

Université de Tlemcen

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et  
de l'Univers*

*Département de biologie*  
**Spécialité : Sciences biologiques**

**Thèse**

Présentée par

**BERRAHOUI Samira**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de doctorat**

*Thème*

*Impact de la connexine 43 sur la migration et la  
polarisation cellulaires*  
*(Etude in vitro)*

**Jury**

<b>Présidente :</b> Merzouk Hafida.	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examinatrice :</b> Dali-Sahi Majda.	Professeur	Université de Tlemcen.
<b>Examinatrice :</b> Belkacem Nafissa.	MCA	Université de Sidi Bel Abbès
<b>Examineur :</b> Burgo Andrea.	MCA	Université de Paris Evry
<b>Directrice de thèse :</b> Saker Meriem.	Professeur	Université de Tlemcen

## Table des Matières

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I- Gap jonctions ou Jonctions communicantes.....	5
I-1 Structure et propriétés.....	5
I-2 Rôles physiologiques et physiopathologiques.....	7
II-Les connexines.....	8
II-1 Structure, topologie et propriétés.....	8
II-2 Rôles dans les conditions physiologiques et physiopathologiques.....	12
II-4 Régulation du cycle de vie des connexines.....	17
II-6 Interaction de la connexine Cx43 avec la tubuline/microtubule.....	20
III- Les connexines et la migration cellulaire.....	26
III-1 Role de Cx43 dans la migration cellulaire.....	26
III-2 Role du C-ter de Cx43 dans la migration cellulaire.....	30
III-3 Role de la phosphorylation de Cx43 et son C-ter dans la migration cellulaire.....	33
IV- La connexine Cx43 et le cancer.....	35
VOLET 1.....	39
Etude de l'impact de la phosphorylation et de l'interaction.....	39
du C-ter de Cx43 avec la tubuline/microtubules.....	39
sur la migration cellulaire.....	39
Etude <i>in vitro</i> .....	39
I- MATERIELS ET METHODES.....	40
1- Construction des plasmides.....	42
2- Techniques de clonage.....	47
3- Méthodes de culture cellulaire.....	51
4- Méthodes d'immunofluorescence.....	53
5- Méthodes de l'étude de la perméabilité cellulaire.....	55
6- Méthodes de l'étude de la migration cellulaire.....	57
7- Analyse des images et vidéos.....	58
9- Recherche de signature moléculaire spécifique.....	60
II- RESULTAS.....	61
1- Expression et localisation des mutants Cx43 longueur complète des peptides C-ter dans les cellules HeLa, MDCK et NRK.....	61
2- Impact de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur la perméabilité des gap jonctions.....	65
3- Effets de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur l'organisation du réseau de microtubules.....	69

4- Effets de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur la migration cellulaire .....	71
VOLET 2.....	92
Repositionnement de médicaments .....	92
pour cibler Cx43 dans la thérapie du cancer .....	92
Etude <i>in silico</i> .....	92
I- MATERIELS ET METHODES .....	95
1- Recherche du récepteur et des ligands .....	95
2- Screening virtuel .....	95
3- Simulation de dynamique moléculaire.....	95
II- RESULTATS .....	97
1- Docking moléculaire.....	97
2- Simulations de dynamique moléculaire .....	98
III- DISCUSSION .....	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	109

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> Représentation schématique de la structure de la connexine, du connexon, et du canal de gap jonction .....	6
<b>Figure 2</b> Représentation schématique de Cx43 indiquant sa topologie.....	9
<b>Figure 3</b> Sites de phosphorylation de Cx43.....	12
<b>Figure 4</b> : Structure et Cycle de vie de la connexine Cx43 .....	16
<b>Figure 5</b> : Cx43 interagit <i>in vitro</i> avec les microtubules via la région juxtamembranaire de son C-ter.....	21
<b>Figure 6</b> : Analyse par RMN de l'interaction K26D-tubuline/microtubule .....	23
<b>Figure 7</b> : Représentations schématiques des peptides K26D et K26D-P dérivés du domaine de liaison de la Cx43 humaine à la tubuline .....	24
<b>Figure 8</b> : Le transport des connexons de Cx43 se fait dans des vésicules qui se déplacent le long des microtubules.....	25
<b>Figure 9</b> : Role de Cx43 dans la migration radiale des cellules neuronales chez la souris .....	28
<b>Figure 10</b> : Impact de Cx43 sur la vitesse de la migration cellulaire ainsi que sur la polarisation des cellules, démontré par l'approche du « wound healing » .....	32
<b>Figure 11</b> : Schéma représentant l'expression de Cx43 et sa phosphorylation au niveau de la peau humaine dans des conditions normales et dans des conditions de blessure .....	34
<b>Figure 12</b> : Représentations schématiques de Cx43 et ses isoformes mutés.....	45
<b>Figure 13</b> : Représentations schématiques des peptides C-ter de Cx43 .....	46
<b>Figure 14</b> : Séquestration des microtubules dans la membrane plasmique lorsque les protéines régulatrices de microtubules Op18/stathmine, SCG10 et RB3 sont fusionnées au peptide CD2 des lymphocytes T.....	47
<b>Figure 15</b> : Technique d'étude de la perméabilité cellulaire des gap jonctions inspirée de la technique du « Parachute » (Preloading assay).....	57
<b>Figure 16</b> : Protocole expérimental pour l'étude de la migration cellulaire par la technique du « Wound healing » (Réparation de la plaie).....	59
<b>Figure 17</b> : Localisation de Cx43wt et les différentes formes mutantes ainsi que les peptides tronqués dérivés du C-ter de Cx43 dans les cellules HeLa .....	62
<b>Figure 18</b> : Expression et localisation de la protéine Cx43wt dans les cellules HeLa et les cellules NRK .....	63

<b>Figure 19:</b> Distribution et localisation des protéines Cx43wt et ses formes mutantes longueur complète dans les cellules NRK.....	64
<b>Figure 20:</b> Distribution et localisation des deux peptides dérivés du domaine C-ter de Cx43 dans les cellules HeLa et les cellules NRK.....	65
<b>Figure 21:</b> Test de la fonctionnalité des gap jonctions par la méthode du “Parachute” (Preloading assay) sur les cellules HeLa et NRK transfectées par le plasmide Cx43wt.....	67
<b>Figure 22:</b> Test de la fonctionnalité des gap jonctions par la méthode du “Parachute” ou (Preloading assay) sur les cellules NRK transfectées par les plasmids codant les peptides tronqués C-ter.....	68
<b>Figure 23:</b> Effets des mutations R239A et Y247A sur l’organisation du réseau de microtubules dans les cellules NRK .....	70
<b>Figure 24:</b> Effets de la surexpression des peptides C-ter sur l’organisation du réseau de microtubules dans les cellules NRK.....	71
<b>Figure 25:</b> Représentation schématique de la Cx43 humaine et du peptide K26D dérivé du domaine de liaison Cx43 à la tubuline .....	95
<b>Figure 26:</b> Interactions des composés sélectionnés avec le domaine C-terminal de Cx43. ....	98
<b>Figure 27:</b> Graphiques RMSD.....	99
<b>Figure 28:</b> Graphiques Rg .....	100
<b>Figure 29:</b> Graphiques des liaisons hydrogènes .....	101

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> La communication intercellulaire via les gap jonctions de Cx43 dans les cellules NRK .....	69
<b>Tableau 2:</b> Impact de Cx43 et ses isoformes sur les paramètres de la migration cellulaire ( témoin : cellules non transfectées) .....	73
<b>Tableau 3:</b> Impact de Cx43 et ses isoformes sur les paramètres de la migration cellulaire (témoin : cellules surexprimant la Cx43wt) .....	73
<b>Tableau 4:</b> Composés retenus après analyse de l'amarrage moléculaire.....	97

## Liste des abréviations

**AC** : AntiCorps

**BET** : Bromure d'ETHidium

**BSA** : Bovine Serum Albumin

**CGJ** : Canaux de Gap Junctions

**Ct-228** : C-ter commençant à l'acide aminé 228

**Ct-234** : C-ter commençant à l'acide aminé 234

**Ct-234M** : C-ter commençant à l'acide aminé 234 et adressé à la membrane

**C-ter** : Extrémité C-terminale

**Cx** : Connexine

**Cx43** : Connexine43

**Cx43R239A** : Cx43 portant une substitution de l'arginine 239 en alanine

**Cx43S262A** : Cx43 portant une substitution de la sérine 262 en alanine

**Cx43S368A** : Cx43 portant une substitution de la sérine 368 en alanine

**Cx43wt** : Cx43 wild type (sauvage)

**Cx43Y247A** : Cx43 portant une substitution de la tyrosine 247 en alanine

**DM** : Dynamique Moléculaire

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Meduim

**DMSO** : DiMéthylSulfOxyde

**dNTP** : désoxyriboNucléoside TriPhosphate

**FAD** : Food Drug Administration

**FBS** : Fœtal Bovine Serum

**FM** : Full Meduim (milieu complet)

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**GJ** : Gap Junctions

**GjA1** : gène Gap junction protein Alpha 1

**HeLa** : Lignée cellulaire immortalisée prélevée de cellules cancéreuses sur la patiente

Henrietta Lacks en 1951

**I** : Isoleucine

**Iaire** : Primaire

**IIaire** : Secondaire

**K** : Lysine

**L** : Leucine

**LB** : Lysogeny Broth (bouillon lysogène)  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**MDCK** : Madin-Darby Canine Kidney cells  
**MTOC** : MicroTubule Organizing Center  
**nm** : nanomètre  
**NRK** : Normal Rat Kidney epithelial cells  
**ns** : nano secondes  
**N-ter** : Extrémité N-terminale  
**ODDD** : Oculodentodigital syndrome  
**optiMEM** : Milieu Essentiel Minimum à serum réduit  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PFA** : ParaFormAldéhyde  
**PGJ** : Plaques de Gap Jonctions  
**PKC** : Protéine Kinase C  
**PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique  
**R** : Arginine  
**RFP** : Red Fluorescent Protein  
**Rg** : Rayon de giration  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**RMSD** : Root Mean Square Deviation (déviation de la racine de la moyenne des carrés)  
**S** : Sérine  
**Si RNA** : Small interfering RNA (ARN interférent)  
**TAE** : Tampon Tris, Acétate, EDTA  
**TBE** : Tampon Tris, Borate, EDTA  
**Y** : Tyrosine  
**YFP** : Yellow Fluorescent Protein  
**ZO** : Zonula Occludens



## REMERCIEMENTS

Je remercie et adresse ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse, le professeur **SAKER Meriem** pour m'avoir accordé sa confiance et son temps pour mener à bien cette recherche scientifique.

J'exprime mes respectueux remerciements à madame **MERZOUK Hafida**, professeure à l'Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma haute considération et de ma profonde reconnaissance.

Je suis particulièrement reconnaissante à madame **DALI SAHI Majda**, professeure à l'Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail en tant qu'examinatrice. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à madame **BELKACEM Nafissa**, maître de conférences A à l'université Djilali Liabess Sidi Belabbes, qui a bien voulu participer à ce jury et examiner cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Je remercie infiniment monsieur **BURGO Andrea**, maître de conférences à l'université de Paris Every, Val d'Essonne, France, d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'enrichir ce travail par ses remarques pertinentes. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Je remercie chaleureusement monsieur **CURMI Patrick** qui m'a accueilli dans le laboratoire INSERM, Structure et Activité des Biomolécules (SABNP) unité 829. Je le remercie sincèrement pour avoir mis généreusement à ma disposition le matériel et les produits ainsi que les moyens humains, m'ayant permis d'effectuer l'essentiel de mes travaux. Je lui adresse également ma profonde gratitude pour ses conseils et ses enseignements précieux qui ont contribué en grande partie à ma formation dans le domaine de la biologie moléculaire. Je lui adresse aussi mon respect et mon admiration profondes pour ses qualités humaines rares.

J'adresse des remerciements chaleureux aussi à tout le personnel et chercheurs du même laboratoire, en particulier monsieur **MAROUN Charbal** et madame **VOSCHI Vandana** dont l'aide précieuse et le soutien permanent m'ont été d'un grand secours.

Je tiens également à remercier monsieur **CHERRAK Sabri**, maître de conférences à l'université Abou Bakr Belkaid pour son aide précieuse et sa patience infinie. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et ma reconnaissance éternelle pour avoir permis avec madame **DALI SAHI** la publication du papier m'ayant permis de soutenir cette thèse.

J'adresse mes remerciements également à monsieur **BETTIOUI Reda**, maitre de conférences à l'université Abou Bakr Blekaid, pour sa collaboration précieuse dans l'analyse statistique d'une partie des résultats. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens enfin à remercier toutes les personnes, ayant contribué d'une manière ou d'une autre à me permettre de soutenir cette thèse, dont les membres de l'administration de la faculté SNV/STU et du département de Biologie.

Je m'excuse auprès de toutes les personnes dont je n'ai pas cité le nom par omission. Qu'elles soient assurées de ma sincère gratitude.

## RESUME

La Cx43 est une protéine membranaire ubiquitaire de la famille des connexines, les protéines qui forment les gap junctions, structures assurant la communication intercellulaire. Au sein des canaux lacunaires et/ou indépendamment de cette fonction, les connexines et en particulier la Cx43, régulent plusieurs processus dont la migration cellulaire et la cancérogenèse.

Le but de cette recherche est d'étudier *in vitro*, l'impact de Cx43 et en particulier son extrémité C-terminale sur la migration et la polarisation cellulaire. Elle vise également par une étude *in silico*, à repositionner des médicaments dans le cadre de l'utilisation de cette protéine comme cible thérapeutique dans le traitement des cancers l'impliquant.

Les résultats révèlent un effet indéniable et très hétérogène de Cx43 sur la migration et la polarisation cellulaires. Les effets varient selon les types cellulaires testés, les variants Cx43 étudiés et les paramètres analysés. La Cx43 impacte la migration via des événements de phosphorylation et éventuellement son interaction avec la tubuline/microtubules

En ce qui concerne les résultats de l'amarrage et de la simulation moléculaires, il apparait que parmi les molécules étudiées, le Nilotinib s'impose comme un candidat potentiel pour cibler le C-ter de Cx43 dans la thérapie du cancer.

**Mots clés :** Cx43, extrémité C-terminale, gap junctions, tubuline/microtubules, phosphorylation, migration, cancer, repositionnement des médicaments, docking moléculaire

Parmi les 21 connexines identifiées chez l'homme, la connexine 43 (Cx43) est de loin la mieux étudiée. Cette protéine transmembranaire ubiquitaire est abondamment exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires, particulièrement au niveau du cœur, du cerveau et du derme (**Leithe et al., 2018; Kotini et Mayor, 2015; Matsuuchi et Naus, 2013; Solan et Lampe, 2009b ; Laird, 2006** ).

Au sein de structures membranaires appelées « gap junctions », elle exerce un rôle important dans la communication intercellulaire, assurant ainsi un rôle crucial dans la régulation de fonctions physiologiques importantes telles que la croissance et la différenciation cellulaires, l'homéostasie tissulaire et l'apoptose, ainsi que la coordination entre les cellules excitables (**Leithe et al., 2018 ; Kotini et Mayor, 2015 ; Zhang et al., 2015 ; Matsuuchi et Naus, 2013; Hervé, 2012; Kameritsh et al., 2012; Dang et al., 2006**).

Elle serait également impliquée dans certains mécanismes physiopathologiques, essentiellement l'ischémie et les maladies cardiaques (**Cotter et al., 2019; Jeyaraman et al., 2012; Hawat et al., 2010**) ainsi que la tumorigénèse et la cancérisation (**Bonacquisti et Nguyen, 2019 ; Wu et Wang, 2019 ; Sun et al., 2018 et 2012 ; Mesnil, 2004**)

De plus, des mutations de Cx43 sont associées à de nombreuses maladies congénitales telles que la dysplasie oculodentodigitale (ODDD) , la surdité , l'épilepsie , des désordres cutanés , la cataracte, les neuropathies périphériques et des malformations cardiaques (**Lilly et al., 2016; Boyden et al., 2015; Sutcliffe et al., 2015; Wingard and Zhao, 2015; Laird, 2014; Molica et al., 2014 ; Mylvaganam et al., 2014; Gilleron et al., 2012; Berthoud et Beyer, 2009; Paznekas et al., 2009**).

Il semblerait que la Cx43 exerce certains de ses rôles indépendamment de sa fonction de perméabilité et de communication intercellulaire, notamment dans la régulation de la migration et la polarisation cellulaires (**Kameritsh et al., 2012; Francis et al., 2011 ; Behrens et al., 2010**), mais également dans la régulation de la prolifération tumorale, l'apoptose et les métastases (**Qiu et al., 2016 ; Sun et al., 2012; Kanczuga-Koda et al., 2010; Langlois et al., 2010**).

En effet, Cx43 a l'aptitude d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques via son extrémité C-terminale (C-ter). Cette partie cytoplasmique de la protéine, comporte de nombreux résidus serine, tyrosine et thréonine capables d'interagir avec différentes classes de kinases permettant ainsi de réguler le cycle de vie de la connexine (**Leithe et al., 2018; Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012; Marquez-Rosado et al., 2012; Solan et Lampe, 2009 a et b; Dai et al.,**

2007; **Giepmans et al., 2001**) ainsi que le gain ou la perte de sites d'interaction avec des partenaires protéiques (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012; Jhonson et al., 2012; Solan et Lampe, 2009b; Lauf et al., 2002**). Des mutations au niveau de certains résidus du C-ter sont responsables de la dérégulation du cycle de vie de la connexine, affectant ainsi son expression et sa localisation dans la cellule (**Wu et Wang, 2019 ; Kanczuga-Koda et al., 2010 ; Laird, 2014 ; Dubina et al., 2002**).

Par ailleurs, la Cx43 est à ce jour la seule connexine connue comme interagissant avec la tubuline/microtubules. **Giepmans et al.(2001)** ont été les premiers à mettre en évidence cette interaction par des expériences de pull-down ; ils ont également identifié le site d'interaction au niveau du C-ter, un peptide de 35 acides aminés.

Par la suite, **Saidi Brikci-Nigassa et al. (2012)**, ont confirmé cette interaction par des expériences de RMN et ont montré qu'un peptide plus court d'une longueur de 26 acides aminés serait suffisant pour permettre cette interaction.

D'autre part, de nombreuses études ont montré que l'implication des connexines, et particulièrement la Cx43, dans la migration cellulaire serait modulée par le C-ter et éventuellement l'interaction spécifique Cx43-tubuline/microtubules, par réarrangement du cytosquelette de microtubules. Des études basées sur la surexpression de formes tronquées de Cx43, dépourvues de peptides correspondants au C-ter, ont montré une réduction de la vitesse de migration s'accompagnant d'une perte de directionnalité, induites vraisemblablement par la perte de l'interaction Cx43-tubuline/microtubules (**Matsuuchi et Naus, 2013; Kameritsh et al., 2012; Francis et al., 2011; Behrens et al., 2010**). Par ailleurs, des études ont mis en évidence une régulation de la migration cellulaire par Cx43 par différentes voies de signalisation dont celles des PKC (Protein Kinase C) au niveau du derme (**Richards et al., 2004**) et p38MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) dans les cellules HeLa (**Behrens et al., 2010**).

Le rôle des connexines en tant qu'activateurs de la motilité cellule-cellule a attiré l'attention sur les métastases cancéreuses. Il en ressort un nombre d'études ayant établi une activité promotrice des connexines en relation avec l'invasion et la migration des cellules cancéreuses (**Kotini et Mayor, 2015 ; Qiu et al., 2015 ; Zhang et al., 2015 ; Lamiche et al.,2012 ; Ogawa et al., 2012 ; Tate et al., 2006**)

Le premier volet de cette étude est consacré à l'exploration du rôle de Cx43 dans la migration et la polarisation cellulaires par une approche expérimentale visant à sur-exprimer des connexines longueur complète, sauvage ou mutées ainsi que des formes tronquées qui sont des peptides correspondant au C-ter, dans des types cellulaires soit dépourvus de Cx43 (HeLa), soit

exprimant un faible taux de Cx43 (MDCK: Madin-Darby Canine Kidney) ou encore des cellules exprimant fortement Cx43 (NRK : Normal Rat Kidney).

