *Dev. Biol.* 267, 418–429.
- Budunova, I.V., and Williams, G.M. (1994). Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 71–116.
- Bui, M.M., Han, G., Acs, G., Reed, D., Gonzalez, R.J., Pasha, T.L., and Zhang, P.J. (2011). Connexin 43 is a potential prognostic biomarker for ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Sarcoma* 2011, 971050.
- Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M.S., Müller-Tidow, C., and Richter, G.H.S. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 8, 1991–1996.
- Carystinos, G.D., Alaoui-Jamali, M.A., Phipps, J., Yen, L., and 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 Chemother. Pharmacol.* 47, 126–132.
- Carystinos, G.D., Katabi, M.M., Laird, D.W., Galipeau, J., Chan, H., Alaoui-Jamali, M.A., and Batist, G. (1999). Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* 5, 61–68.
- Castillero-Trejo, Y., Eliazar, S., Xiang, L., Richardson, J.A., and Ilaria, R.L., Jr (2005). Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res.* 65, 8698–8705.
- Cavazzana, A.O., Miser, J.S., Jefferson, J., and Triche, T.J. (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am. J. Pathol.* 127, 507–518.
- Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M.J., Malkinson, A.M., and Ruch, R.J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* 19, 61–67.
- Chambers, T.J., and Fuller, K. (1985). Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J. Cell. Sci.* 76, 155–165.
- Cherian, P.P., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L.F., Sprague, E., and Jiang, J.X. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol. Biol. Cell* 16, 3100–3106.
- Chow, J.W., Wilson, A.J., Chambers, T.J., and Fox, S.W. (1998). Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1760–1767.
- Chung, D.J., Castro, C.H.M., Watkins, M., Stains, J.P., Chung, M.Y., Szejnfeld, V.L., Willecke, K., Theis, M., and Civitelli, R. (2006). Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J. Cell. Sci.* 119, 4187–4198.

- Civitelli, R. (2008). Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* *473*, 188–192.
- Civitelli, R., Beyer, E.C., Warlow, P.M., Robertson, A.J., Geist, S.T., and Steinberg, T.H. (1993). Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J. Clin. Invest.* *91*, 1888–1896.
- Clair, C., Chalumeau, C., Tordjmann, T., Poggioli, J., Erneux, C., Dupont, G., and Combettes, L. (2001). Investigation of the roles of Ca(2+) and InsP(3) diffusion in the coordination of Ca(2+) signals between connected hepatocytes. *J. Cell. Sci.* *114*, 1999–2007.
- Cohen-Salmon, M., Ott, T., Michel, V., Hardelin, J.P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D.C., Wangemann, P., Willecke, K., *et al.* (2002). Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* *12*, 1106–1111.
- Condorelli, D.F., Parenti, R., Spinella, F., Trovato Salinaro, A., Belluardo, N., Cardile, V., and Cicirata, F. (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1202–1208.
- Constantin, B., and Cronier, L. (2000). Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int. Rev. Cytol.* *196*, 1–65.
- Cordonnier, T., Langonné, A., Corre, P., Renaud, A., Sensebé, L., Rosset, P., Layrolle, P., and Sohier, J. (2012). Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.*
- Cottrell, G.T., and Burt, J.M. (2005). Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1711*, 126–141.
- Cronier, L., Bastide, B., Hervé, J.C., Délèze, J., and Malassiné, A. (1994). Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* *135*, 402–408.
- Cronier, L., Crespin, S., Strale, P.-O., Defamie, N., and Mesnil, M. (2009). Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 323–338.
- Czyz, J. (2008). The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *13*, 92–102.
- Dang, X., Doble, B.W., and Kardami, E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* *242*, 35–38.
- Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V., Weissman, B.E., and Delattre, O. (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* *20*, 3258–3265.
- Davies, T.C., Barr, K.J., Jones, D.H., Zhu, D., and Kidder, G.M. (1996). Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* *18*, 234–243.
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 261–270.

- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., and Rouleau, G. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359, 162–165.
- Le Deley, M.-C., Delattre, O., Schaefer, K.-L., Burchill, S.A., Koehler, G., Hogendoorn, P.C.W., Lion, T., Poremba, C., Marandet, J., Ballet, S., *et al.* (2010). Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J. Clin. Oncol.* 28, 1982–1988.
- Délèze, J. (1975). The site of healing over after a local injury in the heart. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 5, 223–225.
- Desandes, E., Clavel, J., Berger, C., Bernard, J.-L., Blouin, P., de Lumley, L., Demeocq, F., Freycon, F., Gembara, P., Goubin, A., *et al.* (2004). Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* 43, 749–757.
- Donahue, H.J., Li, Z., Zhou, Z., and Yellowley, C.E. (2000). Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 278, C315–322.
- Doty, S.B. (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 33, 509–512.
- DuBois, S.G., Krailo, M.D., Lessnick, S.L., Smith, R., Chen, Z., Marina, N., Grier, H.E., and Stegmaier, K. (2009). Phase II study of intermediate-dose cytarabine in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 52, 324–327.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., *et al.* (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747–754.
- Duffy, H.S., Fort, A.G., and Spray, D.C. (2006). Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv Cardiol* 42, 1–17.
- Dupont, G., Combettes, L., and Leybaert, L. (2007). Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int. Rev. Cytol.* 261, 193–245.
- Duthe, F., Dupont, E., Verrecchia, F., Plaisance, I., Severs, N.J., Sarrouilhe, D., and Hervé, J.C. (2000). Dephosphorylation agents depress gap junctional communication between rat cardiac cells without modifying the Connexin43 phosphorylation degree. *Gen. Physiol. Biophys.* 19, 441–449.
- Eferl, R., Hoebertz, A., Schilling, A.F., Rath, M., Karreth, F., Kenner, L., Amling, M., and Wagner, E.F. (2004). The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J.* 23, 2789–2799.
- Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859–868.

- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., and Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805–817.
- Elzarrad, M.K., Haroon, A., Willecke, K., Dobrowolski, R., Gillespie, M.N., and Al-Mehdi, A.-B. (2008). Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med* 6, 20.
- Esiashvili, N., Goodman, M., and Marcus, R.B., Jr (2008). Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 30, 425–430.
- Evans, W.H., De Vuyst, E., and Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem. J.* 397, 1–14.
- Falk, M.M., Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1994). Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J. Cell Biol.* 127, 343–355.
- Fallon, R.F., and Goodenough, D.A. (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J. Cell Biol.* 90, 521–526.
- Fischbeck, K.H., Abel, A., Lin, G.S., and Scherer, S.S. (1999). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease and connexin32. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 883, 36–41.
- Fladmark, K.E., Gjertsen, B.T., Molven, A., Mellgren, G., Vintermyr, O.K., and Døskeland, S.O. (1997). Gap junctions and growth control in liver regeneration and in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 25, 847–855.
- Foote, C.I., Zhou, L., Zhu, X., and Nicholson, B.J. (1998). The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140, 1187–1197.
- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 235, 176–190.
- Frendo, J.-L., Cronier, L., Bertin, G., Guibourdenche, J., Vidaud, M., Evain-Brion, D., and Malassine, A. (2003). Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J. Cell. Sci.* 116, 3413–3421.
- Fukuma, M., Okita, H., Hata, J.-I., and Umezawa, A. (2003). Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 22, 1–9.
- Furshpan, E.J., and Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol. (Lond.)* 145, 289–325.
- Gabriel, H.D., Jung, D., Bützler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., and Willecke, K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140, 1453–1461.
- Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P.C., Kinsey, M., Haroldsen, S.C., Shah, A.A., Boucher, K.M., Watkins, W.S., Jorde, L.B., Graves, B.J., *et al.* (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10149–10154.

- Garber, S.A., Fernstrom, M.J., Stoner, G.D., and Ruch, R.J. (1997). Altered gap junctional intercellular communication in neoplastic rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis* 18, 1149–1153.
- Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyan, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V.N., Komm, B.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., *et al.* (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* 280, 33132–33140.
- Geimonen, E., Jiang, W., Ali, M., Fishman, G.I., Garfield, R.E., and Andersen, J. (1996). Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 23667–23674.
- Gemel, J., Valiunas, V., Brink, P.R., and Beyer, E.C. (2004). Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. *J. Cell. Sci.* 117, 2469–2480.
- Genetos, D.C., Kephart, C.J., Zhang, Y., Yellowley, C.E., and Donahue, H.J. (2007). Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J. Cell. Physiol.* 212, 207–214.
- Geng, S., Sun, B., Liu, S., and Wang, J. (2007). Up-regulation of connexin 43 and gap junctional intercellular communication by Coleusin Factor is associated with growth inhibition in rat osteosarcoma UMR106 cells. *Cell Biol. Int.* 31, 1420–1427.
- Giachelli, C.M., and Steitz, S. (2000). Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 19, 615–622.
- Giepman, B.N., Verlaan, I., and Moolenaar, W.H. (2001). Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun. Adhes.* 8, 219–223.
- Glass, D.A., 2nd, and Karsenty, G. (2006). Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr. Top. Dev. Biol.* 73, 43–84.
- Glimcher, M.J. (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect* 36, 49–69.
- Glowacki, J., Rey, C., Glimcher, M.J., Cox, K.A., and Lian, J. (1991). A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 45, 292–302.
- Goldberg, G.S., Moreno, A.P., and Lampe, P.D. (2002). Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* 277, 36725–36730.
- González, I., Vicent, S., de Alava, E., and Lecanda, F. (2007). EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J. Mol. Med.* 85, 1015–1029.
- Goodall, H., and Maro, B. (1986). Major loss of junctional coupling during mitosis in early mouse embryos. *J. Cell Biol.* 102, 568–575.
- Goodenough, D.A. (1992). The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin. Cell Biol.* 3, 49–58.
- Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002576.

- Govindarajan, R., Chakraborty, S., Johnson, K.E., Falk, M.M., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., and Mehta, P.P. (2010). Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 4089–4107.
- Gramsch, B., Gabriel, H.D., Wiemann, M., Grümmner, R., Winterhager, E., Bingmann, D., and Schirmacher, K. (2001). Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp. Cell Res.* 264, 397–407.
- Grano, M., Mori, G., Minielli, V., Cantatore, F.P., Colucci, S., and Zallone, A.Z. (2000). Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 1097–1100.
- Grigoriadis, A.E., Schellander, K., Wang, Z.Q., and Wagner, E.F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.* 122, 685–701.
- Grimston, S.K., Brodt, M.D., Silva, M.J., and Civitelli, R. (2008). Attenuated response to in vivo mechanical loading in mice with conditional osteoblast ablation of the connexin43 gene (*Gja1*). *J. Bone Miner. Res.* 23, 879–886.
- Grohar, P.J., Woldemichael, G.M., Griffin, L.B., Mendoza, A., Chen, Q.-R., Yeung, C., Currier, D.G., Davis, S., Khanna, C., Khan, J., *et al.* (2011). Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 962–978.
- Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T.A., and Väänänen, H.K. (2005). Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 1095–1101.
- Guillon, N., Tirode, F., Boeva, V., Zynovyev, A., Barillot, E., and Delattre, O. (2009). The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS ONE* 4, e4932.
- Guisse, T.A., Yin, J.J., Taylor, S.D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B.F., Yoneda, T., and Mundy, G.R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.* 98, 1544–1549.
- Hagiwara, H., Sato, H., Ohde, Y., Takano, Y., Seki, T., Ariga, T., Hokaiwado, N., Asamoto, M., Shirai, T., Nagashima, Y., *et al.* (2008). 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses human renal carcinoma cell growth in a xenograft model via up-regulation of the connexin 32 gene. *Br. J. Pharmacol.* 153, 1373–1381.
- Hahm, K.B., Cho, K., Lee, C., Im, Y.H., Chang, J., Choi, S.G., Sorensen, P.H., Thiele, C.J., and Kim, S.J. (1999). Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat. Genet.* 23, 222–227.
- Halvorson, K.G., Sevcik, M.A., Ghilardi, J.R., Rosol, T.J., and Mantyh, P.W. (2006). Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin J Pain* 22, 587–600.
- Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 120–143.

- Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafrafi, M.D., Doleman, S.E., and Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* 261, 12665–12674.
- Hernandez, M., Shao, Q., Yang, X.-J., Luh, S.-P., Kandouz, M., Batist, G., Laird, D.W., and Alaoui-Jamali, M.A. (2006). A histone deacetylation-dependent mechanism for transcriptional repression of the gap junction gene cx43 in prostate cancer cells. *Prostate* 66, 1151–1161.
- Hervé, J.-C., Bourmeyster, N., and Sarrouilhe, D. (2004). Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1662, 22–41.
- Hervé, J.-C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D., Giepmans, B.N.G., and Bourmeyster, N. (2011). Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- Hervé, J.C., Pluciennik, F., Verrecchia, F., Bastide, B., Delage, B., Joffre, M., and Délèze, J. (1996). Influence of the molecular structure of steroids on their ability to interrupt gap junctional communication. *J. Membr. Biol.* 149, 179–187.
- van der Heyden, M.A., Rook, M.B., Hermans, M.M., Rijksen, G., Boonstra, J., Defize, L.H., and Destrée, O.H. (1998). Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 12), 1741–1749.
- Heymann, D., and Lepreux, S. (2008). *Histologie - Bases fondamentales : Le tissu osseux*. OmniScience, ed. 7, 205-230.
- Hirai, A., Yano, T., Nishikawa, K., Suzuki, K., Asano, R., Satoh, H., Hagiwara, K., and Yamasaki, H. (2003). Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell. *Am. J. Nephrol.* 23, 172–177.
- Höber, R. (1936). The permeability of red blood corpuscles to organic anions. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 7, 367–391.
- Holleville, N., Matéos, S., Bontoux, M., Bollerot, K., and Monsoro-Burq, A.-H. (2007). Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev. Biol.* 304, 860–874.
- Hopperstad, M.G., Srinivas, M., and Spray, D.C. (2000). Properties of gap junction channels formed by Cx46 alone and in combination with Cx50. *Biophys. J.* 79, 1954–1966.
- Huang, H.-Y., Illei, P.B., Zhao, Z., Mazumdar, M., Huvos, A.G., Healey, J.H., Wexler, L.H., Gorlick, R., Meyers, P., and Ladanyi, M. (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J. Clin. Oncol.* 23, 548–558.
- Huang, R.P., Fan, Y., Hossain, M.Z., Peng, A., Zeng, Z.L., and Boynton, A.L. (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* 58, 5089–5096.
- Huang, R.P., Hossain, M.Z., Huang, R., Gano, J., Fan, Y., and Boynton, A.L. (2001). Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* 92, 130–138.
- Huang, R.P., Hossain, M.Z., Sehgal, A., and Boynton, A.L. (1999). Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70, 21–24.

- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E., and Triche, T.J. (2005a). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 65, 8984–8992.
- Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D.E., and Triche, T.J. (2005b). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 65, 4633–4644.
- Hunter, G.K., and Goldberg, H.A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem. J.* 302 (Pt 1), 175–179.
- Hunter, G.K., Hauschka, P.V., Poole, A.R., Rosenberg, L.C., and Goldberg, H.A. (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* 317 (Pt 1), 59–64.
- Iacobas, D.A., Urban-Maldonado, M., Iacobas, S., Scemes, E., and Spray, D.C. (2003). Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol. Genomics* 15, 177–190.
- Ilvesaro, J., Tavi, P., and Tuukkanen, J. (2001). Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord* 2, 10.
- Ilvesaro, J., and Tuukkanen, J. (2003). Gap-junctional regulation of osteoclast function. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 13, 133–146.
- Ilvesaro, J., Väänänen, K., and Tuukkanen, J. (2000). Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J. Bone Miner. Res.* 15, 919–926.
- Inose, H., Ochi, H., Kimura, A., Fujita, K., Xu, R., Sato, S., Iwasaki, M., Sunamura, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., *et al.* (2009). A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20794–20799.
- Ishida, M., and Amano, S. (2004). Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* 22, 415–429.
- Jamakošmanović, A., and Loewenstein, W.R. (1968). Intercellular communication and tissue growth. 3. Thyroid cancer. *J. Cell Biol.* 38, 556–561.
- Jamieson, S., Going, J.J., D'Arcy, R., and George, W.D. (1998). Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J. Pathol.* 184, 37–43.
- Jiang, H., Jin, Y., Bu, L., Zhang, W., Liu, J., Cui, B., Kong, X., and Hu, L. (2003). A novel mutation in GJA3 (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. *Mol. Vis.* 9, 579–583.
- Jochum, W., David, J.P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk, H., Jr, Matsuo, K., and Wagner, E.F. (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* 6, 980–984.
- John, S.A., and Revel, J.P. (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1312–1318.

- Johnson, R.G., Meyer, R.A., Li, X.-R., Preus, D.M., Tan, L., Grunenwald, H., Paulson, A.F., Laird, D.W., and Sheridan, J.D. (2002). Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Exp. Cell Res.* 275, 67–80.
- Jongen, W.M., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., Takeichi, M., and Yamasaki, H. (1991). Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 114, 545–555.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., and Laird, D.W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell. Sci.* 114, 763–773.
- Kanczuga-Koda, L., Sulkowski, S., Koda, M., Skrzydlewska, E., and Sulkowska, M. (2005). Connexin 26 correlates with Bcl-xL and Bax proteins expression in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 11, 1544–1548.
- Kandouz, M., and Batist, G. (2010). Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 681–692.
- Kanno, Y., and Loewenstein, W.R. (1964). Intercellular diffusion. *Science* 143, 959–960.
- Kanno, Y., and Matsui, Y. (1968). Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium. *Nature* 218, 775–776.
- Kapur, N., Mignery, G.A., and Banach, K. (2007). Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 292, C1510–1518.
- Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., and Hiraoka, M. (2002). Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32, 165–174.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A.F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273–1286.
- Van Kempen, M.J., Vermeulen, J.L., Moorman, A.F., Gros, D., Paul, D.L., and Lamers, W.H. (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc. Res.* 32, 886–900.
- Kenner, L., Hoebertz, A., Beil, F.T., Beil, T., Keon, N., Karreth, F., Eferl, R., Scheuch, H., Szremska, A., Amling, M., *et al.* (2004). Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J. Cell Biol.* 164, 613–623.
- Kidder, G.M., and Mhawi, A.A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123, 613–620.
- Kim, S., Denny, C.T., and Wisdom, R. (2006). Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2467–2478.
- King, T.J., Fukushima, L.H., Donlon, T.A., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A., and Bertram, J.S. (2000a). Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21, 311–315.

- King, T.J., Fukushima, L.H., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A., Sakr, W.A., and Bertram, J.S. (2000b). 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.
- Koffler, L., Roshong, S., Kyu Park, I., Cesen-Cummings, K., Thompson, D.C., Dwyer-Nield, L.D., Rice, P., Mamay, C., Malkinson, A.M., and Ruch, R.J. (2000). Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 79, 347–354.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.
- Koo, S.K., Kim, D.Y., Park, S.D., Kang, K.W., and Joe, C.O. (1997). PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 167, 41–49.
- Koval, M., Harley, J.E., Hick, E., and Steinberg, T.H. (1997). Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J. Cell Biol.* 137, 847–857.
- Kovar, H. (2010). Downstream EWS/FLI1 - upstream Ewing's sarcoma. *Genome Med* 2, 8.
- Kovar, H., Aryee, D.N., Jug, G., Henöckl, C., Schemper, M., Delattre, O., Thomas, G., and Gardner, H. (1996). EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ.* 7, 429–437.
- Kovar, H., Jug, G., Aryee, D.N., Zoubek, A., Ambros, P., Gruber, B., Windhager, R., and Gardner, H. (1997). Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15, 2225–2232.
- Kren, B.T., Kumar, N.M., Wang, S.Q., Gilula, N.B., and Steer, C.J. (1993). Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. *J. Cell Biol.* 123, 707–718.
- Krüger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., and Willecke, K. (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127, 4179–4193.
- Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.M., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C., and Yamasaki, H. (1994). Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int. J. Cancer* 56, 87–94.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with "antagomirs." *Nature* 438, 685–689.
- Krysko, D.V., Leybaert, L., Vandenabeele, P., and D'Herde, K. (2005). Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis* 10, 459–469.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127, 3501–3512.

- Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 767–776.
- Kurzrock, R., Patnaik, A., Aisner, J., Warren, T., Leong, S., Benjamin, R., Eckhardt, S.G., Eid, J.E., Greig, G., Habben, K., *et al.* (2010). A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 16, 2458–2465.
- Ladenstein, R., Pötschger, U., Le Deley, M.C., Whelan, J., Paulussen, M., Oberlin, O., van den Berg, H., Dirksen, U., Hjorth, L., Michon, J., *et al.* (2010). Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol.* 28, 3284–3291.
- Laing, J.G., and Beyer, E.C. (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26399–26403.
- Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394, 527–543.
- Laird, D.W., Fistouris, P., Batist, G., Alpert, L., Huynh, H.T., Carystinos, G.D., and Alaoui-Jamali, M.A. (1999). Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* 59, 4104–4110.
- Laird, D.W., Puranam, K.L., and Revel, J.P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273(Pt 1), 67–72.
- Lambert, G., Bertrand, J.R., Fattal, E., Subra, F., Pinto-Alphandary, H., Malvy, C., Auclair, C., and Couvreur, P. (2000). EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 401–406.
- Lamiche, C., Clarhaut, J., Strale, P.-O., Crespin, S., Pedretti, N., Bernard, F.-X., Naus, C.C., Chen, V.C., Foster, L.J., Defamie, N., *et al.* (2012). The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 29, 111–122.
- Lampe, P.D., Kurata, W.E., Warn-Cramer, B.J., and Lau, A.F. (1998). Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 6), 833–841.
- Lampe, P.D., and Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1171–1186.
- Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C., and Falk, M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10446–10451.
- Lecanda, F., Towler, D.A., Ziambaras, K., Cheng, S.L., Koval, M., Steinberg, T.H., and Civitelli, R. (1998). Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 2249–2258.
- Lecanda, F., Warlow, P.M., Sheikh, S., Furlan, F., Steinberg, T.H., and Civitelli, R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J. Cell Biol.* 151, 931–944.

- Leithe, E., and Rivedal, E. (2004). Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 50089–50096.
- Lessnick, S.L., Braun, B.S., Denny, C.T., and May, W.A. (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10, 423–431.
- Levin, M. (2005). Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech. Dev.* 122, 3–25.
- Li, X., McGee-Lawrence, M.E., Decker, M., and Westendorf, J.J. (2010). The Ewing's sarcoma fusion protein, EWS-FLI, binds Runx2 and blocks osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 111, 933–943.
- Li, Z., Zhou, Z., Yellowley, C.E., and Donahue, H.J. (1999). Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone* 25, 661–666.
- Lian, J.B., Stein, G.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Hassan, M.Q., Gaur, T., Lengner, C.J., and Young, D.W. (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 1–16.
- Lim, P.K., Bliss, S.A., Patel, S.A., Taborga, M., Dave, M.A., Gregory, L.A., Greco, S.J., Bryan, M., Patel, P.S., and Rameshwar, P. (2011). Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* 71, 1550–1560.
- Lin, P.P., Wang, Y., and Lozano, G. (2011). Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma* 2011,.
- Liu, C.-L., Huang, Y.-S., Hosokawa, M., Miyashita, K., and Hu, M.-L. (2009). Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chem. Biol. Interact.* 182, 165–172.
- Loewenstein, W.R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* 560, 1–65.
- Loewenstein, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61, 829–913.
- Loewenstein, W.R., and Kanno, Y. (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209, 1248–1249.
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y., and Ito, S. (1966). Permeability of nuclear membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 137, 708–716.
- Loo, L.W., Berestecky, J.M., Kanemitsu, M.Y., and Lau, A.F. (1995). pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J. Biol. Chem.* 270, 12751–12761.
- Machwate, M., Jullienne, A., Moukhtar, M., Lomri, A., and Marie, P.J. (1995a). c-fos protooncogene is involved in the mitogenic effect of transforming growth factor-beta in osteoblastic cells. *Mol. Endocrinol.* 9, 187–198.

- Machwate, M., Jullienne, A., Moukhtar, M., and Marie, P.J. (1995b). Temporal variation of c-Fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing rat bone. *J. Cell. Biochem.* *57*, 62–70.
- Mackintosh, C., Madoz-Gúrpide, J., Ordóñez, J.L., Osuna, D., and Herrero-Martín, D. (2010). The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 655–667.
- Maestrini, E., Korge, B.P., Ocaña-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P., and Munro, C.S. (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1237–1243.
- Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C., and Goodenough, D.A. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* *74*, 629–645.
- Manara, M.C., Landuzzi, L., Nanni, P., Nicoletti, G., Zambelli, D., Lollini, P.L., Nanni, C., Hofmann, F., García-Echeverría, C., Picci, P., *et al.* (2007). Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1322–1330.
- Marec-Bérard, P., Chotel, F., and Claude, L. (2010). [PNET/Ewing tumours: current treatments and future perspectives]. *Bull Cancer* *97*, 707–713.
- Marie, P.J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* *473*, 98–105.
- Martinez, A.D., Hayrapetyan, V., Moreno, A.P., and Beyer, E.C. (2002). Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ. Res.* *90*, 1100–1107.
- Marziano, N.K., Casalotti, S.O., Portelli, A.E., Becker, D.L., and Forge, A. (2003). Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 805–812.
- Massey, H.M., and Flanagan, A.M. (1999). Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br. J. Haematol.* *106*, 167–170.
- Matsumura, K., Mayama, T., Lin, H., Sakamoto, Y., Ogawa, K., and Imanaga, I. (2006). Effects of cyclic AMP on the function of the cardiac gap junction during hypoxia. *Exp Clin Cardiol* *11*, 286–293.
- May, W.A., Gishizky, M.L., Lessnick, S.L., Lunsford, L.B., Lewis, B.C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G., and Denny, C.T. (1993a). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 5752–5756.
- May, W.A., Lessnick, S.L., Braun, B.S., Klemsz, M., Lewis, B.C., Lunsford, L.B., Hromas, R., and Denny, C.T. (1993b). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 7393–7398.
- Mehta, P.P., Perez-Stable, C., Nadji, M., Mian, M., Asotra, K., and Roos, B.A. (1999). Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev. Genet.* *24*, 91–110.

- Menteyne, A., Burdakov, A., Charpentier, G., Petersen, O.H., and Cancela, J.-M. (2006). Generation of specific Ca²⁺ signals from Ca²⁺ stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr. Biol.* *16*, 1931–1937.
- Mesnil, M. (2004). [Gap junctions and cancer: implications and perspectives]. *Med Sci (Paris)* *20*, 197–206.
- Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J.-L., and Zaidan-Dagli, M.-L. (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* *1719*, 125–145.
- Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Elfgang, C., Traub, O., Willecke, K., and Yamasaki, H. (1995). Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res.* *55*, 629–639.
- Mesnil, M., and Yamasaki, H. (1993). Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis. *Mol. Carcinog.* *7*, 14–17.
- Mesnil, M., and Yamasaki, H. (2000). Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* *60*, 3989–3999.
- Milks, L.C., Kumar, N.M., Houghten, R., Unwin, N., and Gilula, N.B. (1988). Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* *7*, 2967–2975.
- Mitchell, J.A., and Lye, S.J. (2001). Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun. Adhes.* *8*, 299–302.
- Mitchell, J.A., and Lye, S.J. (2005). Differential activation of the connexin 43 promoter by dimers of activator protein-1 transcription factors in myometrial cells. *Endocrinology* *146*, 2048–2054.
- Momiyama, M., Omori, Y., Ishizaki, Y., Nishikawa, Y., Tokairin, T., Ogawa, J., and Enomoto, K. (2003). Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci.* *94*, 501–507.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2000). Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* *96*, 917–924.
- Moorby, C., and Patel, M. (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp. Cell Res.* *271*, 238–248.
- Moreno, A.P. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochim. Biophys. Acta* *1711*, 164–171.
- Morita, M., Higuchi, C., Moto, T., Kozuka, N., Susuki, J., Itofusa, R., Yamashita, J., and Kudo, Y. (2003). Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Neurosci.* *23*, 10944–10952.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17–29.