Pour cela, nous avons tout d'abord examiné l'impact de mutations alanine de sites appartenant au domaine C-ter, et potentiellement impliqués dans la migration cellulaire. Ces mutations ont pour but d'abolir des sites phosphorylables (et les convertir en sites non phosphorylables) et/ou abolir des sites d'interaction de Cx43 avec la tubuline/microtubules ; il s'agit de :

- R239 (arginine en position 239) et Y247 (tyrosine en position 247) nécessaires à l'interaction Cx43-tubuline/microtubules, tel qu'il a été démontré par résonance magnétique nucléaire (RMN) (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012**) ;
- S262 (serine en position 262) qui serait potentiellement le siège de phosphorylation par la MAPK (**Leithe et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014 ; Sirnes et al., 2009 ; Doble et al., 2004**)
- S368 (serine en position 368) un site potentiellement phosphorylé par les PKC (**Leithe et al., 2018; Solan et al., 2003 ; Lampe et al., 2000 ; Saez et al., 1997**)

Ensuite, nous avons examiné les effets qu'exercent le C-ter de Cx43 sur la migration cellulaire, par sur-expression de peptides correspondant à l'extrémité C-terminale. Les deux formes ont été testées :

- La forme longue Ct-228 s'étendant du résidu L228 (leucine 228) au résidu I382 (isoleucine 382) décrite par **Giepmans et al. (2001)** et qui est ancrée dans la membrane
- La forme courte soluble Ct-234 allant du résidu K234 (lysine 234) au résidu I382 décrite par **Saidi Brikci-Nigassa et al. (2012)**

L'objectif principal de l'étude est d'examiner d'une part, le rôle de Cx43 dans la modulation de la vitesse de migration et la directionnalité des cellules via le C-ter par mécanisme de phosphorylation. D'autre part, établir un lien éventuel entre l'interaction spécifique de Cx43 avec la tubuline/microtubules et la régulation de la migration.

Cette étude pourrait ouvrir la voie vers l'utilisation de l'extrémité C-terminale comme cible thérapeutique importante dans la stimulation de la migration cellulaire ou son inhibition selon le type de pathologie.

C'est ce qui fait l'objet du deuxième volet de l'étude, qui est consacré au ciblage du C-ter de Cx43 dans la thérapie du cancer. En effet, l'implication de Cx43 dans le cancer n'est plus à démontrer. De nombreuses études, ont montré que la dérégulation de l'expression de Cx43 et autres connexines, est associée à un grand nombre de cancers (prostate, sein, ovaire, colon, cerveau, derme, foie, poumon, pancréas....) (**Sun et al., 2018; Lamouille et al., 2017;**

**Tabernero et al., 2016; Qiu et al., 2016; Grek et al., 2015; Maqbool et al., 2015; Ryszawy et al., 2014; Sun et al., 2012; Villares et al., 2011; Dubina et al., 2002; Kanczuga-Koda et al., 2010; Langlois et al., 2010; Xu et al., 2008; Mesnil, 2004 )**

Il est également bien établi que la tumorigénèse s'accompagne d'une perte de la communication jonctionnelle d'une part (**Wu et Wang, 2019; Leithe et al., 2018; Aasen et al., 2016; Kanczuga-Koda et al., 2010**), et d'autre part que la restauration de l'expression de Cx43 entraîne un effet suppresseur de tumeur dans de nombreux types de cancer (**Fu et al., 2020; Tabernero et al., 2016; Qiu et al., 2015; Sun et al., 2012 ; Langlois et al., 2010; Kanczuga-Koda et al., 2010; Xu et al., 2008; Mesnil, 2004**).

Toutefois, il a été observé une augmentation de l'expression de Cx43 dans les tumeurs capables de métastaser (**Wu et Wang, 2019 ; Grek et al., 2015 ; Ryszawy et al., 2014; Villares et al., 2011**). Selon la littérature, la Cx43 exercerait son rôle dans la physiopathologie du cancer, de manière indépendante de l'activité de perméabilité intercellulaire (**Qiu et al., 2016; Sun et al., 2012; Kanczuga-Koda et al., 2010; Langlois et al., 2010; Joshi-Mukherjee et al., 2007**). En effet, des travaux ont montré que Cx43 subit des mutations au niveau de son extrémité C-terminale, ce qui causerait une aberration de sa localisation (cytoplasmique, nucléaire, mitochondriale) dans certains types de cancers (**Wu et Wang, 2019 ; Kanczuga-Koda et al., 2010 ; Dubina et al., 2002**). De plus, Cx43 interagit avec des partenaires protéiques via son C-ter pour exercer soit ses effets suppresseurs de tumeur (**Qiu et al., 2016; Maqbool et al., 2015; Sun et al., 2012 ; Langlois et al., 2010**), soit ses effets anti-apoptotiques (**Kanczuga-Koda et al., 2010**) ou encore ses effets dans la stimulation de la capacité d'extravasation et colonisation (**Ryszawy et al., 2014 ; Dubina et al., 2002**), mais aussi pour induire la résistance au traitement de chimiothérapie (**Fu et al., 2020; Grek et al. , 2015; Sun et al., 2012**).

C'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont intéressés au C-ter de Cx43 comme cible thérapeutique pour réduire l'agressivité de certains cancers et/ou améliorer la sensibilité aux traitements chimiothérapie (**Fu et al., 2020 ; Lamouille et al., 2017 ; Grek et al. 2015**).

La deuxième partie de cette thèse est donc une étude *in silico* ayant pour objet le repositionnement de médicaments déjà utilisés et disponibles, afin de cibler Cx43 dans le cadre de la thérapie des cancers impliquant cette protéine

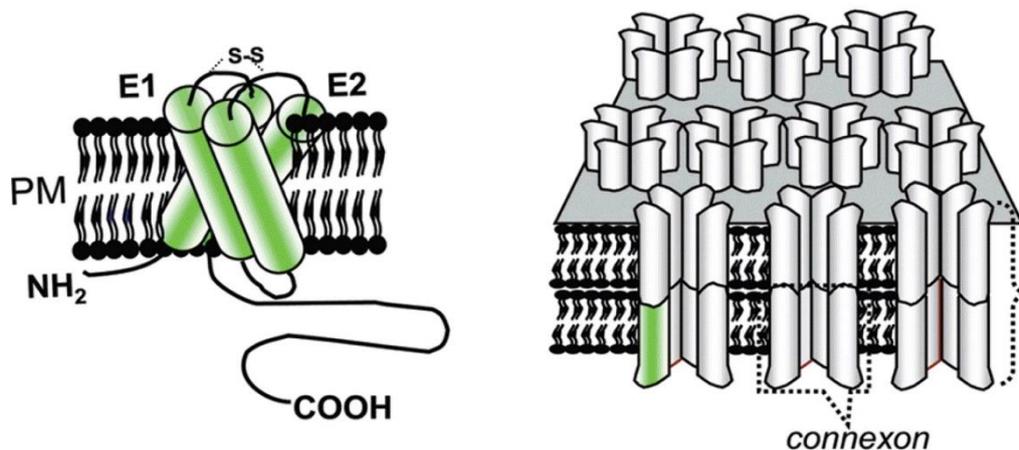
### I- Gap junctions ou Jonctions communicantes

#### I-1 Structure et propriétés

Dans les organismes multicellulaires, les cellules ont besoin de communiquer. Le moyen le plus direct et le plus rapide, est la communication via des canaux qui traversent la membrane plasmique et lient entre les cytoplasmes des cellules adjacentes (**Solan et Lampe, 2014 ; Hervé, 2012**).

Ces canaux sont appelés *canaux de gap junctions (CGJ) ou canaux de jonctions communicantes ou jonctions lacunaires*. Ils ont été observés la première fois en 1967 par Revel et Karnovsky par micrographie électronique, dans le cœur et le foie de souris (**Hervé, 2012**)

Chaque canal est constitué de deux *hémicanaux ou connexons*, appartenant chacun à une des deux cellules adjacentes. Chaque connexon est un hexamère de protéines appartenant, chez les vertébrés, à deux familles les *connexines* ou les *pannexines (figure 1)*. L'ouverture et la fermeture des pores des CGJ, se fait en réponse à des stimuli tels que le changement de voltage au niveau de la membrane plasmique. Les protéines qui forment ces canaux sont en effet capables de mouvements pouvant assurer une telle fonction (**Alstrom et al., 2015 ; Solan et Lampe, 2014 ; Gilleron et al., 2012 ; Hervé, 2012**).



### A. Connexine

### B. Assemblage des gap jonctions

**Figure 1: Représentation schématique de la structure de la connexine, du connexon, et du canal de gap jonction (Gilleron *et al.*, 2012)**

**A.** La connexine est une protéine transmembranaire constituée de quatre domaines : Deux boucles extracellulaires (E1 et E2), une boucle cytoplasmique, une extrémité carboxyle et une extrémité amine intracellulaire. **B.** Le connexon est formé par six connexines de même isoforme (homomérique) ou de différents isoformes de connexines (hétéromérique). Un canal de gap jonction est formé de deux hémicanaux de même type (homotypique) ou de différents types (hétérotypique) qui interconnectent le cytoplasme de deux cellules adjacentes.

Les CGJ s'organisent en clusters au niveau de domaines spécialisés de la membrane plasmique, appelés *plaques de gap jonctions* (PGJ) (Laird et Lampe, 2018 ; Hervé, 2012) (*figure 1*). Ces plaques se localisent préférentiellement dans des régions riches en cholestérol et sphingolipides, des micro-domaines appelés *radeaux lipidiques*. Le rôle de ces microenvironnements est mal connu, mais des données suggèrent qu'ils joueraient un rôle physiologique dans la régulation de l'activité des canaux, à travers des interactions directes protéines-lipides et/ou en influençant les propriétés physiques de la bicouche (Defamie et Mesnil, 2012 ; Hervé, 2012).

Dans les myocytes du cœur, les gap jonctions (GJ) se localisent en abondance au niveau de structures spécialisées dénommées les *disques intercalés*. Ces structures sont également riches en desmosomes et jonctions adhérentes qui fournissent au cœur une stabilité mécanique (Laird et Lampe, 2018 ; Solan et Lampe 2014 ; Marquez-Rosado *et al.*, 2012)

## I-2 Rôles physiologiques et physiopathologiques

Le rôle physiologique attribué aux CGJ est la communication intercellulaire, qui est mise en place dès l'embryogénèse. Elle se manifeste par la capacité des CGJ à permettre le passage direct de petites molécules, dont le poids moléculaire n'excède pas 1kDa, tels que les ions et les métabolites, des nucléotides, acides aminés, sucres simples et messagers secondaires ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{AMP}_c$ ,  $\text{GMP}_c$ ,  $\text{IP}_3$ ) (Solan et Lampe, 2014 ; Marquez-Rosado et al., 2012). La signalisation paracrine/autocrine via les GJ, permet la régulation de fonctions physiologiques cruciales telles que la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire, la migration, l'apoptose ainsi que le maintien de l'homéostasie (Kotini et Mayor, 2015 ; Zhang et Shaw, 2014 ; Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012 ; Dang et al., 2006). Cette communication intercellulaire permet également le couplage électrique entre des cellules excitables ; au niveau du cerveau permettant le maintien de l'homéostasie entre les neurones (Marquez-Rosado et al., 2012 ; Smyth et Shaw, 2012) et au niveau du cœur permettant la contraction coordonnée des cellules (Ek-Victorin et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014). D'ailleurs, la dérégulation ou la perturbation des GJ est la signature de plusieurs pathologies cardiaques (Cotter et al., 2019 ; Solan et al., 2019 ; Jeyaraman et al., 2012). Par ailleurs, l'ouverture des hémicanaux, fermés dans les conditions physiologiques, sous l'effet d'un stress ischémique contribue aux lésions irréversibles des tissus (Ek-Victorin et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014 ; Hawat et al., 2010). Cette activité « canal » est impliquée également dans des processus physiopathologiques majeurs tels que la carcinogénèse et la tumorigénèse (Kotini et Mayor, 2015 ; Zhang et Shaw, 2014 ; Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012 ; Xu et al., 2008 ; Dang et al., 2006). Des données de la bibliographie, rapportent une corrélation entre l'apparition et la stimulation de la tumorigénèse et une réduction de la communication intercellulaire via les GJ, au moins aux premiers stades de la maladie (Qiu et al., 2016 ; Grek et al., 2015 ; Villares et al., 2011 ; Kanczuga-Koda et al., 2010). Lowenstein et al. (1966), ont été les premiers à suggérer un rôle des GJ dans la tumorigénèse (Naus et Laird, 2010). Les GJ jouent un rôle de suppresseurs de tumeurs dans plusieurs types de cancers. Une activité élevée du canal serait corrélée à une restriction du développement de la tumeur (Sun et al., 2018 et 2012 ; Langlois et al., 2010 ; Naus et Laird, 2010 ; Xu et al., 2008 ; Dubina et al., 2002). Les connexines retardent vraisemblablement la progression de la tumorigénèse, et pourraient par conséquent être considérées comme cible thérapeutique potentielle dans le cadre d'une approche de traitement multigénique (Fu et al., 2020 ; Lamouille et al., 2017 ; Tabernero et al., 2016 ; (Sarouilhe et Dejean, 2015) . Le mécanisme moléculaire associé au rôle suppresseur de

tumeurs exercé par les GJ, serait lié à la nature des molécules échangées par les cellules saines comparées aux cellules tumorales qui perdent un tel échange. Ces molécules auraient un effet homéostatique. Le glutathion par exemple est reconnu comme molécule directement liée au cancer. Cet antioxydant protège la cellule contre les espèces réactives oxygénées et particulièrement protège l'ADN de l'altération (**Asantewaa et Harris, 2021**)

D'autre part, une expression anormalement des GJ est observée dans les kératinocytes et les fibroblastes chez les diabétiques ce qui retarde la cicatrisation du derme chez ces patients (**Montgomery et al., 2018; Grek et al., 2015 ; Pollok et al., 2011; Wright et al., 2009**)

C'est pourquoi le blocage des gap junctions et/ou hémicanaux s'avère une approche thérapeutique efficace dans de nombreuses pathologies impliquant les connexines et la perméabilité intercellulaire via les jonctions lacunaires (**Cotter et al., 2019 ; Huang et al., 2018 ; Montgomery et al., 2018 ; Tonkin et al., 2018 ; Guo et al., 2016 ; Pollok et al., 2011; Chen et al., 2009; Wright et al., 2009**)

## II-Les connexines

### II-1 Structure, topologie et propriétés

- Généralités

Les constituants des GJ de connexines, sont des protéines transmembranaires (*figure 1*) appartenant à une famille de protéines dont 21 isoformes ont été identifiés chez l'homme, 20 chez la souris (**Ek-Votorin et al., 2018 ; Leithe et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014**).

Les connexines sont classées phylogénétiquement en deux sous-groupes : alpha et bêta codés par les gènes GJA et GJB (**Laird et Lampe, 2018 ; Boyden et al., 2015**). Elles sont également classées selon leur poids moléculaire, de la connexine 23 (Cx23) à la connexine 62 (Cx62). Cette classification constitue la base de leur nomenclature. En effet, chaque connexine est désignée par un suffixe numérique correspondant à son poids moléculaire en Dalton exemple : Cx43 (43Da) (**Kotini et Mayor, 2015 ; Marquez-Rosado et al., 2012 ; Laird, 2006**)

Il est rare qu'un type cellulaire exprime un seul isoforme de connexine. La co-expression de 2 isoformes ou plus serait la norme (**Laird et Lampe, 2018 ; Laird, 2010**).

Parmi les connexines, la Cx43 est abondamment exprimée dans 34 tissus et 46 types cellulaires (**Solan et Lampe, 2009b**) : astrocytes, neurones, cellules gliales, dendrites, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules hématopoïétiques, cellules de la crête neuronale cardiaque (**Laird et Lampe, 2018 ; Kotini et Mayor, 2015 ; Matsuuchi et Naus, 2013 ; Marquez-Rosado et**

al., 2012 ; Laird, 2006 ). En raison de son ubiquité, la Cx43 est la plus étudiée de toutes les connexines et donc la mieux caractérisée en termes de

- Sites de phosphorylation identifiés
- Partenaires protéiques connus
- Assemblage des connexons
- Dégradation des canaux de GJ (figure 2) (Leithe et al., 2018 ; Spagnol et al., 2016)

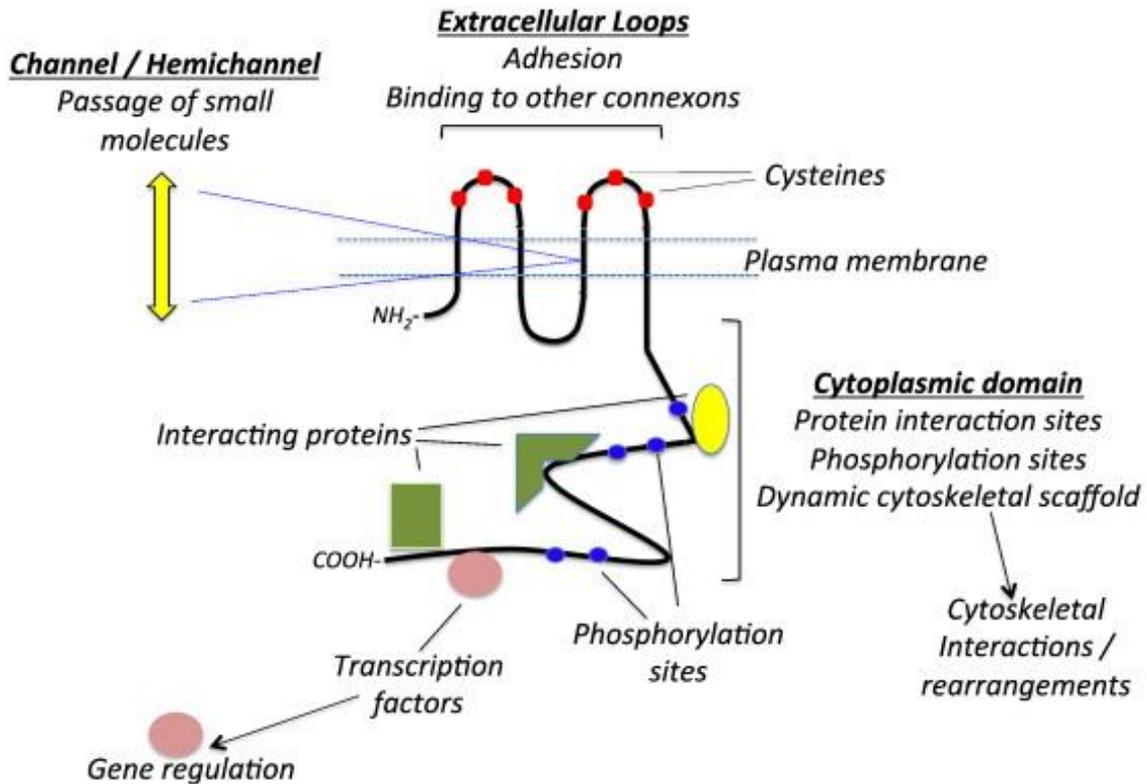


Figure 2: Représentation schématique de Cx43 indiquant sa topologie (Matsuuchi et Naus, 2013)

Les cystéines en rouge au niveau des boucles extracellulaires sont impliquées dans l'adhérence et dans la liaison à d'autres connexines sur les cellules adjacentes pour former des jonctions lacunaires ou gap junctions. Des résidus localisés au niveau des domaines transmembranaires qui sont assemblés en connexons bordent le canal hydrophile et facilitent le passage de petites molécules à travers le pore. La queue C-terminale de Cx43 contient de multiples sites d'interaction de protéines (représentées par des formes jaunes et vertes), ainsi que des résidus sérine, thréonine et tyrosine (points bleus) qui peuvent être phosphorylés. Ces interactions et modifications régulent la fonction Cx43.

- **Connexon : Structure et propriétés**

Six protéines s'organisent en hexamère ménageant un canal au milieu, et forment ainsi une structure cylindrique appelée *connexon* et qui correspond à la moitié d'un canal de gap jonction d'où le nom d'*hémicanal* (*figure 1*) (Kotini et Mayor, 2015, Matsuuchi et Naus, 2013 ; Hervé, 2012, Solan et Lampe, 2009b). Un connexon peut soit fonctionner comme un canal à part entière, permettant la communication entre la cellule et la matrice extracellulaire, soit former avec le connexon de la cellule adjacente une jonction lacunaire. L'ouverture de l'hémicanal se produit en réponse à des facteurs de stress ou de signaux physiologiques pour permettre une signalisation autocrine/paracrine (Andelova et al., 2020 ; Alstrom et al., 2015). Le connexon peut être constitué soit de sous unités de mêmes isoformes (homoconnexon) ou de différents isoformes (hétéroconnexons) (Gilleron et al., 2012 ; Hervé, 2012 ; Goodenough et Paul, 2009; Laird, 2006). Les combinaisons sont nombreuses mais toutes ne sont pas possibles. En effet, certaines connexines ne peuvent pas oligomériser ensemble, notamment les isoformes dérivés de différents groupes phylogénétiques. De plus, certains hémicanaux ne peuvent pas s'assembler pour former un CGJ. Ce phénomène implique des différences qualitatives des propriétés de perméabilité (sélectivité des canaux) et donc des variations qualitatives de la communication intercellulaire (Jhonson et al., 2012).

Par ailleurs, il a été démontré que les connexons sont présents dans les mitochondries des cellules du cerveau et du cœur où ils exercent une activité hémicanal (Laird et Lampe, 2018 ; Leithe et al., 2018 ; Ek-Vitorin et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014 ; Jeyaraman et al., 2012)

- **Connexine : Topologie et propriétés**

Toutes les connexines partagent la même structure : elles traversent la membrane quatre fois en déterminant quatre domaines transmembranaires. Les connexines possèdent une extrémité N-terminale (N-ter) et une extrémité C-terminale (C-ter) cytosoliques ; ainsi que deux boucles extracellulaires contenant six cystéines et une boucle intracellulaire (*figure 2*) (Kotini et Mayor, 2015 ; Gilleron et al., 2012 ; Hervé, 2012 ; Solan et Lampe, 2009b, Laird, 2006).

Les boucles extracellulaires permettent le contact entre les connexons des cellules adjacentes par liaison covalente des cystéines, tandis que la boucle intracytoplasmique serait impliquée dans la régulation de la perméabilité du canal (Kameritsh et al., 2012)

Le C-ter, à la différence du N-ter qui est court, varie par sa séquence et sa longueur entre les différentes connexines. Le C-ter de Cx43 est évidemment le mieux caractérisé en raison de l'ubiquité et l'abondance de cette protéine. Il semblerait que le C-ter de Cx43 serait le plus long et aurait le protéome le plus important (Leithe et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2009b). En effet,

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

il interagit de manière directe ou indirecte, avec de nombreuses kinases, des protéines du cytosquelette et des facteurs de transcription (**Ghosh et al., 2014 ; Solan et Lampe, 2014 et 2009 ; Jhonson et al., 2012 ; Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012 ; Behrens et al., 2010 ; Sirnes et al., 2009 ; Dai et al., 2007 ; Richards et al., 2004 ; Giepmans et al., 2001**) (*figures 2 et 3*). Ces sites sont d'une grande importance fonctionnelle. En effet, les protéines des GJ interagissent avec une grande panoplie de partenaires protéiques intra-cytoplasmiques pour assurer différents rôles notamment la localisation des canaux et leur activité, régulation de la communication cellulaire à différents stades du cycle de vie des connexines ainsi que la régulation de leur assemblage en connexons et en GJ (**Leithe et al., 2018 ; Solan et Lampe, 2014 et 2009b ; Hervé, 2012 ; Laird, 2006** )

Néanmoins, des études ont montré que des cellules dont la Cx43 est dépourvue du C-ter peuvent toujours former des GJ et assurer la perméabilité. Une étude a démontré qu'un mutant Cx43 tronqué du C-ter (258-382) peut former des CGJ fonctionnels mais en nombre inférieur par rapport au Cx43 sauvage (**Jhonson et al., 2012**).

De plus, de nouvelles données rapportent la présence d'isoformes tronqués de la protéine Cx43 dans plusieurs lignées cellulaires. Ils sont stimulés dans des conditions de stress hypoxiques, et détectés dans certains types de cancers. Par ailleurs, il a été également rapporté que ces protéines tronquées sont traduites à partir du transcrit de la protéine complète. Il s'agit de 6 isoformes dont les plus grands sont de tailles respectives 32kDa, 29kDa, et 26kDa contenant deux domaines transmembranaires plus une partie de la boucle intra cytoplasmique et l'extrémité C-terminale, ainsi que 3 fragments de tailles respectives 20kDa, 11kDa et 7kDa qui comprennent l'extrémité C-terminale. L'isoforme de 20kDa, très abondant dans le tissu cardiaque humain et plusieurs types de cancers, comporte aussi une partie du domaine transmembranaire et serait une protéine chaperonne pour le transport des vésicules de connexons à la membrane plasmique (**Epifantseva et Shaw, 2018 ; Sorgen et al., 2018 ; Leithe et al., 2018 ; Salat-Canela et al., 2015 et 14 ; Ul-Hussain et al., 2014 et 2008 a et b**).

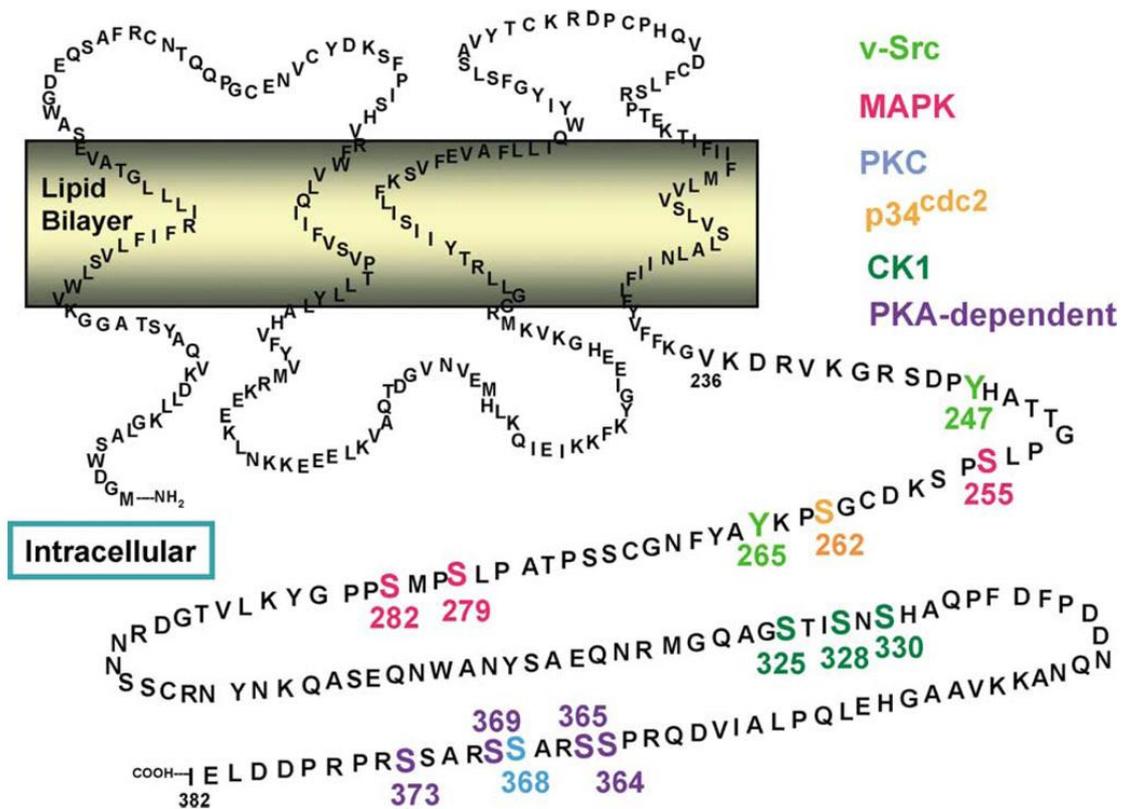


Figure 3: Sites de phosphorylation de Cx43 (Solan et Lampe, 2005)

Représentation schématique des résidus appartenant à l'extrémité C terminale de Cx43 ciblées par différentes classes de kinases et indiquées par différentes couleurs.

## II-2 Rôles dans les conditions physiologiques et physiopathologiques

Les connexines ont des rôles multiples, elles sont nécessaires aux fonctions physiologiques normales des cellules. De ce fait, une perte d'expression des connexines conduit à des effets dramatiques et souvent létaux (Kotini et Mayor, 2015). Des expériences d'inactivation des gènes, ont montré que des souris knock-out, Cx43 KO (délétion du gène GJA1) meurent peu de temps après la naissance en raison de malformations du cœur (Matsuuchi et Naus, 2013 ; Marquez-Rosado et al., 2012).

Par ailleurs, des expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant la connexine 43 tronquée de son C-ter (Cx43K258Stop), ont montré que ces souris meurent peu de temps après la naissance à cause d'un défaut de la barrière épidermique (Marquez-Rosado et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009b).

Les connexines assurent plusieurs de leurs fonctions physiologiques, via la perméabilité des CGJ : homéostasie, développement, prolifération, migration, apoptose (Leithe et al., 2018,

**Solan et Lampe, 2014; Gilleron et al., 2012 ; Marquez-Rosado et al., 2012 ; Richards et al., 2004**) mais de plus en plus de données semblent indiquer que les connexines exercent certaines de leurs fonctions indépendamment de cette activité canal, notamment la régulation de la migration cellulaire ainsi que la signalisation par les facteurs de croissance TGF $\beta$ , sans oublier la régulation de la tumorigénèse et des métastases (**Laird et Lampe, 2018 ; Leithe et al., 2018 ; Kameritsh et al., 2012; Elias et al., 2010 ; Dai et al., 2007**).

En effet, la Cx43 en particulier, interagit avec une grande panoplie de protéines via son C-ter (**Leithe et al., 2018; Sogen et al., 2018 ; Laird, 2010**). Cette particularité, représente la base structurale de ses fonctions indépendantes de l'activité canal, c'est-à-dire des fonctions qui ne requièrent pas un échange de molécules entre les cellules et/ou avec la matrice extracellulaire (**Kameritsh et al., 2012**).

En raison de leur importance dans nombre de processus physiologiques, il est logique que les connexines, ou plutôt des anomalies de leur expression et/ou régulation, soient impliquées dans plusieurs processus physiopathologiques (**Goodenough et Paul, 2009 ; Laird, 2010**).

En effet, une corrélation entre la surexpression de la Cx43 dans certains tissus et certaines pathologies a été observée, par exemple dans le cerveau en cas d'ischémie et dans l'hippocampe chez les épileptiques (**Marquez-Rosado et al., 2012**), mais aussi suite à une lésion périphérique (**Tonkin et al., 2018**). Par ailleurs, plusieurs isoformes de connexines sont impliqués dans les maladies rénales (**Prakoura et al., 2018**),

D'autre part, des travaux sur l'ulcère de jambe, une complication souvent associée au diabète, ont montré que le retard de cicatrisation du derme et de l'épiderme chez ces patients serait dû à une surexpression de la Cx43 au niveau des kératinocytes et fibroblastes (**Montgomery et al., 2018; Pollok et al., 2011; Wright et al., 2009**).

Des mutations de gènes de connexines seraient également associées à de nombreuses pathologies (**Laird, 2014 et 2010; Mylavaganam et al., 2014 ; Solan et Lampe, 2014 ; Paznekas et al., 2009** ). Par exemple, la dysplasie oculodentodigitale, est causée par des mutations au niveau du gène GJA1 qui perturbent la localisation des connexines et causent leur agrégation à l'intérieur de l'appareil de Golgi (**Boyden et al., 2015 ; Solan et Lampe, 2014 ; Paznekas et al., 2009, Dubina et al., 2002**). Il s'agit d'un trouble congénital se manifestant par de multiples anomalies phénotypiques touchant les yeux, les dents, les membres en plus d'une symptomatologie neurologique (**Hadjichristou et al., 2017**).

Les altérations de l'expression des connexines dont Cx43, et leur transport vers la membrane plasmique, sont également associées à la cataracte congénitale, la surdité, des maladies cardiovasculaires, des maladies liées à la myéline, des maladies de la peau... ainsi que la

carcinogénèse (**Lilly et al., 2016 ; Sutcliffe et al., 2015 ; Wingard et Zhao, 2015 ; Molica et al., 2014 ; Gilleron et al., 2012 ; Berthoud et Beyer, 2009**)

### II-3 Cycle de vie des connexines

Contrairement à la plupart des protéines membranaires, les connexines se caractérisent par des taux de renouvellement très élevés, plusieurs fois par jour. Leur demi vie est courte et varie entre 1,5 à 5h (**Laird et Lampe, 2018 ; Spagnol et al., 2016 ; Solan et Lampe, 2009b**) ; 1 à 3h pour les Cx43 (**Laird et Lampe, 2018 ; Marquez-Rosado et al., 2012**) et moins de 2h au niveau de la membrane plasmique (**Smyth et Shaw, 2012**). Les cellules utilisent cette genèse et cette suppression permanente des GJ comme mécanisme de régulation de l'ampleur de la communication cellulaire, en réponse aux changements environnementaux ou stimuli physiologiques. Un défaut de cette régulation à n'importe quel stade du cycle de vie des connexines (assemblage, transport vers la membrane plasmique, intégration au niveau des GJ, dynamique à la surface de la cellule, internalisation ou dégradation) conduit ou est associée à une maladie (**Laird et Lampe, 2018 ; Laird, 2010**).

*In vivo*, le désassemblage rapide des connexines se produit durant la prolifération des tumeurs, et dans le cœur en réponse à une hypoxie. *In vitro*, le désassemblage est accéléré sous l'effet des esters de phorbol, facteurs de croissance et oncogènes (**Boassa et al., 2010**).

Les connexines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et subissent des modifications post traductionnelles dans l'appareil de Golgi (**figure 4**) (**Sorgen et al., 2018 ; Boyden et al., 2015 ; Gilleron et al., 2012**). Toutefois, le site d'oligomérisation en connexons, dépend du type d'isoforme de connexine et du type cellulaire dans lequel il est exprimé. Par exemple, l'oligomérisation de la Cx32 se fait dans le réticulum endoplasmique dans les hépatocytes de rat (**Gilleron et al., 2012**), tandis que l'oligomérisation de la Cx43 se fait dans l'appareil de Golgi dans les cellules NRK et les cellules HeLa (**Gilleron et al., 2012 ; Das Sarma et al., 2005**) . Ces deux isoformes qui dérivent de deux groupes phylogénétiques différents ne peuvent pas oligomériser ensemble. Des études de surexpression ont montré que le site d'oligomérisation pourrait également dépendre du taux d'expression de l'isoforme. Après leur assemblage, les connexons sont transportés vers la membrane plasmique (**Gilleron et al., 2012**)(**figure 4**). Ce transport requiert des partenaires protéiques, la consortine serait la protéine la plus communément requise, notamment pour le transport des connexons de Cx43. L'inactivation par les ARN interférents siRNA (small interferent RNA) des gènes codant pour la consortine, induit une inhibition du transport de la Cx43 vers la membrane plasmique et son blocage au niveau de l'appareil de Golgi (**Gilleron et al., 2012 ; Akiyama et al., 2005**).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La machinerie mise en œuvre pour le transport des nouveaux connexons est dépendante du type d'isoforme. Les connexons à base des isoformes Cx43, Cx33 et Cx26 quittent l'appareil de Golgi dans des vésicules de kinésine qui migrent le long des microtubules (**Gilleron et al., 2012 ; Fort et al., 2011**). La perturbation des filaments de microtubules par le nocodazole engendre une diminution du nombre de connexons transportés (**Gilleron et al., 2012 ; Johnson et al., 2002**).

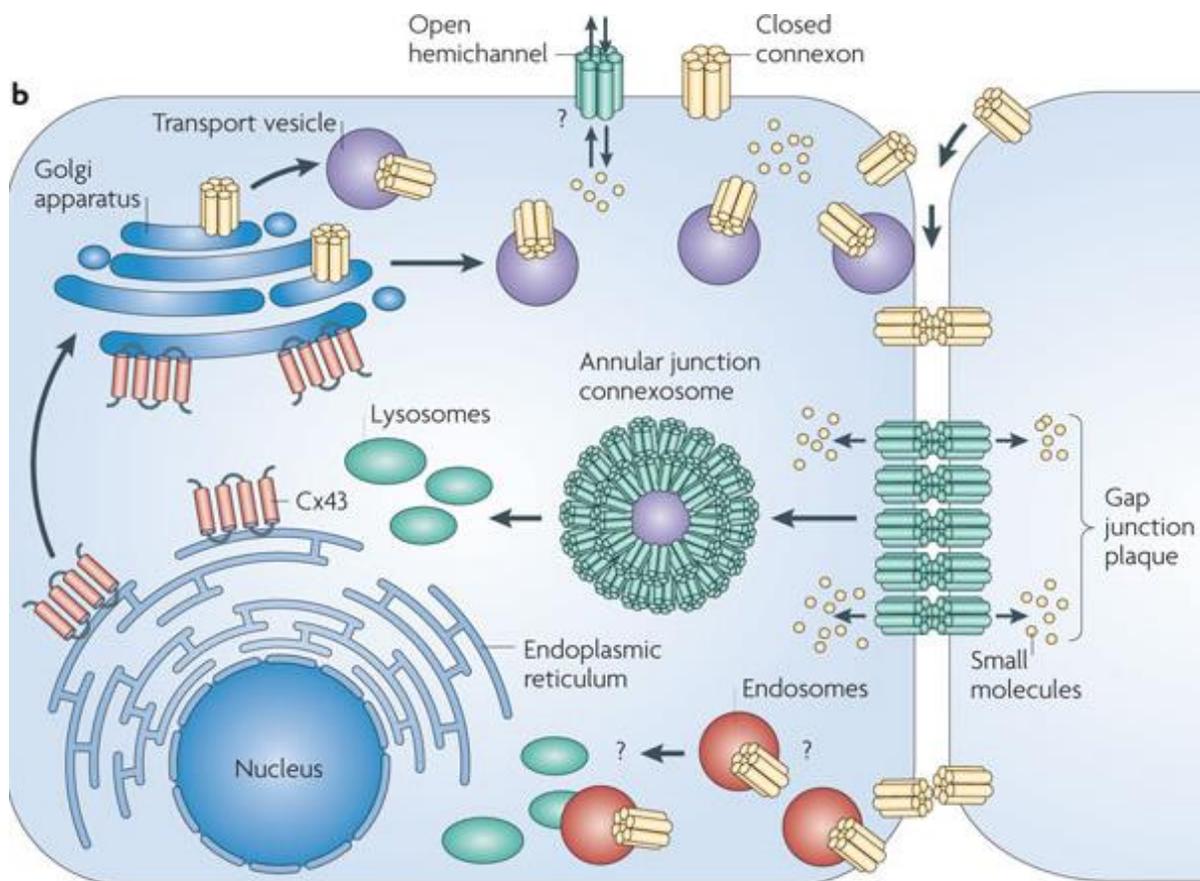
Par ailleurs, les protéines EB1 et p150<sup>GLUED</sup>, qui contrôlent la polymérisation/dépolymérisation des microtubules, coopèrent pour adresser les vésicules de Cx43 vers des sous-domaines spécifiques de la membrane, en interaction avec les jonctions adhérentes. Des études ont observé dans le myocarde de souris, un déplacement des protéines EB1 des microtubules, dans des conditions de stress. Cet évènement limiterait la livraison des néoconnexons à la membrane (**Smyth et Shaw, 2012**). Le réseau d'actine serait aussi important que le réseau de microtubules pour le transport des connexons de Cx43 vers la membrane (**Sorgen et al., 2018 ; Smyth et Shaw, 2012**). Cette voie de transport des connexons serait contrôlée par un dialogue entre les réseaux d'actine et de microtubules. Les vésicules transportant les connexons pourraient en effet passer du réseau de microtubules au réseau d'actine pour limiter l'arrivée des néoconnexons à la membrane. Vraisemblablement, le transport sur les filaments d'actine serait lent. Ces vésicules sont soit destinées à la dégradation, soit envoyées à des sites de la membrane autres que les disques intercalés, ou enfin maintenues comme un pool de connexons pour être dirigés rapidement vers la membrane en cas de signal. Plutôt que d'attendre les hémicanaux provenant du Golgi, ce mécanisme permettrait un remodelage plus rapide des GJ (**Smyth et Shaw, 2012**).

Les connexons sont dirigés vers des sites non spécifiques de la membrane. Après leur insertion, ils peuvent diffuser latéralement dans la bicouche lipidique pour atteindre la région des plaques (**figure 4**). Ces régions spécifiques sont définies par la présence d'autres protéines de jonction qui rendent l'association des connexons possible (**Gilleron et al., 2012 ; Smyth et Shaw, 2012 ; Laird, 2010**). La distance entre les membranes adjacentes doit être suffisamment réduite pour permettre le contact des boucles extracellulaires des connexines (**Gilleron et al., 2012**).

Les connexons adjacents forment un gap ou trou de 2-3nm (**Naus et Laird, 2010**).