- Nakatani, F., Tanaka, K., Sakimura, R., Matsumoto, Y., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T., and Iwamoto, Y. (2003). Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J. Biol. Chem.* 278, 15105–15115.
- Nanes, M.S. (2003). Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321, 1–15.
- Naus, C.C., Bechberger, J.F., Caveney, S., and Wilson, J.X. (1991). Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* 126, 33–36.
- Naus, C.C., and Laird, D.W. (2010). Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 435–441.
- Navarro, S., González-Devesa, M., Ferrández-Izquierdo, A., Triche, T.J., and Llombart-Bosch, A. (1990). Scanning electron microscopic evidence for neural differentiation in Ewing's sarcoma cell lines. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416, 383–391.
- Neville-Webbe, H.L., Evans, C.A., Coleman, R.E., and Holen, I. (2006). Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cells in vitro. *Tumour Biol.* 27, 92–103.
- Nicholas, T.W., Read, S.B., Burrows, F.J., and Kruse, C.A. (2003). Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol. Histopathol.* 18, 495–507.
- Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., and Revel, J.P. (1987). Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 329, 732–734.
- Nicholson, G.C., Malakellis, M., Collier, F.M., Cameron, P.U., Holloway, W.R., Gough, T.J., Gregorio-King, C., Kirkland, M.A., and Myers, D.E. (2000). Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin. Sci.* 99, 133–140.
- Noble, B.S. (2008). The osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 106–111.
- Odri, G.A., Dumoucel, S., Picarda, G., Battaglia, S., Lamoureux, F., Corradini, N., Rousseau, J., Tirode, F., Laud, K., Delattre, O., *et al.* (2010). Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res.* 70, 7610–7619.
- Ohno, T., Ouchida, M., Lee, L., Gatalica, Z., Rao, V.N., and Reddy, E.S. (1994). The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 9, 3087–3097.
- Olbina, G., and Eckhart, W. (2003). Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol. Cancer Res.* 1, 690–700.
- Oliveira, R., Christov, C., Guillamo, J.S., de Boüard, S., Palfi, S., Venance, L., Tardy, M., and Peschanski, M. (2005). Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol.* 6, 7.

- Olmos, D., Postel-Vinay, S., Molife, L.R., Okuno, S.H., Schuetze, S.M., Paccagnella, M.L., Batzel, G.N., Yin, D., Pritchard-Jones, K., Judson, I., *et al.* (2010). Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol.* *11*, 129–135.
- Omori, Y., and 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.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* *10*, 63–76.
- Oyamada, M., Krutovskikh, V.A., Mesnil, M., Partensky, C., Berger, F., and Yamasaki, H. (1990). Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43. *Mol. Carcinog.* *3*, 273–278.
- Oyamada, M., Oyamada, Y., and Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochim. Biophys. Acta* *1719*, 6–23.
- Pacifici, R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* *139*, 2659–2661.
- Pahujaa, M., Anikin, M., and Goldberg, G.S. (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp. Cell Res.* *313*, 4083–4090.
- Palumbo, C. (1986). A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.* *246*, 125–131.
- Paulson, A.F., Lampe, P.D., Meyer, R.A., TenBroek, E., Atkinson, M.M., Walseth, T.F., and Johnson, R.G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J. Cell. Sci.* *113 (Pt 17)*, 3037–3049.
- Paznekas, W.A., Boyadjiev, S.A., Shapiro, R.E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C.E., Innis, J.W., Dinulos, M.B., Christian, C., Hannibal, M.C., *et al.* (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 408–418.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J.J., Khosla, S., and Oursler, M.J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 20764–20769.
- Penn, R.D. (1966). Ionic communication between liver cells. *J. Cell Biol.* *29*, 171–174.
- Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta* *1662*, 61–80.
- Peracchia, C., Wang, X.G., and Peracchia, L.L. (2000). Slow gating of gap junction channels and calmodulin. *J. Membr. Biol.* *178*, 55–70.
- Perkins, G.A., Goodenough, D.A., and Sosinsky, G.E. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* *277*, 171–177.

- Pfeilschifter, J., and Mundy, G.R. (1987). Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2024–2028.
- de Pina-Benabou, M.H., Szostak, V., Kyrozis, A., Rempe, D., Uziel, D., Urban-Maldonado, M., Benabou, S., Spray, D.C., Federoff, H.J., Stanton, P.K., *et al.* (2005). Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. *Stroke* 36, 2232–2237.
- Plante, I., Stewart, M.K.G., Barr, K., Allan, A.L., and Laird, D.W. (2011). Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30, 1681–1692.
- Plotkin, L.I., Lezcano, V., Thostenson, J., Weinstein, R.S., Manolagas, S.C., and Bellido, T. (2008). Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1712–1721.
- Plotkin, L.I., Manolagas, S.C., and Bellido, T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 8648–8657.
- Pluciennik, F., Verrecchia, F., Bastide, B., Hervé, J.C., Joffre, M., and Délèze, J. (1996). Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J. Membr. Biol.* 149, 169–177.
- Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., and Segretain, D. (2010). Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 365, 1607–1620.
- Potratz, J., Jürgens, H., Craft, A., and Dirksen, U. (2012). Ewing sarcoma: biology-based therapeutic perspectives. *Pediatr Hematol Oncol* 29, 12–27.
- Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P., and Delattre, O. (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7275–7283.
- Qin, H., Shao, Q., Curtis, H., Galipeau, J., Belliveau, D.J., Wang, T., Alaoui-Jamali, M.A., and Laird, D.W. (2002). Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J. Biol. Chem.* 277, 29132–29138.
- Rackauskas, M., Neverauskas, V., and Skeberdis, V.A. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)* 46, 1–12.
- Rao, V.N., Ohno, T., Prasad, D.D., Bhattacharya, G., and Reddy, E.S. (1993). Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Flt-1 protein. *Oncogene* 8, 2167–2173.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., and Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831–1834.
- Reid, G.K., Besterman, J.M., and MacLeod, A.R. (2002). Selective inhibition of DNA methyltransferase enzymes as a novel strategy for cancer treatment. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 130–137.