Les plaques de GJ sont stabilisées au niveau de la membrane plasmique grâce à l'interaction des connexines avec des protéines d'ancrage telles que le ZO-1 et ZO-2, la protéine MP26, ainsi que les protéines du cytosquelette : tubuline et actine (**Sorgen et al., 2018 ; Gilleron et al., 2012 ; Smyth et Shaw, 2012**). Les protéines ZO-1 interviennent également dans la régulation

de la taille des plaques de GJ en interagissant avec le C-ter de Cx43 (Sorgen *et al.*, 2018 ; Smyth et Shaw, 2012 ; Goodenough et Paul, 2009).



**Figure 4: Structure et cycle de vie de la connexine Cx43 (Laird et Lampe, 2018)**

Cx43 s'insère au réticulum endoplasmique, ou s'effectue son repliement correct ou dans le cas contraire, elle est triée pour être dégradée par le protéasome. Au cours de son transport vers l'appareil de Golgi elle subit une oligomérisation. Après son transport facilité vers la surface de la cellule, par les microtubules, le connexon ou les petits clusters de connexons forment des gap junctions avec les connexons des cellules adjacentes et agrègent avec d'autres connexons pour former les plaques de gap junctions. Avant de former les gap junctions, les connexons peuvent fonctionner comme des hémicanaux en échangeant des petites molécules avec le milieu extérieur. Après une courte demi-vie (quelques heures seulement), les gap junctions internalisent dans des jonctions annulaires ou « connexosomes » avant leur dégradation dans les lysosomes.

#### II-4 Régulation du cycle de vie des connexines

Les connexines sont hautement dynamiques. Le renouvellement permanent des connexons au niveau des plaques de gap junctions est régulé par des modifications post traductionnelles des connexines telles que l'acétylation, la glycosylation, la palmitoylation, l'ubiquitination et principalement la phosphorylation (**Sorgen et al., 2018 ; Smyth et Shaw, 2012**).

La phosphorylation varie en fonction des isoformes et le stade de vie de la connexine. La Cx43 est phosphorylée au niveau de résidus appartenant à son C-ter afin de réguler son cycle de vie :

- Oligomérisation des hémicanaux
- Export des connexons à la membrane plasmique
- Activité des hémicanaux
- Assemblage des CGJ
- Perméabilité des CGJ
- Dégradation des CGJ (**Hervé, 2012 ; Solan et Lampe, 2009b**)

En outre, des événements spécifiques de phosphorylation des connexines peuvent être corrélés à des changements de fonctions des cellules et des tissus. Cette phosphorylation est également impliquée dans l'interaction de la Cx43 avec ses nombreux partenaires protéiques, elle permet le gain ou la perte d'un site de liaison (**Jhonson et al., 2012 ; Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012. Solan et Lampe, 2009b ; Lauf et al., 2002**).

Ainsi, la phosphorylation affecte la structure et la fonction de la Cx43, et entraîne des changements de sa localisation, de son interaction avec des protéines ainsi que la sélectivité du canal (**Jhonson et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009a et b ; Lauf et al., 2002**). Ces changements d'expression et de localisation sont particulièrement visibles durant le cycle cellulaire ; et s'accompagnent de changements de phosphorylation de la Cx43. Cette dernière, atteint son maximum durant la mitose (**Solan et Lampe, 2009a**).

Par conséquent, une altération du statut de phosphorylation conduit à une altération de la régulation du cycle de vie de la connexine et donc une altération de la communication entre les cellules. De plus, des aberrations de la phosphorylation des connexines ou interactions avec des partenaires protéiques nécessaires au transport des connexons vers la membrane plasmique, seraient responsables d'aberrations de leur localisation, ce qui est typique de la plupart des cancers et tumeurs (**Sutcliffe et al., 2015; Gilleron et al., 2012**).

Ces anomalies pourraient être provoquées par des mutations. En effet, une mutation ponctuelle induit des effets dramatiques sur le transport des connexines, leur assemblage et leur perméabilité (**Laird, 2014 ; Gilleron et al., 2012**), et serait associée à certaines pathologies

telle que le syndrome ODDD, l'épilepsie, des désordres cutanés, des malformations cardiaques (Boyden et al., 2015; Sutcliffe et al., 2015; Mylvaganam et al., 2014 ; Delmar et Makita, 2012). Le mécanisme moléculaire qui induit la pathologie est dépendant de l'isoforme de connexine et le site de mutation. Le plus souvent, la mutation conduit au blocage du connexon dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Boyden et al., 2015). D'autres mutations, non seulement altèrent le transport de la connexine mutée, mais exercent également un effet négatif sur le transport d'autres connexines ; par exemple la Cx33 mutée dans les testicules exerce un effet négatif sur la Cx43 (Carette et al., 2009) .

La dégradation des connexines est également sous la dépendance d'évènements de phosphorylation. En effet, l'ubiquitination de la Cx43 se produit sous l'effet d'une stimulation par les PKC et conduit à une internalisation du canal (Leithe et al., 2018 ; Smyth et Shaw, 2012 ; Solan et Lampe, 2009a). L'internalisation peut concerner le connexon seul non couplé, ou le GJ en entier, ou même une plaque entière. Cette internalisation génère une structure en double membrane intracellulaire *la jonction annulaire*, dans une des deux adjacentes, qui serait détruite par le lysosome et le protéasome (Laird et Lampe, 2018) (*figure 4*)

## II-5 La phosphorylation des connexines

La phosphorylation ne semble pas être un mécanisme essentiel à la formation de canaux fonctionnels, puisque des connexines tronquées de leur C-ter (et donc manquants des résidus phosphorylables), peuvent former des GJ. La phosphorylation est plutôt un mécanisme de régulation de la fonction du canal, de l'assemblage et du renouvellement des GJ (Lampe et al., 2000).

La plupart des connexines sont des phosphoprotéines : Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50 et Cx56. Alors que la Cx43 est phosphorylée uniquement au niveau de son C-ter, d'autres connexines telles que la Cx36, Cx46 et la Cx56 peuvent être également phosphorylées au niveau de la boucle cytoplasmique (Marquez-Rosado et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009a) .

La Cx43 est phosphorylée au niveau d'au moins 14 sérines et 2 tyrosines appartenant à son C-ter (Leithe et al., 2018 ; Marquez-Rosado et al., 2012).

Différentes kinases phosphorylent les connexines durant leur cycle de vie au niveau de résidus tyrosine, sérine et thréonine. La Cx43 peut être phosphorylée par les kinases suivantes : PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C), p34<sup>cdc2</sup>/cycline B kinase, CK1 (Casein Kinase1), MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et pp60<sup>src</sup> ... Plusieurs formes phosphorylées peuvent coexister dans une cellule (formes électrophorétiques P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>) (Solan et Lampe, 2009a).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'activation des PKA stimule le mouvement des connexons de Cx43 vers la membrane et leur assemblage en GJ au niveau des plaques de GJ (**Solan et Lampe, 2009a**). La CK1 est également impliquée dans l'assemblage des hémicanaux de Cx43 dans les plaques de GJ. Des études ont montré que la conversion des sites phosphorylables en résidu non phosphorylable alanine, diminue ou empêche la formation des GJ (**Smyth et al., 2014 ; Solan et Lampe, 2005**)

Par ailleurs, les activateurs de kinases peuvent moduler la localisation cellulaire des connexines. En effet, les activateurs de PKA augmentent la présence de Cx43 au niveau des plaques, alors que les activateurs de PKC et de MAPK, peuvent causer l'internalisation de la Cx43 et affecter sa demi-vie (**Solan et Lampe, 2009a**). De plus, l'ubiquitination des Cx43 se produit suite à une stimulation par les PKC et conduirait vraisemblablement à l'internalisation du canal (**Smyth et Shaw, 2012**). Selon certains auteurs, les esters de phorbol (TPA), activateurs des PKC favorisent la tumorigénèse non pas par leur action promotrice de tumeurs, mais plutôt en stimulant la phosphorylation de Cx43 et en réduisant la communication intercellulaire à travers les GJ (**Lampe et al., 2000**).

A la fin de la division, les Cx43 se désassemblent des plaques pour se redistribuer et se recycler et réapparaître à la surface des cellules. Ces changements de distribution sont régulés par la phosphorylation des connexines (**Boassa et al., 2010**). D'ailleurs une déphosphorylation de Cx43 engendrée par l'ischémie myocardique, entraîne une perte de sa localisation au niveau des disques intercalaires et le changement de localisation (**Ek-Victorin et al., 2018 ; Marquez-Rosado et al., 2012**). D'autre part, la phosphorylation au niveau de la S368 diminue la conductance du canal (**Solan et Lampe, 2009a**). Cet événement de phosphorylation est impliqué d'une part, dans la protection du cœur contre les dégâts d'un accident ischémique (**Cotter et al., 2019 ; Ek-Victorin et al., 2018**), d'autre part, il joue un rôle crucial dans la cicatrisation du derme par régulation de la différenciation et la migration des kératinocytes et fibroblastes (**Richards et al., 2004**). Au niveau du site S262, la phosphorylation de la Cx43 par les PKC joue un rôle dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Dans les cardiomyocytes, la surexpression de Cx43 sauvage ou Cx43 dont la S262 est convertie en alanine, diminue la synthèse de l'ADN tandis que le mutant S262D (mime la phosphorylation) n'a aucun effet sur la synthèse de l'ADN (**Solan et Lampe, 2009a**).

Concernant les MAPK, elles phosphorylent Cx43 en exerçant une régulation à la baisse de la communication à travers les CGJ et en réduisant le temps d'ouverture du canal (**Matsuuchi et Naus, 2013 ; Solan et Lampe, 2009a**).

Par ailleurs, les Src phosphorylent la Cx43 au niveau des tyrosines 247 et 265, en induisant la fermeture du canal (**Solan et Lampe, 2008, Lin et al., 2001**).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

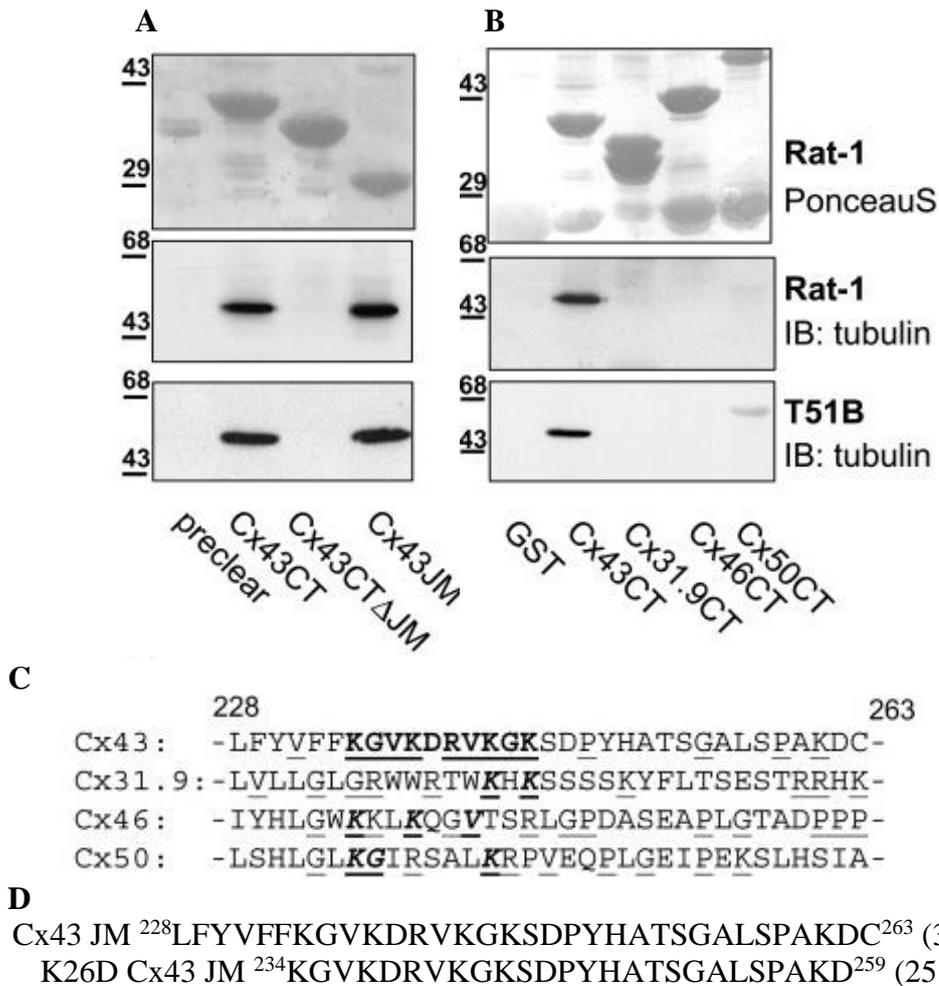
Des études ont montré que des conversions de résidus sérine en résidus alanine au niveau de la Cx43 étaient suffisantes pour induire une altération de la communication intercellulaire, en rendant les connexines insensibles aux cascades de signalisation régulant cette communication. Ainsi, des mutations S368A, rendraient les connexines insensibles aux TPA et donc aux PKC, ce qui se manifeste par une absence d'effets sur la communication cellulaire (**Solan et al., 2003**)

La phosphorylation affecte également la fonction des tissus. En effet, la Cx43 est phosphorylée différemment selon le type cellulaire ; elle est abondamment phosphorylée au niveau des sites S325, S328, S330 et S365 dans le cerveau et le ventricule, S368 dans le cervelet (**Marquez-Rosado et al., 2012**). Des changements de statuts de phosphorylation sont observés dans plusieurs pathologies cardiaques (**Zhong et al., 2018 ; Rodríguez-Sinovas, 2009**)

La phosphorylation des connexines est un mécanisme qui permet également la régulation de l'interaction de ces protéines avec leurs partenaires. Les modifications dues à la phosphorylation du C-ter causent des changements de conformation de sa structure, permettant le gain ou la perte de partenaires protéiques (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012 ; Smyth et Shaw, 2012**). En effet, les sérines 375 et 377 sont des sites critiques de la liaison des Cx43 avec les protéines ZO-1 (Zonula Occludens 1) (**Smyth et Shaw, 2012**). Par ailleurs, des expériences de RMN ont montré que la phosphorylation de Y247 serait responsable de l'abolition de l'interaction de la Cx43 avec la tubuline/microtubules (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012**).

### II-6 Interaction de la connexine Cx43 avec la tubuline/microtubule

La Cx43 est la seule connexine pouvant interagir avec le réseau de microtubules. Cette interaction spécifique a été mise en évidence par **Giepmans et al. (2001)**. Grâce à des expériences de pull-down, utilisant le domaine C-ter de Cx43 fusionné à la glutathion-S-transférase, ils ont montré que le C-ter de Cx43 se lie de manière directe à la tubuline. Le site d'interaction présente des similarités avec un domaine commun à toutes les protéines interagissant avec la tubuline, à savoir une séquence riche en résidus lysine, valine, proline et glycine. Cette séquence appartenant à la région juxta membranaire de Cx43 n'a été retrouvée dans aucune autre connexine, ce qui laisse supposer qu'aucune autre connexine n'interagit avec la tubuline (**figure 5**).



**Figure 5: Cx43 interagit in vitro avec les microtubules via la région juxta-membranaire (JM) de son C-ter (Giepmans *et al.*, 2001)**

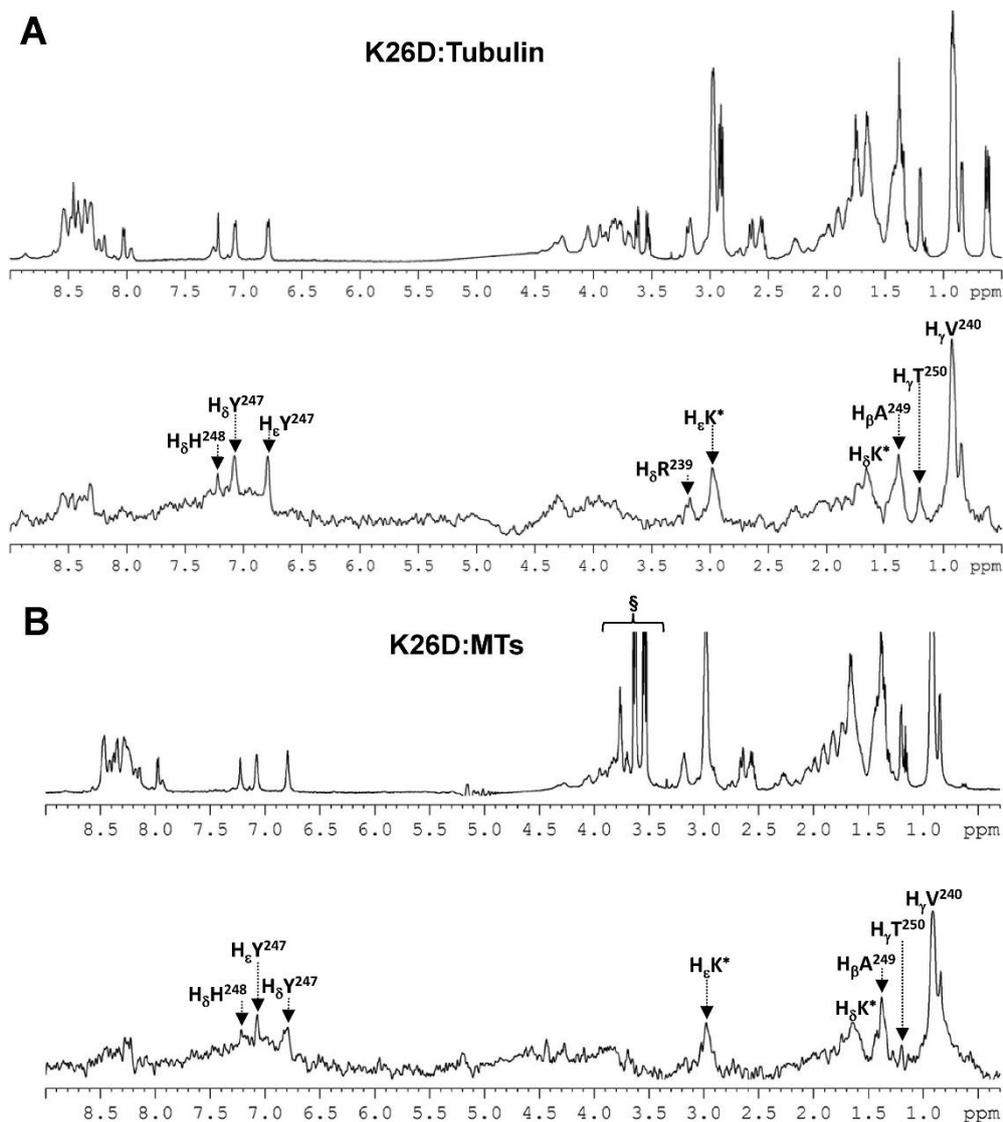
**A.** Les expériences de pull-down ont permis de détecter une interaction Cx43C-ter (peptide 228-283)/tubuline et Cx43JM (peptide 228-263)/tubuline ; cette interaction n'est pas détectée lorsque le Cx43C-ter est délétée de la région JM (Δ228-263). **B.** Les expériences de pull-down ont permis de détecter une interaction entre la tubuline et le C-ter de Cx43, mais pas avec les C-ter des connexines Cx31,9, Cx46 et Cx50. **C.** La séquence en gras soulignée appartenant au C-ter de Cx43 correspond au motif habituellement retrouvé dans les sites de liaison de protéines à la tubuline. Cette séquence n'est pas conservée dans les autres connexines (Cx31, 9, Cx46 et Cx50) ce qui explique que la Cx43 soit la seule connexine à interagir avec la tubuline. **D.** Le site de liaison de Cx43C-ter à la tubuline se trouve au sein du peptide JM (228-263) (Giepmans *et al.*, 2001). Selon Saidi Brikci-Nigassa *et al.* (2012), le peptide K26D (234-259) est suffisant pour permettre cette interaction.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette interaction a été confirmée par **Saidi Brikci-Nigassa et al. (2012)**. Les auteurs ont montré qu'un fragment plus court, le peptide K26D (auquel les résidus hydrophobes et insolubles LFYVFF ont été supprimés) est capable d'interagir *in vitro* avec la tubuline/microtubule (**figure 5**). L'analyse structurale par spectroscopie RMN a mis en évidence deux régions au sein de ce peptide nécessaires à cette interaction, d'une part la région incluant les résidus R239 et V240 et d'autre part la région s'étendant du résidu Y247 au résidu T250 (**figure 6**). Cette analyse a également montré que le peptide K26D se replie en structure hélicoïdale constituée de trois hélices lorsqu'il est en interaction avec la tubuline. Cette équipe de chercheurs a également montré *in vitro* l'implication du résidu phosphorylable Y247 dans cette interaction (**figure 6**). Il est en effet connu que ce résidu est phosphorylé par la v-Src kinase. Cette phosphorylation régulerait vraisemblablement l'interaction en l'abolissant. En effet le peptide K26D-P est incapable de se replier en présence de tubuline et donc d'adopter la conformation lui permettant d'interagir avec la tubuline/microtubules (**figure 7**).

La pertinence fonctionnelle de cette interaction n'a pas été clairement démontrée. Mais, des faits expérimentaux semblent indiquer qu'elle pourrait être impliquée dans nombre de mécanismes dont l'ancrage des microtubules dans les cellules en contact. En effet, **Giepmans et al. (2001)** ont montré par microscopie immuno-électronique, que les microtubules s'étendent à la base des GJ de Cx43 dans les cellules en contact. Les auteurs supposent que la Cx43 ancre les extrémités des microtubules au niveau des GJ et les stabilise. **Giepmans et al. (2001)** ont également démontré que l'interaction Cx43-tubuline/microtubule n'a aucun effet sur la fonction « canal », puisque la perturbation par le nocodazole du cytosquelette de tubuline dans des cellules de Rat-1 n'engendre aucune perturbation au niveau de la perméabilité du canal.

Cette interaction pourrait être aussi impliquée dans le transport de Cx43 vers les plaques de gap jonction. **Lauf et al. (2002)** ont traqué dans des cellules HeLa vivantes transfectées par des protéines Cx43-GFP et marquées par la YFP - tubuline, les mouvements des vésicules assurant le transport des hémicanaux vers la membrane plasmique. Ils ont démontré par vidéo microscopie en temps réel, que les vésicules quittaient l'appareil de Golgi et se dirigeaient le long des microtubules vers la membrane plasmique puis diffusaient latéralement pour atteindre les plaques de GJ (**figure 8**)

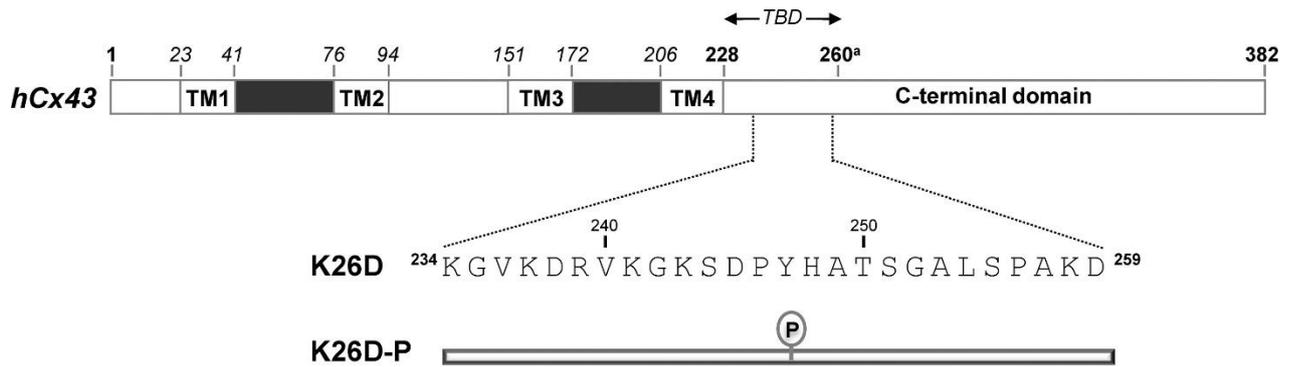


**Figure 6: Analyse par RMN de l'interaction K26D-tubuline/microtubule (Saidi Briki-Nigassa *et al.*, 2012)**

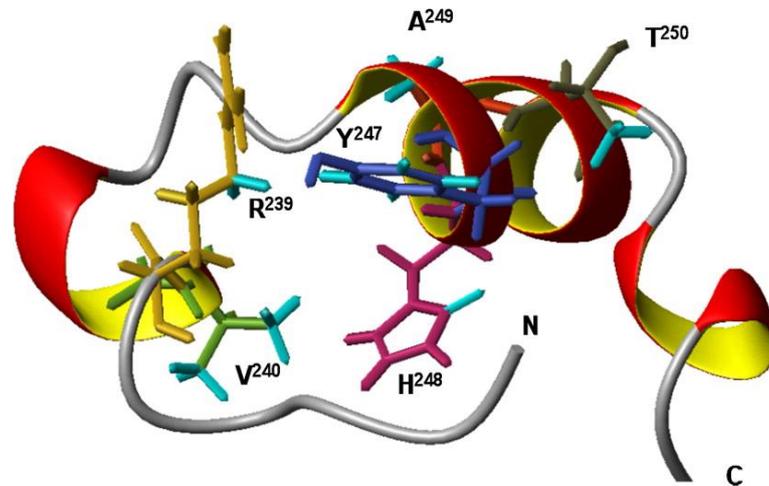
**A.** Interaction avec la tubuline. **B.** Interaction avec les microtubules

Le peptide K26D interagit avec la tubuline/microtubules principalement via des résidus hydrophobes : **R239**, **V240**, **Y247**, **H248**, **A249** et **T250**

A



B



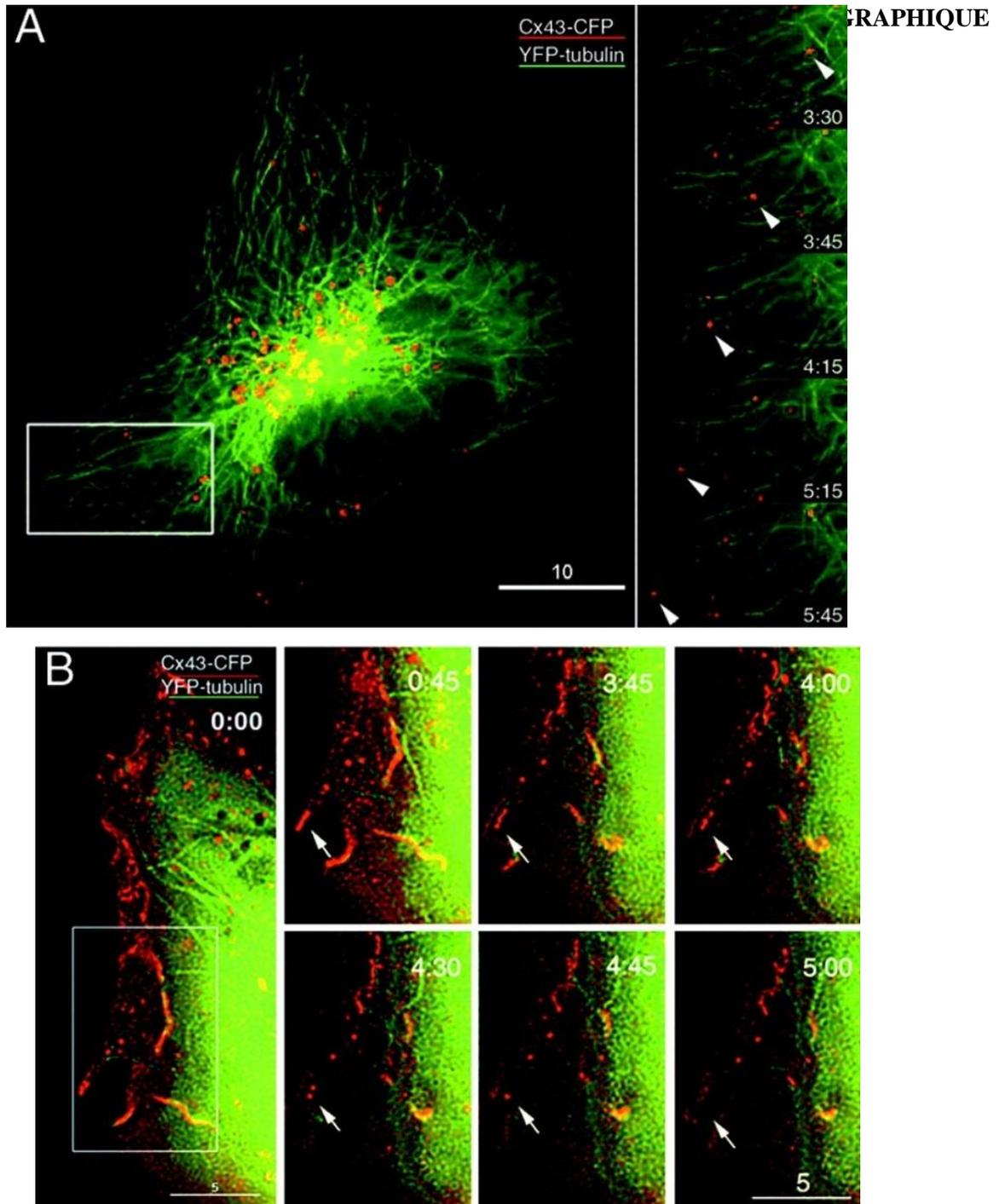
**Figure 7: Représentations schématiques des peptides K26D et K26D-P dérivés du domaine de liaison de la Cx43 humaine à la tubuline (Saidi Briki-Nigassa *et al.*, 2012)**

**A.** Le peptide K26D se lie *in vitro* à la tubuline/microtubule, sa phosphorylation au niveau du résidu Y247 abolit cette interaction *in vitro*. **B.** Lorsqu'il est en interaction avec la tubuline *in vitro*, le peptide K26D se replie en structure compacte avec trois régions hélicoïdales courtes.

*hCx43* : Cx43 humaine

*TBD* : Tubulin Binding Domain

*TM* : Transmembranaire



**Figure 8:** Le transport des connexons de Cx43 se fait dans des vésicules qui se déplacent le long des microtubules (Lauf *et al.*, 2002)

**A.** Dans les cellules HeLa transfectées avec Cx43-CFP (rouge) et YFP-tubuline (vert), le transport des vésicules le long des microtubules est filmé par vidéo microscopie temps réel. **B.** Les vésicules de Cx43-CFP voyageant le long des microtubules jusqu'à la membrane plasmique ont été traquées, des images sont prises chaque 15-s. Une fois arrivées à la membrane plasmique, les vésicules fusionnent l'une après l'autre à la région de la membrane où il n'y a pas de plaques de GJ.

D'autres données expérimentales ont confirmé l'existence de cette voie de transport des connexons dans les cardiomyocytes. Cette voie permettrait selon les auteurs la livraison directe des hémicanaux au niveau des PGJ du fait que les extrémités plus des microtubules sont ancrées aux jonctions adhérentes (**Zhang et Shaw, 2014**)

Cette interaction spécifique de Cx43 avec le réseau des microtubules serait également impliquée dans une voie de signalisation par les facteurs de croissance TGF- $\beta$ . **Dai et al. (2007)**, ont mis en évidence un rôle surprenant de Cx43 dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et le développement des tissus. Surprenant puisqu'il est indépendant de la fonction « canal ». En effet, les auteurs ont montré que la Cx43 intervient dans la voie de signalisation par les facteurs de croissance TGF-  $\beta$  par un mécanisme de compétition avec les facteurs de transcription Smad2/3 pour l'interaction avec les microtubules. En interagissant avec les microtubules, Cx43 empêche la séquestration des protéines Smads 2/ 3 et permet donc leur translocation vers le noyau ou elles stimulent la transcription de gènes. La connexine 43 exerce de cette manière une régulation positive de la transduction du signal par les TGF-  $\beta$ . Néanmoins, le mécanisme permettant cette régulation reste inconnu.

Par ailleurs, de plus en plus d'études pointent l'implication potentielle de l'interaction Cx43/tubuline-microtubules dans la modulation de la migration cellulaire aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques (**Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012 ; Francis et al., 2011 ; Rhee et al., 2009**)

### III- Les connexines et la migration cellulaire

#### III-1 Role de Cx43 dans la migration cellulaire

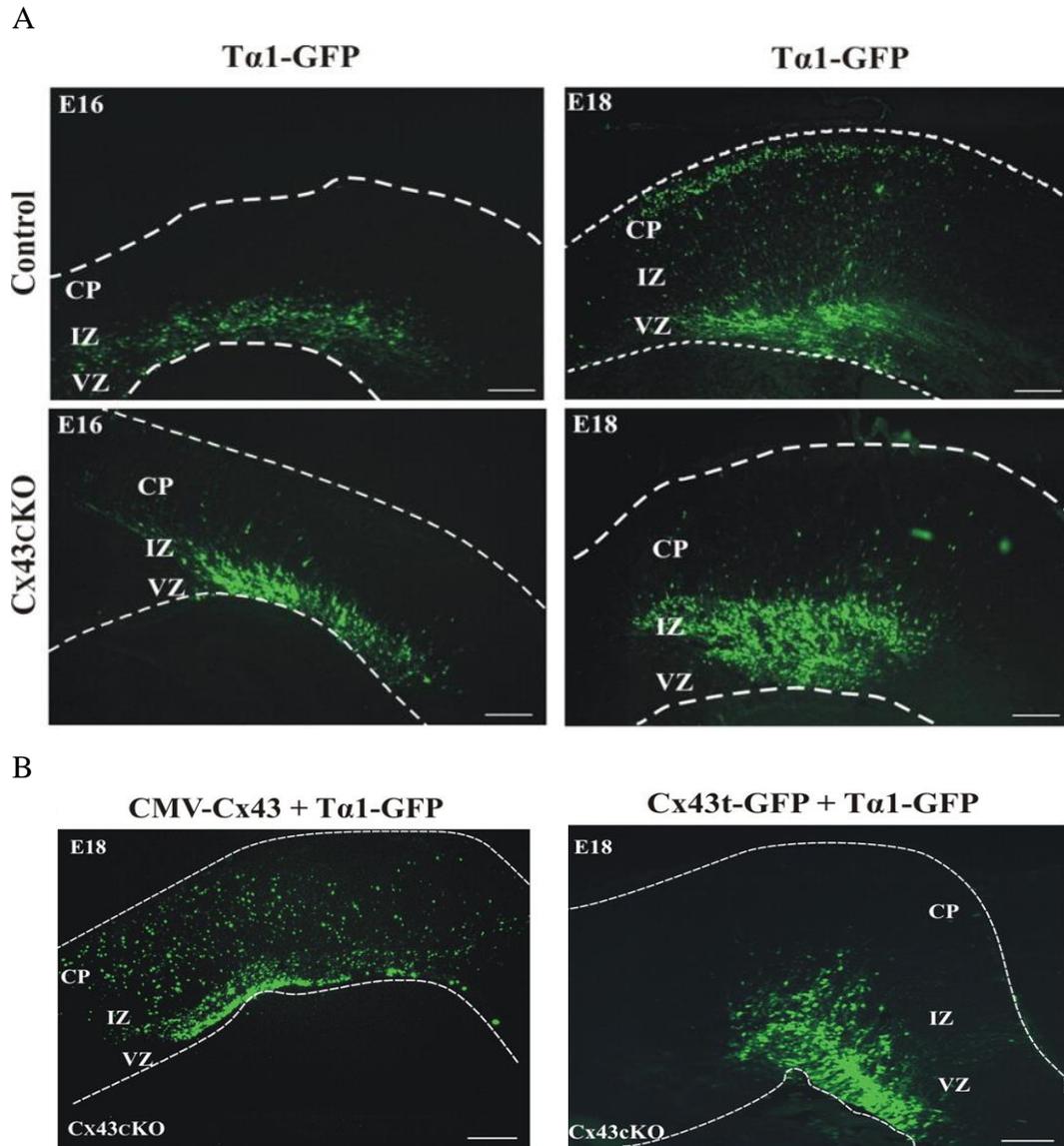
Le rôle des connexines, et plus spécifiquement celui de la connexine 43, dans la migration cellulaire, a été révélé par des expériences d'inactivation génique sur des animaux Cx43KO. En effet, l'inactivation du gène GJA1, entraîne un phénotype périnatal léthal. La mort des souris serait due à des malformations cardiaques causées par une altération de la migration des cellules de la crête neurale cardiaque (**Matsuuchi et Naus, 2013**)

L'impact des connexines sur la migration des cellules, a été par la suite confirmé par des études sur différents systèmes cellulaires et tissulaires aussi bien *in vivo* (**Liu et al., 2012 ; Cina et al., 2009**) qu'*in vitro* (**Elias et al., 2010 ; Rhee et al. 2009 ; Xu et al., 2006**), et en utilisant différentes approches expérimentales. La majorité de ces études ont été menées sur la Cx43 en raison de son ubiquité et son abondance dans les systèmes étudiés (cœur et cerveau) (**Goodenough et Paul, 2009**), soit par :

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Une inhibition et/ou une inactivation de l'expression de Cx43 (interférence ou invalidation du gène) ce qui réduirait aussi la migration (**Cina et al., 2009 ; Rhee et al., 2009 ; Xu et al., 2006**)
- Une inhibition de l'expression de Cx43, puis réexpression de la Cx43 par transfection de plasmides ce qui permet de relancer la migration (**Liu et al., 2012; Francis et al., 2011 ; Behrens et al., 2010 ; Elias et al., 2010; Cina et al., 2009 ; Rhee et al., 2009**).
- Expression de Cx43 dans des cellules qui en seraient dépourvues comme les cellules HeLa ce qui stimulerait la migration de ces cellules (**Behrens et al., 2010**)
- Surexpression de Cx43 dans des cellules qui expriment déjà la connexine endogène ce qui aurait pour effet une stimulation de la migration (**Liu et al., 2012; Francis et al., 2011 ; Behrens et al., 2010 ; Elias et al., 2010; Cina et al., 2009 ; Rhee et al., 2009 ; Xu et al., 2006**)

**Cina et al. (2009)** ont mené une brillante étude, *in vivo*, pour démontrer le rôle de Cx43 dans la migration radiale des cellules neuronales. Ils ont comparé la lamination du néocortex de souris Cx43KO, dont le gène GJA1 a été invalidé par électroporation *in utéro*, avec des souris sauvages exprimant la Cx43 endogène. Les résultats sont éloquentes : les neurones transfectés restent au niveau de la zone ventriculaire, tandis que les cellules exprimant la Cx43 migrent vers la plaque corticale, assurant un développement normal du cerveau embryonnaire. Lorsque des plasmides codant la Cx43 sont introduits par électroporation *in utéro*, dans le cortex embryonnaire des souris KO, la migration neuronale reprend de manière normale (*figure 9*).



**Figure 9: Role de Cx43 dans la migration radiale des cellules neuronales chez la souris**

**(Cina *et al.*, 2009)**

**A.** La délétion de Cx43 interrompt la migration radiale des neurones et les cellules gliales radiales de zone ventriculaire (VZ) vers la plaque corticale (CP) : à E14, un transgène exprimant la GFP sous contrôle d'un promoteur neuronal (Ta1 tubuline) a été injecté dans le ventricule latéral du cerveau antérieur contrôle ou Cx43cKO, suivie par électroporation *in utero*. Les cerveaux ont été prélevés à E16 ou E18, des sections de cortex cérébraux de 10µM ont été recueillies et ensuite les cellules de la GFP + ont été visualisées sous un microscope à épifluorescence. A E16, la plupart des cellules GFP + sont encore accumulées dans la IZ (Zone intermédiaire) sans différence significative entre le contrôle et Cx43cKO. Chez les souris de contrôle, à l'E18, les cellules GFP + ont pu migrer vers leur destination dans la CP, alors que dans les cortex cérébraux Cx43cKO, les neurones ont échoué à migrer vers la CP. **B.** L'expression de Cx43 longueur complète chez les souris Cx43cKO permet de relancer la migration radiale tandis que la forme tronquée de la protéine échoue à compenser les déficiences de migration : des plasmides CMV-Cx43 et Ta1-GFP ont été co-injectés dans le ventricule latéral de souris contrôle et Cx43cKO, suivi par électroporation *in utero* à E14. Les cerveaux ont été prélevés à E18, et les cellules GFP-positives ont été visualisées sous un microscope à épifluorescence. L'insertion de la Cx43 sauvage dans le ventricule latéral a entraîné la migration (à gauche). La forme tronquée Cx43t-GFP ( $\Delta 259-382$ ) n'a pas réussi à restaurer la migration déficiente (à droite)

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En revanche, une étude menée *in vitro* sur les cellules du cerveau par **Elias et al. (2010)**, a montré que la Cx43 n'était pas indispensable à la migration tangentielle, puisque son inhibition par interférence permettait la migration de neurones du télencéphale ventral vers le cortex en développement. Cependant, l'expression de Cx43 est indispensable aux cellules pour switcher de la migration tangentielle à la migration radiale, nécessaire pour une lamination correcte du néocortex, selon les mêmes auteurs.