- Revel, J.P., and Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7–C12.
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, M.-L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., and Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 65, 11459–11468.
- Riggi, N., and Stamenkovic, I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett.* 254, 1–10.
- Riggi, N., Suvà, M.-L., Suvà, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.-M., Stehle, J.-C., Baumer, K., Kindler, V., *et al.* (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 68, 2176–2185.
- Risek, B., and Gilula, N.B. (1991). Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy. *Development* 113, 165–181.
- Robertson, J.D. (1963). The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell Biol.* 19, 201–221.
- Robling, A.G., Castillo, A.B., and Turner, C.H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 8, 455–498.
- Rochefort, G.Y., Pallu, S., and Benhamou, C.L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21, 1457–1469.
- Rodan, G.A. (1992). Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1, S3–6.
- Rodríguez-Galindo, C., Navid, F., Liu, T., Billups, C.A., Rao, B.N., and Krasin, M.J. (2008). Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann. Oncol.* 19, 814–820.
- Rorie, C.J., and Weissman, B.E. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res.* 64, 7288–7295.
- Rosselló, R.A., Wang, Z., Kizana, E., Krebsbach, P.H., and Kohn, D.H. (2009). Connexin 43 as a signaling platform for increasing the volume and spatial distribution of regenerated tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13219–13224.
- Rousselle, A.-V., and Heymann, D. (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 30, 533–540.
- Ruch, R.J., Porter, S., Koffler, L.D., Dwyer-Nield, L.D., and Malkinson, A.M. (2001). Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp. Lung Res.* 27, 231–243.
- Sabatikos, G., Sims, N.A., Chen, J., Aoki, K., Kelz, M.B., Amling, M., Bouali, Y., Mukhopadhyay, K., Ford, K., Nestler, E.J., *et al.* (2000). Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat. Med.* 6, 985–990.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., and Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359–1400.

- Sáez, J.C., Schalper, K.A., Retamal, M.A., Orellana, J.A., Shoji, K.F., and Bennett, M.V.L. (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp. Cell Res.* 316, 2377–2389.
- Saito, T., Nishimura, M., Kudo, R., and Yamasaki, H. (2001). Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int. J. Cancer* 93, 317–323.
- Saito, T., Sato, H., Virgona, N., Hagiwara, H., Kashiwagi, K., Suzuki, K., Asano, R., and Yano, T. (2007). Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer Lett.* 253, 249–257.
- Saito-Katsuragi, M., Asada, H., Niizeki, H., Katoh, F., Masuzawa, M., Tsutsumi, M., Kuniyasu, H., Ito, A., Nojima, H., and Miyagawa, S. (2007). Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* 110, 1162–1172.
- Sanches, D.S., Pires, C.G., Fukumasu, H., Cogliati, B., Matsuzaki, P., Chaible, L.M., Torres, L.N., Ferrigno, C.R.A., and Dagli, M.L.Z. (2009). Expression of connexins in normal and neoplastic canine bone tissue. *Vet. Pathol.* 46, 846–859.
- Sato, H., Senba, H., Virgona, N., Fukumoto, K., Ishida, T., Hagiwara, H., Negishi, E., Ueno, K., Yamasaki, H., and Yano, T. (2007). Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells. *Mol. Carcinog.* 46, 215–224.
- Sauer, H., Hofmann, C., Wartenberg, M., Wobus, A.M., and Hescheler, J. (1998). Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp. Cell Res.* 238, 13–22.
- Sauer, H., Sharifpanah, F., Hatry, M., Steffen, P., Bartsch, C., Heller, R., Padmasekar, M., Howaldt, H.-P., Bein, G., and Wartenberg, M. (2011). NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap-junctional coupling. *J. Cell. Physiol.* 226, 1642–1650.
- Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B.A., and Howard, G.A. (2001a). Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28, 362–369.
- Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B.A., and Howard, G.A. (2001b). Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone* 28, 38–44.
- Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Brambilla, R., Roos, B.A., and Howard, G.A. (2001c). Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 14133–14138.
- Schiller, P.C., Mehta, P.P., Roos, B.A., and Howard, G.A. (1992). Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol. Endocrinol.* 6, 1433–1440.
- Schilling, A.F., Filke, S., Lange, T., Gebauer, M., Brink, S., Baranowsky, A., Zustin, J., and Amling, M. (2008). Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2497–2504.

- Schleiden, M.J. (1938). Beitrage zur phyto-genesis. In Muller Arch. Anat. Physiol. Wiss. Medic. 137-176.
- Scotlandi, K., Maini, C., Manara, M.C., Benini, S., Serra, M., Cerisano, V., Strammiello, R., Baldini, N., Lollini, P.-L., Nanni, P., *et al.* (2002). Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther.* 9, 296–307.
- Shirakabe, K., Terasawa, K., Miyama, K., Shibuya, H., and Nishida, E. (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* 6, 851–856.
- Siller-Jackson, A.J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, L.F., Sprague, E., and Jiang, J.X. (2008). Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J. Biol. Chem.* 283, 26374–26382.
- Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G.E. (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell Biol.* 67, 863–885.
- Sims, N.A., and Gooi, J.H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 444–451.
- Singh, D., and Lampe, P.D. (2003). Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun. Adhes.* 10, 215–220.
- Sirnes, S., Kjenseth, A., Leithe, E., and Rivedal, E. (2009). Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 41–45.
- Söhl, G., Nielsen, P.A., Eiberger, J., and Willecke, K. (2003). Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Commun. Adhes.* 10, 27–36.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62, 228–232.
- Solan, J.L., Fry, M.D., TenBroek, E.M., and Lampe, P.D. (2003). Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J. Cell. Sci.* 116, 2203–2211.
- Sonnemann, J., Eckervogt, V., Truckenbrod, B., Boos, J., Winkelmann, W., and van Valen, F. (2003). The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs* 14, 767–771.
- Sosinsky, G. (1995). Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9210–9214.
- Sotkis, A., Wang, X.G., Yasumura, T., Peracchia, L.L., Persechini, A., Rash, J.E., and Peracchia, C. (2001). Calmodulin colocalizes with connexins and plays a direct role in gap junction channel gating. *Cell Commun. Adhes.* 8, 277–281.
- Spyropoulos, D.D., Pharr, P.N., Lavenburg, K.R., Jackers, P., Papas, T.S., Ogawa, M., and Watson, D.K. (2000). Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5643–5652.

- Stains, J.P., and Civitelli, R. (2005a). Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75, 72–80.
- Stains, J.P., and Civitelli, R. (2005b). Cell-to-cell interactions in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 721–727.
- Stains, J.P., and Civitelli, R. (2005c). Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1719, 69–81.
- Stains, J.P., and Civitelli, R. (2005d). Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. *Mol. Biol. Cell* 16, 64–72.
- Stains, J.P., Lecanda, F., Screen, J., Towler, D.A., and Civitelli, R. (2003). Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. *J. Biol. Chem.* 278, 24377–24387.
- Stein, L.S., Boonstra, J., and Burghardt, R.C. (1992). Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. *Exp. Cell Res.* 198, 1–7.
- Stork, P.J.S., and Schmitt, J.M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258–266.
- Sun, S., Liu, Y., Lipsky, S., and Cho, M. (2007). Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB J.* 21, 1472–1480.
- Swaminathan, R. (2001). Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta* 313, 95–105.
- Talbot, J., and Verrecchia, V. (2012). Communication intercellulaire et remodelage osseux. *Biologie Aujourd'hui.* 206, 125-134.
- Tacheau, C., Fontaine, J., Loy, J., Mauviel, A., and Verrecchia, F. (2008a). TGF-beta induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epithelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 217, 759–768.
- Tacheau, C., Laboureau, J., Mauviel, A., and Verrecchia, F. (2008b). TNF-alpha represses connexin43 expression in HaCat keratinocytes via activation of JNK signaling. *J. Cell. Physiol.* 216, 438–444.
- Tai, G., Polak, J.M., Bishop, A.E., Christodoulou, I., and Bittery, L.D.K. (2004). Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng.* 10, 1456–1466.
- Tanabe, N., Ito-Kato, E., Suzuki, N., Nakayama, A., Ogiso, B., Maeno, M., and Ito, K. (2004). IL-1alpha affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci.* 75, 2317–2327.
- Tanaka, K., Iwakuma, T., Harimaya, K., Sato, H., and Iwamoto, Y. (1997). EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J. Clin. Invest.* 99, 239–247.
- Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., and Lim, S.S. (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1555–1568.