Toutefois, de nombreuses autres études, ont confirmé le rôle majeur de Cx43 dans la migration dont celles de : **Xu et al. (2006)** sur les cellules de la crête neurale cardiaque Cx43KO ; **Rhee et al. (2009)** sur les cellules épicaudiques ; **Behrens et al. (2010)** sur des cellules HeLa et les EPC (endothelial progenitor cells) ; **Crespin et al. (2010)** sur des cellules cancéreuses LN18 human glioma cells ; **Francis et al. (2011)** sur des cellules MEFs (Mouse Embryonic fibroblasts) et des fibroblastes 3T3 ; **Liu et al. (2012)** sur les cellules neuronales ...

D'après ces études, l'expression et/ou la surexpression de la Cx43 stimulerait significativement la vitesse de migration des cellules *in vitro*. Il est par ailleurs à noter que la délétion de Cx43 non seulement réduit significativement la vitesse de migration, mais affecte de manière négative la directionnalité des cellules et l'organisation du cytosquelette. Une déficience en Cx43 serait en effet responsable de défauts au niveau de la polarité des cellules qui migrent. Des essais *in vitro* ont montré que ces cellules perdent leur polarisation à cause d'une perte d'orientation des microtubules et du centre organisateur des microtubules (MTOC) en direction du sens de la migration. Dans ces cellules, la désorganisation du cytosquelette de microtubules et la réduction de microtubules stabilisés, affecterait dramatiquement la morphologie des cellules qui exhibent des protrusions en nombre significativement élevé par rapport aux cellules ayant un mouvement polarisé (**Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012 ; Francis et al., 2011 ; Rhee et al., 2009**).

Les mécanismes par lesquelles les connexines impactent la migration cellulaire, restent mal connus. Mais de plus en plus d'études tendent à démontrer que la fonction de communication intercellulaire attribuée aux gaps jonctions n'est pas responsable des effets observés. Des études basées sur la construction de formes de connexines mutées au niveau de sites nécessaires à la fonction de perméabilité, tendent à montrer qu'une perte de perméabilité n'affecte pas la capacité des cellules à migrer. En revanche, des mutations engendrant une perte d'adhésion via les Gjs entre les cellules qui migrent, impactent significativement et négativement la migration cellulaire (**Francis et al., 2011 ; Kameritsh et al., 2011, Elias et al. 2007 et 2010**). Ceci est surtout vrai pour la Cx43, dont l'extrémité C-terminale est connue pour ses nombreux sites d'interactions avec différents partenaires protéiques, dont les protéines du

cytosquelette (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009b ; Dai et al., 2007 ; Giepmans et al., 2001**)

Toutefois la communication intercellulaire est spécialement importante lors de la migration pour les cellules qui migrent collectivement, comme c'est le cas au cours de l'embryogénèse et le cancer. Dans ces amas, le  $Ca^{++}$  se propage parmi les cellules via les gap junctions afin de coordonner leur migration. Cela se produit notamment dans les cellules du muscle lisse. Pour les cellules neuronales, la propagation d'ATP à travers les hémicanaux, aurait également un impact sur leur migration en coordonnant le signal par le  $Ca^{++}$  (**Kameritsch et al., 2012**)

### III-2 Role du C-ter de Cx43 dans la migration cellulaire

Plusieurs études ont tenté de démontrer l'impact du C-ter de connexine 43 sur la migration cellulaire. Ces études sont basées sur différentes approches expérimentales:

- Une troncation du C-ter qui affecterait la migration de manière négative (**Crespin et al., 2010 ; Cina et al., 2009**).
- Une sur-expression du C-ter qui stimulerait la migration cellulaire (**Liu et al., 2012 ; Behrens et al., 2010 ; Crespin et al., 2010 ;**).
- Des modifications du C-ter qui modifieraient la migration cellulaire en modifiant les interactions des connexines avec des protéines essentielles à la migration (**Francis et al., 2011 ; Cina et al., 2009 ; Rhee et al., 2009**)

**Cina et al. (2009)**, avaient démontré *in vivo* que l'expression de Cx43 dans des cellules KO pouvait relancer la migration radiale des neurones embryonnaires, mais qu'une forme tronquée du peptide 259-382, correspondant à une partie du C-ter en était incapable (*figure 8*).

De même, **Elias et al. (2010)**, ont observé *in vitro*, un échec d'un variant Cx43 dépourvu du peptide 246-382 à relancer le passage de la migration tangentielle à la migration radiale, alors que la forme longueur complète permettait le switch dans des cellules où la Cx43 avait été inhibée par interférence.

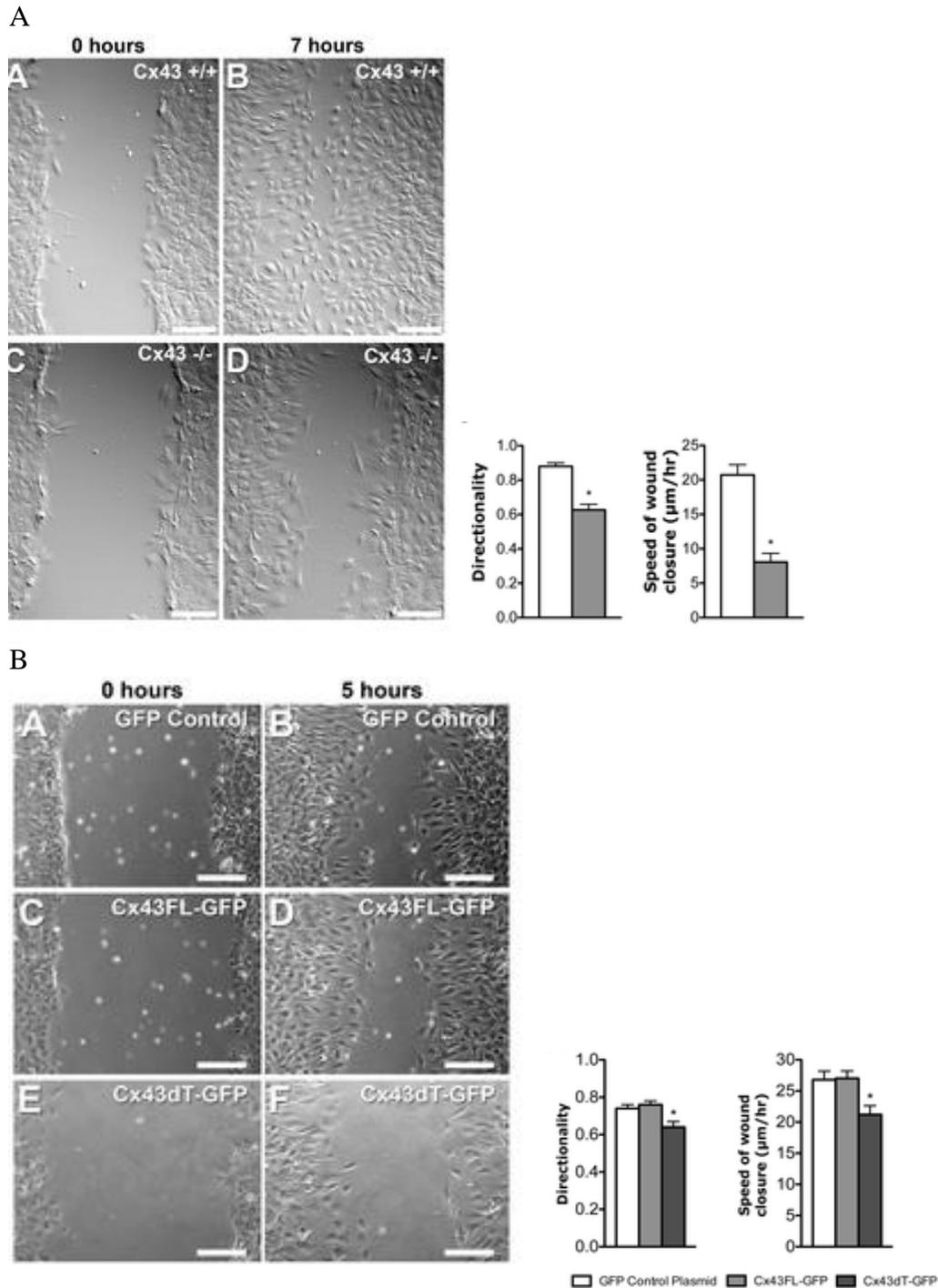
D'autre part, **Behrens et al. (2010)**, ont montré que l'expression du peptide 259-382 correspondant au C-ter de Cx43 dans les cellules HeLa était suffisant pour stimuler la migration des cellules ; le peptide 243-382 dans des cellules de gliome dans l'étude de **Crespin et al., (2010)**.

Ces études indiquent donc un rôle indéniablement important de l'extrémité C-ter de Cx43 dans la migration cellulaire, une implication qui pourrait vraisemblablement faire intervenir l'interaction Cx43-tubuline/microtubules. En effet, les travaux de **Rhee et al. (2009)** et de

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**Francis et al. (2011)** ont montré que des variants de Cx43 ou le peptide 234-243 a été enlevé, reproduisent les mêmes effets observés avec l'inactivation ou l'inhibition de l'expression de Cx43 à savoir, réduction de la vitesse de migration ainsi qu'une perte de directionnalité des cellules. Cette perte de polarisation est due à un échec d'orientation du MTOC vers le sens de la migration ainsi qu'une désorganisation du cytosquelette de microtubules (*figure 9*).

Ces travaux laissent clairement supposer que l'extrémité C-terminale de Cx43 est nécessaire ou du moins importante pour le réarrangement du cytosquelette, mécanisme nécessaire au mouvement des cellules.



**Figure 10: Impact de Cx43 sur la vitesse de la migration cellulaire ainsi que sur la polarisation des cellules, démontré par l'approche du « wound healing » (Francis *et al.*, 2011)**

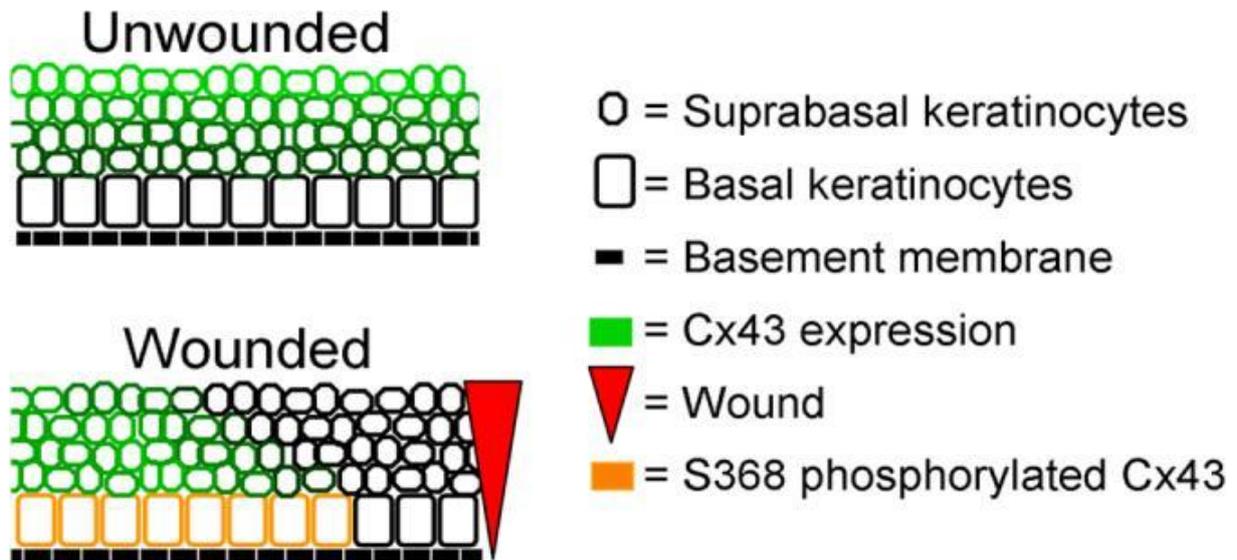
**A.** Les cellules MEF sauvages migrent et remplissent le gap après 7h, tandis que les cellules Cx43KO n'arrivent pas à réparer la plaie dans le même laps de temps. Les cellules ont été traquées (n=42 pour chaque lot) : leurs mouvements indiquent une perte de directionnalité des cellules KO comparées aux cellules sauvages. **B.** Les cellules NIH3T3 ont été transfectées par des plasmides GFP, GFP-Cx43 et GFP-Cx43dT (A234-243). Après blessure sur des monocouches à confluence, les cellules GFP et GFP-Cx43 migrent à la même vitesse pour combler le scratch tandis que les cellules GFP-Cx43dT montrent une réduction de la vitesse de migration accompagnée d'une perte de directionnalité des cellules en migration.

### III-3 Role de la phosphorylation de Cx43 et son C-ter dans la migration cellulaire

Bien que les mécanismes par lesquels la Cx43 et/ou son C-ter impactent la migration cellulaire, restent encore mal connus, certains travaux semblent indiquer que la phosphorylation serait un de ces mécanismes (**Behrens et al. 2010 ; Solan et Lampe, 2009b ; Richards et al., 2004**)

Des études sur la cicatrisation du derme, indiquent que l'expression de Cx43 et sa phosphorylation sont importantes dans la migration et la différenciation des cellules. Bien qu'elle soit prédominante dans les kératinocytes et les fibroblastes, l'expression de Cx43 dans les différentes couches du derme varie de réduite dans les zones en prolifération, à élevée dans les zones en différenciation. Une réduction de la communication intercellulaire via les GJ serait nécessaire à la migration normale des cellules aux bords de la blessure. La phosphorylation de Cx43 par les PKC au niveau du résidu S368 réduit la perméabilité du canal et/ou change ses propriétés et régule ainsi la cicatrisation du derme en réduisant la communication entre les cellules qui migrent, probablement en inhibant le passage de signaux nécessaires à la différenciation des cellules. Ainsi, dans le derme en cicatrisation, la phosphorylation de Cx43 au niveau de S368 permet une régulation temporelle et spatiale de la migration cellulaire par régulation de la communication intercellulaire (**Solan et Lampe, 2009b ; Richards et al., 2004**) (*figure 10*).

D'autres kinases pourraient être impliquées dans la régulation de la migration cellulaire. Les travaux de **Behrens et al. (2010)**, indiquent que la p38MAPK, connue pour son rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la migration induite par les facteurs de croissance, est fortement activée dans les cellules HeLa exprimant la Cx43 ou des formes tronquées correspondant au C-ter. Par ailleurs, une inhibition de cette enzyme réduit significativement la migration de ces mêmes cellules.



**Figure 11:** Schéma représentant l'expression de Cx43 et sa phosphorylation au niveau de la peau humaine dans des conditions normales et dans des conditions de blessure (Solan et Lampe, 2009b)

Expression de Cx43 (notée en vert) dans la peau non lésée est principalement observée dans les couches supérieures plus différenciées. Lors d'une lésion, l'expression de Cx43 chute très près de la plaie et se redistribue dans les couches inférieures éloignées de la plaie. Les cellules basales près de la plaie expriment Cx43 qui est fortement phosphorylée au niveau de S368 (indiqué en orange) formant un compartiment de communication distincte. La phosphorylation de Cx43 par l'enzyme kinase PKC régule de manière spatiale et temporelle les CGJ lors de la réparation de la plaie dans le derme humain en créant des compartiments de communication dans la région de la plaie afin de réguler la migration et la différenciation des cellules.

#### IV- La connexine Cx43 et le cancer

De nombreuses études sur le cancer ont montré l'implication des connexines et les jonctions communicantes dans le développement et la progression de cette pathologie. En effet, ces protéines interviennent dans la régulation de la prolifération tumorale, l'apoptose et les métastases. La dérégulation de leur expression est associée à la carcinogenèse du poumon, sein, ovaire, prostate, foie, estomac, colon, pancréas, cerveau, peau... (**Fu et al., 2020; Leithe et al., 2018 ; Tabernero et al., 2016 ; Qiu et al., 2015 ; Ryszawy et al., 2014 ; Sun et al., 2012; Langlois et al., 2010; Xu et al., 2008 ; Mesnil, 2004**)

En raison de son ubiquité, la connexine Cx43 a fait l'objet de nombreuses études sur le cancer. Il en ressort un rôle de suppresseur de tumeur qui serait associé à son expression dans les tumeurs (**Mesnil, 2004**). En effet, dans les cellules cancéreuses du pancréas, son expression engendre une inhibition de croissance et augmente le taux d'apoptose (**Sun et al., 2012**). Des effets similaires ont été observés dans le cancer de la peau (**Langlois et al., 2010**), le glioblastome (**Tabernero et al., 2016**) ainsi que le cancer colorectal (**Kanczuga-Koda et al., 2010**). **Qiu et al. (2015)** ont montré que le traitement de cellules dérivées de lignées du cancer humain de l'ovaire par le facteur de croissance TGF $\beta$ , stimule l'expression de Cx43 et réduit ainsi la prolifération cellulaire induite par le facteur EGF. Dans le cancer du poumon, cette connexine régule le cycle cellulaire. Elle s'exprime simultanément avec la E-cadhérine, et la réduction de leur expression est significativement liée à la différenciation et la progression du cancer. En revanche, la réexpression de Cx43 restaure le niveau de la E-cadhérine ce qui entrave la prolifération des cellules cancéreuses (**Xu et al., 2008**).

Par ailleurs, il a été observé une réduction du pouvoir tumorigénique lorsque les cellules tumorales sont transfectées par les connexines (**Mesnil, 2004**). Par exemple, une surexpression de Cx43 dans des cellules dérivées de lignées du cancer humain du sein, supprime l'expression de gènes impliqués dans la résistance au traitement tels que BRCP, Txr-1,  $\alpha$  tubulin et  $\beta$  tubulin, favorisant ainsi l'expression de gènes de l'apoptose tels que TSP-1 et Bcl-2. Il en résulte l'induction de l'apoptose et une élimination des clusters clonaux (**Fu et al., 2020**).

De plus, il a été observé une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapie lorsque l'expression de Cx43 augmente et une résistance au traitement lorsque son expression est réduite. C'est le cas par exemple de la chimiothérapie gemcitabine dans le cancer du pancréas et TNF $\alpha$  dans le cancer de la prostate. Cependant, le blocage des gap jonctions n'altère pas les effets apoptotiques du traitement (**Sun et al., 2012**).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Il est établi que dans les premiers stades du cancer, l'expression de Cx43 diminue dans plusieurs types de cancers avec une perte de la communication jonctionnelle, altérant ainsi le passage de signaux antimitotiques ainsi que l'adhésion entre les cellules (**Leithe et al., 2018; Grek et al., 2015 ; Mesnil, 2004**) ; toutefois, son expression augmente dans les tumeurs capables de métastaser. C'est le cas des cellules du mélanome où Cx43 joue un rôle crucial dans la communication entre les cellules ayant acquis la capacité d'extravasation et les cellules endothéliales (**Villares et al., 2011**). La réexpression de Cx43 a été également observée dans certains compartiments de tumeurs primaires de la prostate. Cette réexpression accompagne la formation du front invasif du cancer, ce qui explique la présence abondante de connexines dans les tumeurs secondaires de prostate. Par ailleurs, une corrélation a été établie entre l'augmentation de l'expression de Cx43 et le pouvoir à métastaser dans le cancer de l'os (**Ryszawy et al., 2014**). Dans le cancer du sein, l'expression de Cx43 augmente dans les métastases, ce qui suggère un rôle de cette protéine dans l'extravasation et la colonisation des tissus (**Grek et al., 2015**). Dans le cancer de l'ovaire, le facteur de croissance TGF $\beta$  stimule l'expression de Cx43, qui est réduite au début de la maladie, et stimule ainsi la migration des cellules cancéreuses (**Qiu et al., 2015 et 2016**).

Il apparaît donc clairement que l'expression de la connexine 43 joue un rôle majeur dans la carcinogenèse et la régulation de la prolifération tumorale. Toutefois les mécanismes par lesquelles les connexines entraînent leurs effets suppresseurs de tumeurs et/ou stimulent le potentiel des cellules à métastaser demeurent mal connus. Cependant, les études réalisées ces dernières années tendent à montrer que le rôle des connexines dans les cancers, et en particulier celui de la Cx43 n'est pas attribué seulement à son activité de communication jonctionnelle. En effet, il a été démontré que la suppression tumorale induite par Cx43 dans les cellules du glioblastome n'est pas associée à un gain de communication mais plutôt à la localisation cytoplasmique de Cx43 (**Mesnil, 2004**). Dans le cancer du pancréas, la Cx43 transloque à la mitochondrie avec la gemcitabine et interagit avec Bax pour réguler l'apoptose dans les cellules cancéreuses (**Sun et al., 2012**). L'étude de **Qiu et al. (2016)** a montré que le traitement de cellules dérivées de lignées humaines du cancer de l'ovaire avec le carbenoxolone, un inhibiteur des gaps jonctions, n'altère pas la prolifération induite par le facteur EGF qui augmente l'expression de Cx43, confirmant ainsi l'implication de Cx43 dans le cancer indépendamment de la fonction canal.