- Tang, B., Peng, Z.-H., Yu, P.-W., Yu, G., and Qian, F. (2011). Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med. Oncol.* 28, 502–508.
- Taylor, R., Knowles, H.J., and Athanasou, N.A. (2011). Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 225, 195–202.
- Teitell, M.A., Thompson, A.D., Sorensen, P.H., Shimada, H., Triche, T.J., and Denny, C.T. (1999). EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab. Invest.* 79, 1535–1543.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* 7, 713–716.
- Temme, A., Ott, T., Dombrowski, F., and Willecke, K. (2000). The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin32 expressing gap junctions. *J. Hepatol.* 32, 627–635.
- Temme, A., Stümpel, F., Söhl, G., Rieber, E.P., Jungermann, K., Willecke, K., and Ott, T. (2001). Dilated bile canaliculi and attenuated decrease of nerve-dependent bile secretion in connexin32-deficient mouse liver. *Pflugers Arch.* 442, 961–966.
- TenBroek, E.M., Lampe, P.D., Solan, J.L., Reynhout, J.K., and Johnson, R.G. (2001). Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J. Cell Biol.* 155, 1307–1318.
- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., and Martin, G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99–105.
- Teunissen, B.E.J., and Bierhuizen, M.F.A. (2004). Transcriptional control of myocardial connexins. *Cardiovasc. Res.* 62, 246–255.
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 457–475.
- Thi, M.M., Kojima, T., Cowin, S.C., Weinbaum, S., and Spray, D.C. (2003). Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 284, C389–403.
- Tintut, Y., Parhami, F., Le, V., Karsenty, G., and Demer, L.L. (1999). Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 28875–28879.
- Tirole, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11, 421–429.
- Todorova, M.G., Soria, B., and Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J. Cell. Physiol.* 214, 354–362.
- Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., and Gabriel, A. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.* 148, 1-13.

- Toretzky, J.A., Erkizan, V., Levenson, A., Abaan, O.D., Parvin, J.D., Cripe, T.P., Rice, A.M., Lee, S.B., and Uren, A. (2006). Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res.* 66, 5574–5581.
- Toretzky, J.A., Kalebic, T., Blakesley, V., LeRoith, D., and Helman, L.J. (1997). The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 30822–30827.
- Torres, L.N., Matera, J.M., Vasconcellos, C.H., Avanzo, J.L., Hernandez-Blazquez, F.J., and Dagli, M.L.Z. (2005). Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. *Vet. Pathol.* 42, 633–641.
- Trexler, E.B., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Bargiello, T.A., and Verselis, V.K. (1999). Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J. Gen. Physiol.* 113, 721–742.
- Trosko, J.E., and Ruch, R.J. (2002). Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Drug Targets* 3, 465–482.
- Tsai, H., Werber, J., Davia, M.O., Edelman, M., Tanaka, K.E., Melman, A., Christ, G.J., and Geliebter, J. (1996). Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 64–69.
- Turner, C.H., and Pavalko, F.M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 3, 346–355.
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., and Yeager, M. (1997). Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 39–43.
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., and Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283, 1176–1180.
- Urschel, S., Höher, T., Schubert, T., Alev, C., Söhl, G., Wörsdörfer, P., Asahara, T., Dermietzel, R., Weiler, R., and Willecke, K. (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between All amacrine cells. *J. Biol. Chem.* 281, 33163–33171.
- Valiunas, V., Doronin, S., Valiuniene, L., Potapova, I., Zuckerman, J., Walcott, B., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Brink, P.R., and Cohen, I.S. (2004). Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J. Physiol. (Lond.)* 555, 617–626.
- Vander Molen, M.A., Rubin, C.T., McLeod, K.J., McCauley, L.K., and Donahue, H.J. (1996). Gap junctional intercellular communication contributes to hormonal responsiveness in osteoblastic networks. *J. Biol. Chem.* 271, 12165–12171.
- Vay, L., Hernández-Sanmiguel, E., Santo-Domingo, J., Lobatón, C.D., Moreno, A., Montero, M., and Alvarez, J. (2007). Modulation of Ca²⁺ release and Ca²⁺ oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial Ca²⁺ uniporter stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* 580, 39–49.
- Verrecchia, F., Duthe, F., Duval, S., Duchatelle, I., Sarrouilhe, D., and Herve, J.C. (1999). ATP counteracts the rundown of gap junctional channels of rat ventricular myocytes by promoting protein phosphorylation. *J. Physiol. (Lond.)* 516 (Pt 2), 447–459.

- Verrecchia, F., and Hervé, J. (1997a). Reversible inhibition of gap junctional communication by tamoxifen in cultured cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* 434, 113–116.
- Verrecchia, F., and Hervé, J.C. (1997b). Reversible inhibition of gap junctional communication elicited by several classes of lipophilic compounds in cultured rat cardiomyocytes. *Can J Cardiol* 13, 1093–1100.
- Villars, F., Guillotin, B., Amédée, T., Dutoya, S., Bordenave, L., Bareille, R., and Amédée, J. (2002). Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 282, C775–785.
- Vinken, M., Decrock, E., De Vuyst, E., Ponsaerts, R., D'hondt, C., Bultynck, G., Ceelen, L., Vanhaecke, T., Leybaert, L., and Rogiers, V. (2011). Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochim. Biophys. Acta* 1815, 13–25.
- Vinken, M., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Snykers, S., Henkens, T., and Rogiers, V. (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell. Signal.* 18, 592–600.
- Wai, D.H., Schaefer, K.-L., Schramm, A., Korsching, E., Van Valen, F., Ozaki, T., Boecker, W., Schweigerer, L., Dockhorn-Dworniczak, B., and Poremba, C. (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int. J. Oncol.* 20, 441–451.
- Watkins, M., Grimston, S.K., Norris, J.Y., Guillotin, B., Shaw, A., Beniash, E., and Civitelli, R. (2011). Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. *Mol. Biol. Cell* 22, 1240–1251.
- Wei, C.-J., Francis, R., Xu, X., and Lo, C.W. (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19925–19936.
- Wei, C.-J., Xu, X., and Lo, C.W. (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 811–838.
- Weidmann, S. (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 118, 348–360.
- Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U.H., and Millán, J.L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1879–1888.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., and Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383, 725–737.
- Willecke, K., Jungbluth, S., Dahl, E., Hennemann, H., Heynkes, R., and Grzeschik, K.H. (1990). Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 275–280.
- Wittrant, Y., Théoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D., and Rédini, F. (2004). RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 49–57.
- Wittrant, Y., Theoleyre, S., Couillaud, S., Dunstan, C., Heymann, D., and Rédini, F. (2003). Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 774–778.