Les connexines pourraient jouer leur rôle de suppresseur de tumeur par interaction avec les protéines qui régulent la carcinogenèse. C'est le cas du cancer de la peau. Il a été démontré que Cx43 interagit via son extrémité C terminale avec la caveoline-1 dans les kératinocytes du rat,

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

et ces deux molécules co-localisent dans les cellules de l'épiderme humain. Cette interaction est dérégulée au cours de la transformation, ce qui suggère que la propriété suppresseur de tumeur de Cx43 nécessite son interaction avec la caveoline-1 (**Langlois et al., 2010**). Dans le glioblastome, Cx43 interagit avec le proto-oncogène Src via son C-ter. Cette interaction entraîne des modifications allostériques de la structure de Cx43 et par conséquent son interaction avec d'autres partenaires protéiques ce qui affecterait les fonctions de Cx43 dans la prolifération et la migration et inhibe les effets oncogéniques de Src (**Tabernero et al., 2016**). Quant aux cancers causés par le papillomavirus dont le cancer cervical, des études ont montré que le virus entraîne la perte des GJ de Cx43 par l'interaction de l'onco-protéine E6 avec la Cx43 (**Leithe et al., 2018 ; Sun et al., 2012**)

Par ailleurs, **Dubina et al. (2002)** ont décrit un certain nombre de mutations au niveau de Cx43 associées au cancer du colon. Les mutations de connexines associées aux maladies héréditaires ou somatiques sont généralement des mésappariements ponctuels qui altèrent différents domaines de la protéine, tandis que les mutations associées au cancer sont des mutations par décalage de cadre de lecture et sont toutes localisées au niveau de l'extrémité C-ter. Elles sont retrouvées uniquement dans les formes invasives. La progression de la néoplasie colorectale est également associée à une perte progressive des jonctions fonctionnelles et une localisation cytoplasmique de Cx43 et Cx32. Ce sont les aberrations de localisation, causées par des mutations des deux connexines qui sont associées à la différenciation du cancer colorectal. En effet, les connexines mutées engendrent leurs effets anti-apoptotiques indépendamment des gaps jonctions. Cx43 par exemple, inhibe l'expression de gènes qui codent pour des facteurs d'apoptose tels que Bcl2 dans le cancer du sein (**Kanczuga-Koda et al., 2010**).

De plus, le C-ter de Cx43 peut être exprimé seul dans le noyau de différents types cellulaires. Cette localisation nucléaire permet à la connexine 43 d'effectuer la régulation de l'expression de gènes dont ceux qui codent des micro ARNs jouant un rôle dans la prolifération cellulaire. D'ailleurs la co-expression de Cx43 et miR-125b est observée dans les stades précoces du cancer du sein. D'autre part, lorsque des cellules dérivées du cancer humain du sein sont transfectées avec le C-ter de Cx43, une diminution du taux de miR-125b et une inhibition de la prolifération cellulaire sont observés. (**Maqbool et al., 2015**). En plus, Cx43 est retrouvée dans le stroma durant la progression du cancer du sein, ce qui permet la régulation de l'invasion et la métastase par des interactions entre les cellules tumorales et le stroma (**Grek et al., 2015**). Cx43 interagit directement avec la  $\beta$  tubuline dans les cellules dérivées du cancer humain du sein ; cette interaction pourrait médier la résistance de ces cellules au paclitaxel selon les auteurs (**Fu et al., 2020**)

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En raison de toutes ces observations, les connexines et en particulier Cx43, sont apparues comme des cibles thérapeutiques idéales dans le traitement du cancer. Des expériences menées par **Grek et al. (2015)** sur la thérapie du cancer du sein, ont testé l'effet de ACT-1, un peptide mimant le C-ter de Cx43 et conçu pour inhiber l'interaction Cx43-ZO1. Le peptide permet la stabilisation des gaps jonctions et réduit leur turn over. Cette augmentation de la communication cellulaire perturbe la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses, mais pas dans les cellules normales. Ce traitement entraîne aussi un effet Bystander (diffusion de médicaments cytotoxiques et l'amplification de l'effet thérapeutique de la chimiothérapie) lorsque le traitement avec le peptide ACT1 est combiné au tamoxifen ou au lapatinib. **Lamouille et al. (2017)** ont également développé un peptide, le JM2 correspondant au C-ter de Cx43 pour entrer en compétition avec Cx43 pour l'interaction avec les microtubules. Il en résulte le blocage de cette interaction ce qui améliore la sensibilité des cellules du glioblastome à un traitement chimiothérapie.

## **VOLET 1**

**Etude de l'impact de la phosphorylation et de l'interaction  
du C-ter de Cx43 avec la tubuline/microtubules  
sur la migration cellulaire**

***Etude in vitro***

Afin de répondre à notre problématique, nous avons suivi le protocole expérimental suivant :

- 1- Construction des différents plasmides portant les gènes codants pour la connexine 43 sous sa forme sauvage (longueur complète), ainsi que les formes mutantes (ayant chacune un site cible converti en alanine) et les formes tronquées (peptides correspondants à une partie du C-ter)

Les sites cibles sélectionnés appartiennent au C-ter de Cx43. Il s'agit d'acides aminés :

- Phosphorylables (Y247, S262 et S368). Selon la bibliographie, la phosphorylation du résidu serine en position 368 est impliquée dans la régulation par les PKC de la migration cellulaire (**Richards et al., 2004**). Quant à la serine 262, c'est une cible potentielle des MAPK (**Leithe et al., 2018**; **Sirnes et al., 2009**; **Doble et al., 2004**), une autre voie de signalisation impliquée dans la régulation de la migration cellulaire (**Behrens et al., 2010**). Enfin, la tyrosine en position 247, est phosphorylée par l'enzyme Src, une phosphorylation qui abolirait l'interaction Cx43-tubuline/microtubules
- Sites impliqués dans l'interaction Cx43-tubuline/microtubules, il s'agit de Y247 mais également de l'arginine en position 239 (R239), un autre site important pour cette interaction selon les résultats de la RMN (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012**).

La conversion de ces sites en alanine, abolira la phosphorylation, et/ou l'interaction Cx43 tubuline-microtubules. Ces mutations nous permettent donc l'exploration du rôle de ces résidus et de ces voies de signalisation, ainsi que l'interaction étudiée sur le phénotype analysé à savoir la migration et la polarisation cellulaires.

- 2- Les différents plasmides sont exprimés dans trois types cellulaires différents par transfection :

- Cellules HeLa : Cellules immortalisées dérivées de métastases de cancer du col de l'utérus et prélevées sur une patiente américaine Henrietta Lacks (**Lucey et al., 2009** ; **Verma et al., 2006**). Ces cellules n'expriment pas les connexines (**Elfgang et al., 1995** ; **Eckert et al., 1993**), et de ce fait constituent un modèle expérimental de choix, puisqu'elles permettent de tester les effets des différentes mutations en absence de l'interférence ou mécanisme de compensation par la connexine sauvage endogène.
- Cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) : Cellules dérivées de lignée de cellules épithéliales du tube rénal, prélevées sur un chien Cocker Spaniel adulte par Madin et Darby (**Harada et al., 2019** ; **Tsai et al., 2019**). Ces cellules expriment la Cx43 (**Berthoud et al., 1992**)

- Cellules NRK (Normal Rat Kidney) : Cellules épithéliales dérivées de cellules du rein de rat *Rattus norvegicus* (**Wang et al., 2018 ; Lu et al., 2014**). Ces cellules expriment la Cx43 (**Li et al., 2014; Berthoud et al., 2001; Fernandez-Cobo et al., 2001**)

Les cellules MDCK et NRK permettent donc d'explorer l'implication de Cx43 dans la migration et la polarisation cellulaires par l'approche de la surexpression. Cette approche expérimentale constitue un puissant outil dans l'analyse des voies biologiques. En effet, la surexpression peut provoquer une perturbation du phénotype, comme cela a été observé dans les aneuploïdies et l'amplification de gènes dans les cancers. La surexpression des clones dans les modèles cellulaires peuvent engendrer des effets sur le phénotype par mécanisme de compétition (**Prelich, 2012**) et nous renseigner sur l'implication des mutations dans le mécanisme étudié.

Il en est de même pour les protéines tronquées, qui peuvent entrer en compétition avec le C-ter de la connexine endogène sur l'interaction avec les protéines partenaires comme les kinases et la tubuline/microtubules.

Les deux peptides utilisés correspondent aux séquences qui comportent le site d'interaction a la tubuline :

- La forme longue Ct-228 s'étendant du résidu L228 au résidu I382 décrite par **Giepmans et al. (2001)** et qui est ancrée dans la membrane
  - La forme courte soluble Ct-234 allant du résidu K234 au résidu I382 décrite par **Saidi Brikci-Nigassa et al. (2012)**
- 3- Grace à la microscopie à fluorescence, l'expression des différents plasmides est analysée et la localisation des différents isoformes au sein de la cellule déterminée, afin de vérifier si les différentes mutations affectent le cycle de vie de la Cx43 (son oligomérisation au sein du connexon, son transport vers la membrane plasmique et sa capacité à former des gap junctions au niveau des plaques)
  - 4- La perméabilité des canaux de gap jonction est également testée afin de déterminer le rôle des différentes mutations dans la fonction canal d'une part, et d'autre part pour voir si les effets observés sur la migration sont imputables a une perte de communication intercellulaire ou indépendants de la fonction de perméabilité.
  - 5- L'impact des différentes mutations sur l'organisation du cytosquelette (actine et microtubule) est analysé par un marquage.
  - 6- Enfin la migration cellulaire (vitesse et orientation des cellules) est analysée par vidéo microscopie en temps réel, pour chaque type cellulaire et pour les différentes isoformes de connexine 43.

**Objectifs de l'étude** : Déterminer l'impact de Cx43 sur la migration cellulaire et voir si :

- Ces effets changent d'un type cellulaire à l'autre
- Cette activité est dépendante ou indépendante de l'activité canal
- Le rôle de Cx43 dans la migration et la polarisation cellulaires, est lié ou non à l'interaction tubuline/microtubules
- Cette activité est médiée par le C-ter
- Cette activité est régulée par la phosphorylation de résidus au niveau du C-ter

### 1- Construction des plasmides

Les différentes constructions ont été créés afin de sur-exprimer la Cx43 sauvage, différents variants mutants de la protéine complète, ainsi que des versions tronquées de la protéine correspondants au domaine C-ter de Cx43 (*figures 12 et 13*), dans les cellules HeLa, MDCK et NRK.

La connexine 43 utilisée dans cette étude est une connexine de souris. L'alignement des séquences de la protéine humaine et murine a révélé 97% d'homologie entre les deux séquences.

L'ADN codant pour la protéine Mus musculus Cx43 (Gap junction alpha1 longueur complète 1-382 acides aminés) a été commandé à OriGene (USA). Le plasmide sans tag « pCMV6-XL5 » a été sous cloné dans un plasmide avec GFP (green fluorescent protein) : le plasmide « pEGFPC-3 » (Clontech, USA)

Toutes les constructions (variants mutants ou tronqués) ont été générées en utilisant le plasmide pEGFPC-3 Cx43wt comme modèle.

Toutes les constructions ont été séquencées avant leur utilisation dans les expériences de surexpression. Le séquençage est réalisé par Beckman Coulter Genomics (Royaume Uni)

Toutes les amorces sont conçues par Oligo Sigma-Aldrich

a- Plasmide Cx43 wt (wild type) portant la séquence complète de l'ADN codant la protéine sauvage (1-382 acides aminés) (*figure 12*) a été cloné entre les sites de restriction BglII et EcoRI, en utilisant les amorces suivantes :

5' CGCGGTACCAGATCTCATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTG 3' (sens) et  
5' CGCGAATTCTTATTATTAAATCTCCAGGTCATCAGGCCGAGGTCT GCTGC 3' (anti-sens).

Le clonage a été réalisé selon la stratégie classique, qui se déroule selon les étapes suivantes :

- Amplification de l'ADN par PCR en y introduisant les sites de restriction servant à l'intégrer dans le plasmide pEGFPC-3 grâce aux amorces.
- Vérification des produits de PCR par électrophorèse : les produits de PCR sont mis à migrer sur un gel d'agarose à 1% afin de vérifier le succès de la réaction d'amplification (présence de l'ADN insert), mais également afin de vérifier que la taille de cet ADN correspond à la taille de l'ADN insert attendu (ADN à amplifier de manière spécifique)
- Purification du produit de PCR par la méthode Phénol/chloroforme
- Digestion du produit de PCR (insert) avec les enzymes de restriction adéquates : Une double digestion avec les enzymes de restriction coupant spécifiquement les sites introduits dans l'insert est réalisée afin de générer les extrémités cohésives complémentaires aux extrémités du vecteur destiné à intégrer cet ADN.
- Purification du produit de digestion sur colonne avec le kit MinEluteReaction Cleanup quit (Quiagen)
- Digestion du plasmide par les mêmes enzymes : Une double digestion avec les enzymes de restriction coupant spécifiquement les sites introduits dans l'insert et présents au niveau du polylinker du plasmide est réalisée afin de générer les extrémités cohésives complémentaires aux extrémités digérées de l'insert.
- Purification sur gel du produit de digestion
- Vérification du succès de la digestion par électrophorèse : Afin de vérifier que le plasmide et l'insert ont été digérés avec les deux enzymes de clonage, une migration sur gel d'agarose des deux échantillons digérés (chacun dans un puits) est réalisée.
- Ligation insert-plasmide : Cette réaction permet de lier l'insert digéré au plasmide digéré de manière covalente et ainsi générer l'ADN recombinant, c'est-à-dire le plasmide portant l'ADN codant la protéine d'intérêt.
- Vérification du succès de la ligation par électrophorèse : Cette étape permet de vérifier que l'insert est intégré au niveau du plasmide, en faisant migrer le produit de ligation sur gel d'agarose à 1%. L'absence de fragments d'ADN dont la taille correspond à celle de l'insert et/ ou du plasmide vide, et la présence de molécules d'ADN de taille équivalente à celle de la taille du plasmide + taille de l'insert, témoignent du succès de la ligation.
- Transformation de bactéries compétentes : Cette étape permet d'introduire l'ADN recombinant dans des cellules bactériennes compétentes afin de l'amplifier.

- Miniprep ou Midipreps : Cette opération permet d'extraire de l'ADN de clones sélectionnés au hasard (une dizaine par boîte) sur la boîte ensemencée avec les bactéries compétentes transformées avec l'ADN recombinant.
- Screening pour sélectionner les clones transformés avec l'ADN recombinant : Cette étape permet de rechercher des clones ayant intégré le plasmide portant l'ADN insert. Ce criblage se fait par digestion et PCR sur les ADN extraits minipreps. Les produits de digestion et de PCR sont soumis à une électrophorèse.
  - Si le plasmide renferme l'ADN insert, l'amplification par les amorces spécifiques permettra d'obtenir un ADN de taille correspondante à l'insert.
  - La digestion permettra de séparer le plasmide et l'insert, ce qui se traduira sur le gel par présence d'une bande correspondant au plasmide linéarisé et une bande correspondante à l'ADN insert.
- Séquençage des plasmides
- Maxipreps à partir de la souche transformée par l'ADN recombinant séquencé.

b- Variants mutants : La conversion en Alanine des résidus : Arginine en position 239, Tyrosine en position 247 et Sérines en position 262 et 368, a été réalisée par mutagenèse dirigée en utilisant le kit Quick change II XL site directed mutagenesis (Stratagene, USA) en suivant les instructions du protocole fourni par le fabricant.

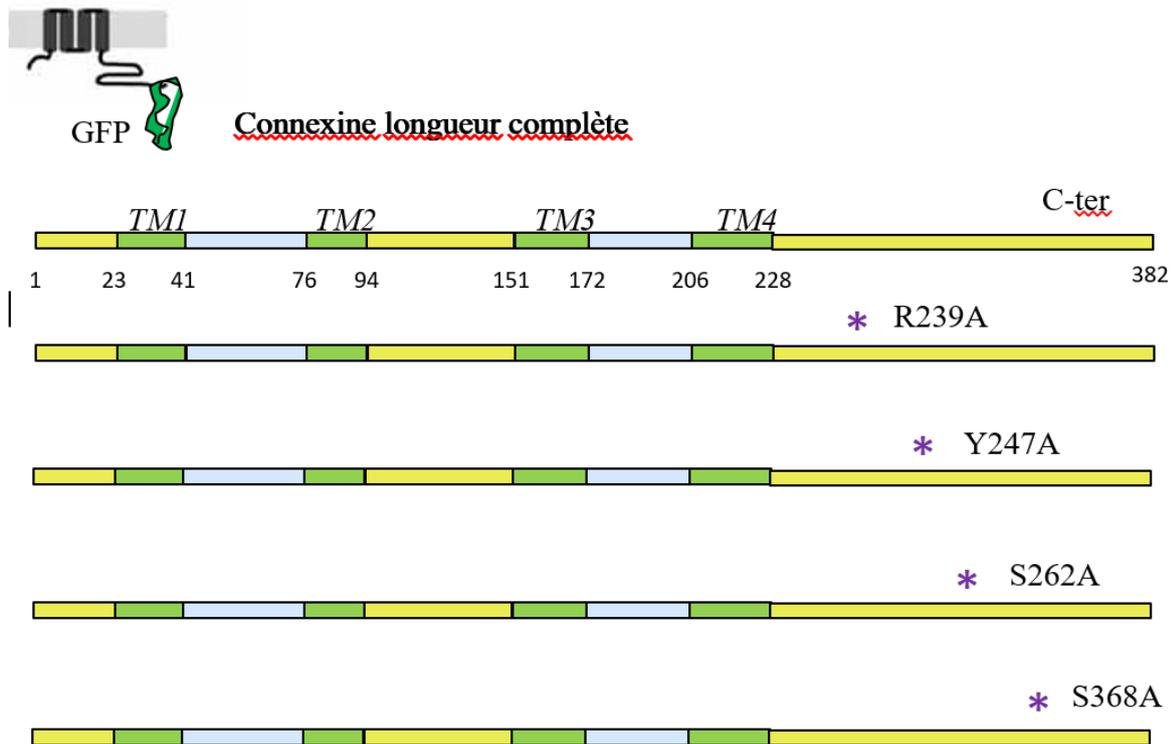
Les mutations ont été générées une à une en utilisant la construction Cx43wt comme matrice. Les ADN mutés ont été introduits chacun dans un plasmide pEGFPC-3 donnant naissance aux 4 constructions suivantes : Cx43R239A, Cx43Y247A, Cx43S262A et Cx43S368A (*figure 12*) Les substitutions en alanine (A) des différents résidus sélectionnés pour l'étude ont été introduites grâce aux amorces suivantes (les sites mutés sont en gras et soulignés) :

Mutant R239A 5'GGGCGTTAAGGATGCCGTGAAGGGAAGAAG3';

Mutant Y247A 5'GAAGCGATCCTGCCCACGCCACCACCGG3';

Mutant S262A 5'CCAAAGACTGCGGAGGCCCCAAAATATGCTTACTT3';

Mutant S368A 5'CCAGCAGAGCCGCCAGCCGCGCCAGC 3'.



**Figure 12: Représentations schématiques de Cx43 et ses isoformes mutées**

c- Les formes tronquées : Plasmides portant l'ADN codant des peptides correspondant à des parties de l'extrémité C-terminale de Cx43 (**figure 13**) :

- Ct- 228 englobant le peptide L228-I382
- Ct- 234 englobant le peptide K234-I382

Ces peptides ont été générées par PCR à partir du plasmide pEGFPC-3 Cx43wt et en utilisant les amorces suivantes

Ct-228 5'CGCAGATCTCTTCTATGTCTTCTTCAAGGGCG 3',

Ct- 234 5'CGCAGATCTAAGGGCGTTAAGGATCGCGTGAAG3'.