- Wolvetang, E.J., Pera, M.F., and Zuckerman, K.S. (2007). Gap junction mediated transport of shRNA between human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 610–615.
- Woods, N.M., Cuthbertson, K.S., and Cobbold, P.H. (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319, 600–602.
- Wu, X., McKenna, M.A., Feng, X., Nagy, T.R., and McDonald, J.M. (2003). Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 144, 5545–5555.
- Yamasaki, H., and Naus, C.C. (1996). Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 17, 1199–1213.
- Yamasaki, H., Omori, Y., Krutovskikh, V., Zhu, W., Mironov, N., Yamakage, K., and Mesnil, M. (1999). Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found. Symp.* 219, 241–254; discussion 254–260.
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., *et al.* (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* 13, 486–491.
- Yang, D.-C., Tsay, H.-J., Lin, S.-Y., Chiou, S.-H., Li, M.-J., Chang, T.-J., and Hung, S.-C. (2008). cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoS ONE* 3, e1540.
- Yano, T., Ito, F., Kobayashi, K., Yonezawa, Y., Suzuki, K., Asano, R., Hagiwara, K., Nakazawa, H., Toma, H., and Yamasaki, H. (2004). Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. *Cancer Lett.* 208, 137–142.
- Yeager, M., and Gilula, N.B. (1992). Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J. Mol. Biol.* 223, 929–948.
- Yeager, M., and Harris, A.L. (2007). Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 521–528.
- Yeager, M., and Nicholson, B.J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 183–192.
- Yellowley, C.E., Li, Z., Zhou, Z., Jacobs, C.R., and Donahue, H.J. (2000). Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 15, 209–217.
- Zhang, J.T., and Nicholson, B.J. (1994). The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J. Membr. Biol.* 139, 15–29.
- Zhang, W., DeMattia, J.A., Song, H., and Couldwell, W.T. (2003a). Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J. Neurosurg.* 98, 846–853.
- Zhang, W., Nwagwu, C., Le, D.M., Yong, V.W., Song, H., and Couldwell, W.T. (2003b). Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. *J. Neurosurg.* 99, 1039–1046.
- Zhang, X., Zou, T., Liu, Y., and Qi, Y. (2006). The gating effect of calmodulin and calcium on the connexin50 hemichannel. *Biol. Chem.* 387, 595–601.

- Zhang, Y.-W., Kaneda, M., and Morita, I. (2003c). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J. Biol. Chem.* 278, 44852–44856.
- Zhang, Y.W., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K.W., and Murota, S. (2001). Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20, 4138–4149.
- Zhang, Y.-W., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., and Morita, I. (2003d). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res.* 63, 1623–1630.
- Zhang, Z.Q., Zhang, W., Wang, N.Q., Bani-Yaghoub, M., Lin, Z.X., and Naus, C.C. (1998). Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis* 19, 1889–1894.
- Zhao, W., Han, H.-B., and Zhang, Z.-Q. (2011). Suppression of lung cancer cell invasion and metastasis by connexin43 involves the secretion of follistatin-like 1 mediated via histone acetylation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1459–1468.
- Zhou, Z., Guan, H., Duan, X., and Kleinerman, E.S. (2005). Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 104, 1713–1720.
- Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T.H., and Civitelli, R. (1998). Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 13, 218–228.
- Zimmer, D.B., Green, C.R., Evans, W.H., and Gilula, N.B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J. Biol. Chem.* 262, 7751–7763.
- Zwerner, J.P., and May, W.A. (2001). PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 20, 626–633.

RÔLE DE LA CONNEXINE 43 DANS L'OSTÉOGENÈSE ET DANS LE DÉVELOPPEMENT TUMORAL DES SARCOMES D'EWING

Mots clés : communication intercellulaire, Cx43, cellules souches mésenchymateuses, différenciation ostéoblastique, sarcome d'Ewing, croissance tumorale, ostéolyse

Les jonctions communicantes sont des structures membranaires constituées de canaux intercellulaires, permettant le transfert direct de molécules informatives entre cellules adjacentes. La principale connexine (Cx) du tissu osseux, la Cx43 (protéine constitutive des canaux intercellulaires) joue un rôle crucial dans le développement du squelette. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été de comprendre l'implication de la Cx43 dans la physiopathologie osseuse.

La première partie de ces travaux a démontré que la Cx43 et la communication intercellulaire sont essentielles pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en ostéoblastes matures. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au rôle de la Cx43 dans le développement des sarcomes d'Ewing. Cette tumeur osseuse primitive est caractérisée par la présence d'un facteur de transcription aberrant, EWS-FLI1, aux propriétés oncogéniques. Nos résultats ont mis en évidence que la perte d'expression de la Cx43 dans les sarcomes d'Ewing joue un rôle essentiel dans le développement de la tumeur primitive, de par la capacité de la Cx43 à inhiber la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée.

Ce travail de thèse apporte une meilleure compréhension du rôle de la Cx43 dans la physiologie et la pathologie osseuse. Le rôle clé de la Cx43 dans le développement du phénotype tumorigénique des sarcomes d'Ewing fait de cette protéine une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le traitement de ce cancer.

ROLE OF CONNEXIN 43 IN OSTEOGENESIS AND IN THE DEVELOPMENT OF EWING'S SARCOMA

Keywords: intercellular communication, Cx43, mesenchymal stem cells, osteoblast differentiation, Ewing's sarcoma, tumor growth, osteolysis

Gap junctions are specialized plasma membrane structures composed of intercellular channels which allow the direct transfer of informative molecules between adjacent cells. The major connexin (Cx) of bone tissue, Cx43 (a constitutive protein of intercellular channels) plays a crucial role in skeletal development. Thus, the aim of my thesis was to better understand the involvement of Cx43 in the physiopathology of bone.

The first part of this work shows that Cx43 expression and intercellular communication are essential for the differentiation of human mesenchymal stem cells into mature osteoblasts. In the second part of this thesis, we studied the role of Cx43 in the development of Ewing's sarcoma. This primary bone tumor is characterized by the presence of an aberrant transcription factor, EWS-FLI1, with oncogenic properties. Our results show that Cx43 plays an essential role in primary tumor development, and loss of Cx43 expression in Ewing's sarcoma leads to a stimulation of tumor growth and associated bone osteolysis.

This thesis provides a better understanding of the role of Cx43 in bone physiology and pathology. The key role of Cx43 in the development of the tumorigenic phenotype of Ewing's sarcoma permits to consider this protein as a new therapeutic target in cancer therapy.