L'amorce anti-sens utilisée pour les deux constructions est:

5'CGCGGATCCTTAAATCTCCAGGTCATCAGGCCG3'

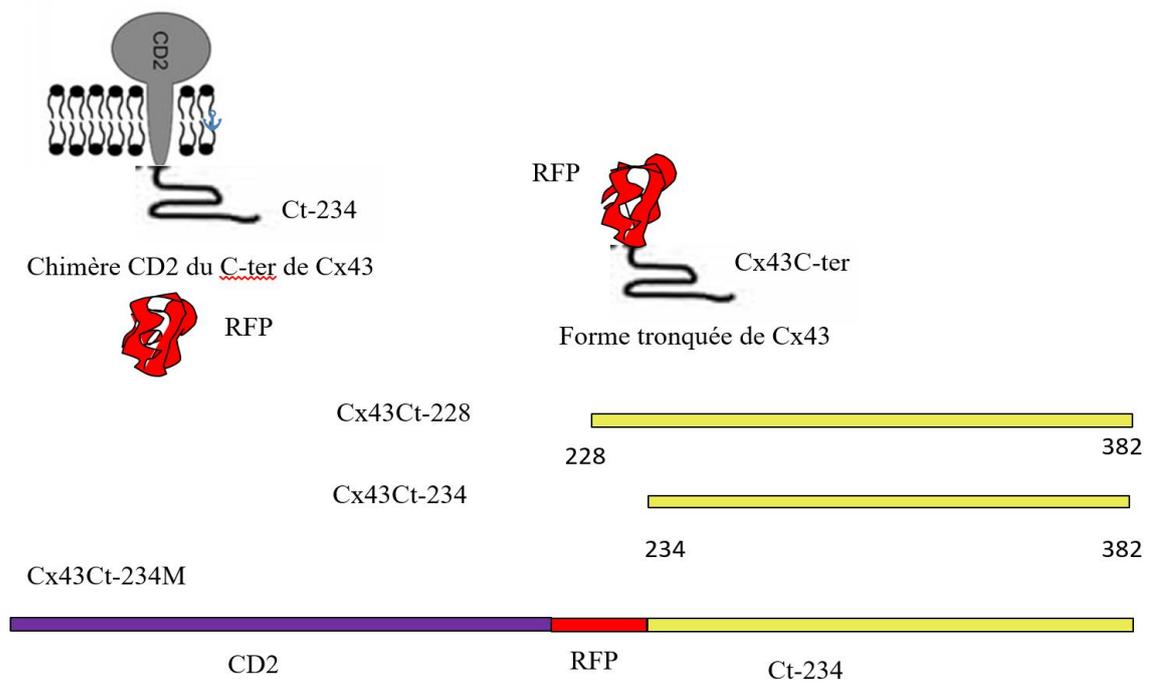
Ces ADN ont été clonés dans des plasmides à RFP (Red Fluorescent protein) le plasmide pRFP-C1 (Clontech, USA) entre les sites de restriction BglII et BamHI

- Forme tronquée adressée à la membrane (Ct-234M)

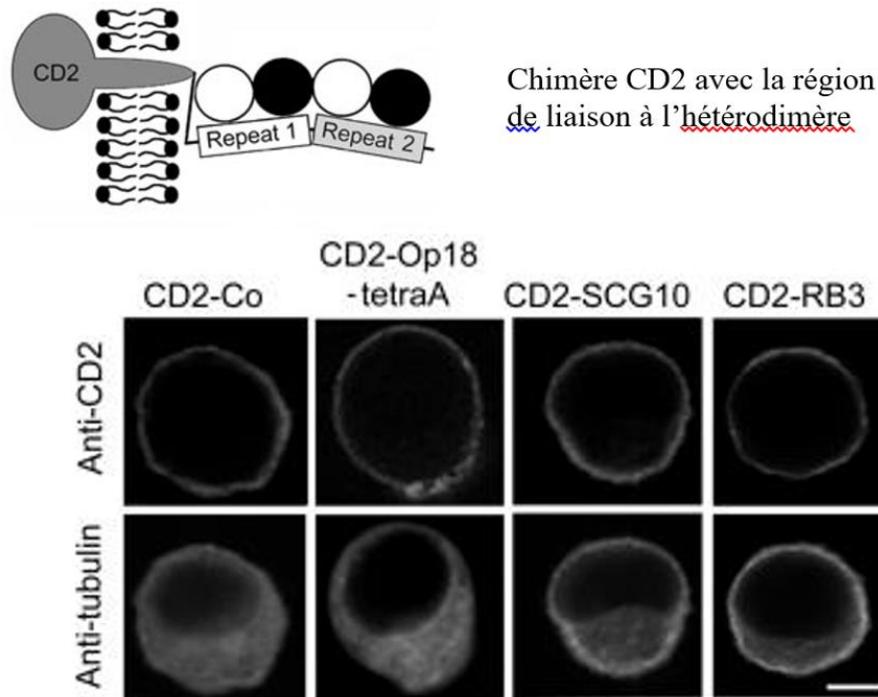
Afin d'adresser le peptide Cx43Ct-234 à la membrane plasmique, il a été fusionné à un peptide signal CD2 (**figure 13**). Cette stratégie est inspirée des travaux de **Holmfeldt et al. (2003)**. Les auteurs ont réalisé des constructions chimériques CD2, en fusionnant les ADN codant les

protéines régulatrices de microtubules op18/stathmin, SCG10 et RB3 (qui toutes forment des complexes ternaires avec les hétérodimères de tubuline), à l'ADN codant la région extracellulaire et transmembranaire de la protéine CD2 (T lymphocyte specific cell surface protein) afin de permettre la séquestration des microtubules à la membrane plasmique. Ils ont ensuite transfecté des cellules humaines K562 de lignées cellulaires de leucémies avec les vecteurs codant les différentes protéines chimériques. Les sections confocales ont montré que les chimères, détectées avec l'anticorps anti-CD2, étaient fortement exprimées à la surface des cellules (*figure 14*).

L'ADN codant la fraction CD2(Cy6) de rat permettant le ciblage des protéines à la membrane plasmique, a été obtenu à partir du plasmide « PH 113 » fourni par Gullberg M (**Holmfeldt et al., 2003**). Ce plasmide porte l'ADN codant la protéine chimérique suivante : pBS-CD2(Cy6)-Op18-d4-55-F.



**Figure 13: Représentations schématiques des peptides C-ter de Cx43**



Sections confocales représentant les cellules exprimant les chimères (localisation membranaire)

**Figure 14:** Séquestration des microtubules dans la membrane plasmique lorsque les protéines régulatrices de microtubules *Op18/stathmine*, *SCG10* et *RB3* sont fusionnées au peptide CD2 des lymphocytes T (Holmfeldt *et al.*, 2003)

Pour réaliser la construction Ct-234M (*figure 13*), la stratégie est la suivante :

PCR(1) : Permet d'obtenir l'ADN codant le peptide CD2 utilisant le plasmide PH113 comme matrice

PCR(2) : Permet d'obtenir l'ADN codant la protéine RFP fusionnée au peptide Ct-234 en utilisant le plasmide pEGFP-Cx43Ct-234 comme matrice

PCR(3) : Permet la fusion des produits de la PCR(1) et la PCR(2) en utilisant l'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermoscientific)

La ligation se fait par Topoblunt (Invitrogen) et permet ainsi d'obtenir la construction Ct-234M (M pour membranaire) : CD26-RFP-Ct-234

## 2- Techniques de clonage

- a- PCR : La PCR permet l'amplification de l'ADN d'intérêt de manière spécifique grâce au couple d'amorces qui sont conçues de manière à garantir une hybridation spécifique avec l'ADN matrice.

Pour cela il faut confectionner des oligonucléotides complémentaires à l'ADN matrice et de taille suffisante pour être spécifiques, mais elles doivent également être riches en cytosine et guanine, avec une température de fusion  $T_m$  suffisamment élevée. Les  $T_m$  des deux amorces doivent être proches. Ces propriétés physiques sont calculées grâce à des logiciels conçus à cet effet.

Dans le cas d'un clonage par PCR, il s'agit également d'introduire au niveau des extrémités de la séquence d'intérêt des sites de restriction adaptés pour permettre le clonage entre ces sites dans le vecteur d'expression.

- Milieu réactionnel

La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 50 $\mu$ L contenant 100ng d'ADN matrice, 2,5 $\mu$ L d'oligo sens à 10 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ L d'oligo anti-sens à 10 $\mu$ M, un mélange en excès des 4 nucléotides à raison de 0,8 $\mu$ L de dNTPs à 25mM, 1 $\mu$ L de Taq polymérase (Taq Dream ou Taq High fidelity selon la taille de l'ADN à amplifier afin de limiter les erreurs), 5 $\mu$ L de tampon 10X et compléter le milieu avec de l'eau.

La solution est ensuite mise dans le thermocycler et soumise au programme adéquat pendant 30 cycles (5 min à 94°, 15sec à 94°, 55° pendant 30 sec, 72° pendant 1min30sec et enfin 5min à 72°).

- b- Purification de l'ADN par la méthode phénol/chloroforme : Cette technique se déroule comme suit : Vortexer un mélange de 50 $\mu$ L de produit PCR+150 $\mu$ L de TE+200 $\mu$ L de phénol/chloroforme. Centrifuger la solution à 10.000rpm pendant 5min à température ambiante.

Prélever la couche supérieure du surnageant et y ajouter 200 $\mu$ L de chloroforme puis vortexer. Ensuite centrifuger 15sec à 10.000rpm à température ambiante.

Prélever la couche supérieure du surnageant et y ajouter 25 $\mu$ L de soduim d'acétate 3M pH 5,2. Ensuite ajouter 100 $\mu$ L d'éthanol à 100% (conservé à -20°), puis 1 $\mu$ L de glycogène. Mélanger et incubé toute la nuit à -20°. Le lendemain, centrifuger 30min à 4° à une vitesse de 12000 rpm. Laver le culot avec de l'éthanol 70% (conservé à -20°), sécher le culot et resuspendre dans 20 $\mu$ L d'eau. On obtient ainsi un produit de PCR pur débarrassé de tous les autres constituants du milieu réactionnel.

- c- Purification sur gel de l'ADN : Cette technique permet de purifier l'ADN après migration sur un gel d'agarose.

Le gel est ensuite exposé à une lampe UV pour identifier la bande d'intérêt, c'est-à-dire la bande correspondant à l'ADN d'intérêt. La bande est excisée et récupérée dans un tube eppendorf, pesée puis le gel est fondu dans un bain-Marie. La purification est réalisée selon le protocole du kit Gel Purification de Fermentas.

- d- Digestion : La digestion de l'ADN d'intérêt ainsi que du plasmide par les enzymes de restrictions permet de générer les extrémités cohésives complémentaires permettant l'assemblage du vecteur et de l'ADN d'intérêt. Mais la digestion est également utilisée pour le criblage des ADN amplifiés, ou extraits à partir des clones à la recherche de l'ADN d'intérêt.

Les ADN à digérer sont soumis à l'action des enzymes de restriction adéquates dans les conditions optimales d'activité des enzymes indiquées par le fabricant et en présence du tampon recommandé.

- e- Ligation : Permet de lier l'ADN d'intérêt au vecteur de manière covalente.

Cette réaction est réalisée dans un volume de 20 $\mu$ L du milieu contenant une quantité équivalente de l'insert et du plasmide, le tampon et bien sur la ligase T4. La réaction se fait à température ambiante pendant 1h.

En cas d'échec de la ligation, on augmente la ration insert/ vecteur.

- f- Electrophorèse : Permet de séparer et identifier les molécules d'ADN selon leurs tailles par rapport à des marqueurs de taille qui servent de référence (1kb DNA ladder Invitrogen et 100pb DNA ladder Invitrogen).

Cette technique permet de vérifier le succès ou l'échec d'une PCR, d'une digestion ou d'une ligation en vérifiant le nombre des fragments et leurs tailles

Elle consiste à faire migrer la solution contenant les molécules d'ADN sur un gel d'agarose à 1,5% obtenu en mélangeant 1,5 g d'agarose dans 100mL de tampon TBE. Le mélange est chauffé dans le microonde pour faire fondre l'agarose. Laisser le mélange refroidir un peu puis rajouter de BET ; déverser dans la cuve ou le peigne adéquat a été placé pour obtenir les puits de taille souhaitée. Plonger le gel dans le bac à électrophorèse ; puis déposer les échantillons dans les puits en parallèle aux marqueurs de tailles adéquats. La migration se fait à 200V durant 15 à 30 min. Au bout de 15min vérifier sous lumière UV si la migration désirée a eu lieu pour ne pas prolonger inutilement le temps de migration.

- g- Transformation : Permet d'introduire l'ADN recombinant (vecteur + ADN) dans des cellules bactériennes compétentes afin de permettre son amplification par culture des bactéries. La technique utilisée repose sur le choc thermique. Elle consiste à soumettre les bactéries à des changements de températures brusques ayant pour but de créer des pores permettant le passage des vecteurs à travers la membrane plasmique. Les souches utilisées sont des souches commercialisées DH5 dérivées d'*Escherichia coli* et conservées à -80°

Le protocole de transformation est le suivant : mélanger 100ng d'ADN à 50µL de solution de bactéries. Le tube contenant le mélange est gardé 30min dans un bac à glace, puis placé 45 sec à 1min dans un bain-Marie à 42°. Ensuite le tube est remis dans la glace pendant 2min. Après avoir provoqué ainsi le choc thermique, laisser les bactéries à température ambiante puis les incuber 1h à 37° avec agitation dans 950µL de LB (milieu de culture liquide lysogeny broth ou bouillon lysogène). Après l'incubation centrifuger puis enlever 100µL de surnageant et dissoudre le culot dans le volume restant.

Enfin, plater les bactéries dans une boîte d'agar contenant l'antibiotique adéquat à 50µg/mL (selon le plasmide utilisé, la kanamycine dans le cas du pGFP). Incuber les bactéries à 37° toute la nuit.

- h- Minipreps (Quiagen miniprep kit) : Permet d'extraire l'ADN recombinant d'un volume de 5mL de culture bactérienne de la souche bactérienne criblée.

L'extraction se déroule selon le protocole fourni par le fabricant sur le culot obtenu après centrifugation de la culture bactérienne (incubée pendant une nuit à 37° sous agitation) à 6000T/min pendant 15min à 4°.

- i- Midipreps (Quiagen miniprep kit) : Permet d'extraire l'ADN recombinant d'un volume de 50mL de culture bactérienne de la souche bactérienne criblée.
- j- Maxipreps (EndoFree plasmids kits, Quiagen) : Permet d'extraire l'ADN recombinant d'un volume de 200mL de culture bactérienne de la souche bactérienne transformée par l'ADN recombinant.
- k- Conservation des souches : La souche bactérienne renfermant l'ADN recombinant d'intérêt est conservée à partir de la culture

### 3- Méthodes de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémentée avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS), 2 mM de L-glutamine et 1% de streptomycine dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et à une température de 37°C.

Les différentes techniques nécessaires à la réalisation des cultures cellulaires et l'entretien des lignées cellulaires sont détaillées ci-dessous.

#### a- Décongélation d'une lignée cellulaire

Les cellules conservées à -80° dans de l'azote liquide sont décongelées dans un bain-marie à 37°. L'ampoule contenant une suspension de cellules est retirée de la cryoconservation et transférée rapidement dans le bain-marie. Aussitôt décongelée, la suspension est transférée dans un tube Falcon contenant 4ml de milieu complet FM (Full Meduim) : préchauffé à 37°. Les cellules sont centrifugées à 1000 tours/min pendant 5min afin d'éliminer le DMSO. Le culot est ensuite resuspendu dans un milieu complet préchauffé DMEM à 5% de FBS.

Les cellules sont ensuite platées dans un tube de 25cm<sup>2</sup> et mises en incubation à 37° et 5% CO<sub>2</sub>.

Le bouchon est dévissé d'un tour pour permettre une oxygénation de la culture.

Les manipulations doivent s'effectuer dans des conditions d'asepsie sous PSM.

#### b- Entretien de la lignée cellulaire

La suspension décongelée ne peut être utilisée pour des manipes qu'après un à deux repiquages. Les cellules prolifèrent en monocouche et adhèrent à leur support par leur matrice extracellulaire. Lorsqu'elles arrivent à confluence, leur multiplication s'arrête. C'est pourquoi, elles doivent être décollées pour pouvoir être transférées dans un nouveau récipient à confluence inférieure. Cette opération est appelée « passage » des cellules ou « repiquage », un moyen de maintenir la lignée cellulaire pendant plusieurs générations.

Le tapis cellulaire est décollé par « trypsinisation ». Cette étape consiste à utiliser l'activité enzymatique d'une protéase « la trypsine » pour détacher les cellules de leur support, selon le protocole suivant :

Avant de procéder à la trypsinisation l'état des cellules et le taux de confluence sont vérifiés par microscopie. Les étapes suivantes se déroulent dans des conditions d'asepsie rigoureuses sous PSM.

- Retirer le milieu de culture
- Laver le tapis cellulaire avec du PBS préchauffé à 37°

- Retirer le PBS et ajouter 1ml (dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup>) de trypsine à 0,25% et laisser agir pendant 5 à 8 minutes à l'étuve. L'état de décollement des cellules peut être vérifié au microscope.
- Aussitôt que le décollement total des cellules se produit, rajouter 5ml de milieu de culture pour arrêter l'action de la trypsine.
- Centrifuger pendant 5min à 1000T/min
- Resuspendre le culot dans 5ml de milieu de culture. Bien mélanger et disperser les cellules par des aspirations / refoulements à la pipette.
- Prélever un volume de suspension dans un tube à hémolyse, y ajouter le même volume de bleu de Trypan et procéder au comptage des cellules sur une lame de Malassez

Le but de la numération des cellules est de calculer le volume de suspension à prélever afin d'obtenir la confluence voulue au bout d'une période précise, selon le récipient utilisé et la vitesse de croissance de la lignée cellulaire.

- Ajouter le volume de milieu de culture calculé en fonction du volume de la suspension et le récipient utilisé.

Si le but du repiquage est seulement d'entretenir la culture, la numération n'est pas nécessaire. Les cultures doivent être observées au microscope tous les deux jours afin de vérifier l'état des cellules et le taux de confluence.

#### c- Transfection des cellules

L'introduction des plasmides dans les cellules sélectionnées pour cette étude est réalisée soit par transfection classique utilisant un liposome : la lipofectamine et/ou, soit par choc électrique selon le Kit AMAXA

- Transfection avec Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen, USA)

La transfection est réalisée sur milieu optiMEM dépourvu de sérum et d'antibiotique. Les doses utilisées (ADN et lipofectamine) sont adaptées selon le type cellulaire et le récipient utilisés, en tenant compte des recommandations du fabricant.

Le protocole de transfection est comme suit :

- ✓ Dans un premier temps, préparer séparément deux mélanges : ADN+optiMEM et lipofectamine+optiMEM
- ✓ Après 5min d'incubation à température ambiante, mélanger les deux solutions et laisser agir pendant 20min à température ambiante. Ce temps est nécessaire pour l'inclusion de l'ADN dans les liposomes.

- ✓ Entre temps changer le milieu de culture dans lequel baignent les cellules et le remplacer soit avec l'optiMEM ou DMEM sans antibiotique et sans sérum.
- ✓ Ensuite ajouter le mélange lipofectamine/ADN aux cellules et laisser incuber pendant 4h à l'étuve 37° et 5%CO<sub>2</sub>.
- ✓ Ensuite retirer ce milieu et le remplacer par du DMEM supplémenté de 10% de FBS, puis remettre les cellules dans l'étuve et laisser incuber 24h avant l'observation microscopique et/ou autres manipulations.
  - Nucléotransfection par le kit Amaxa Nucleofector (Lonza) : Cette méthode de transfection repose sur l'application d'un choc électrique permettant la création transitoire de pores à la surface de la membrane plasmique. L'électroporation permet d'améliorer le rendement de la transfection, néanmoins, elle fragilise les cellules et augmente leur taux de mortalité.

Le protocole utilisé est fourni par le fabricant.

#### 4- Méthodes d'immunofluorescence

Pour toute réaction d'immunofluorescence, les cellules sont d'abord préparées, selon le protocole suivant :

##### a- Fixation des cellules

Les cellules sont fixées afin de les immobiliser tout en conservant leur architecture et en les protégeant contre les contaminations microbiennes, en vue de les préparer pour les immunofluorescences et/ou l'analyse au microscope. La méthode utilisée est soit la fixation PFA soit la fixation Méthanol. Ces agents fixant permettent de dénaturer les protéines et ainsi stopper les processus des dégradations afin de conserver les cellules aussi longtemps que possible.

La fixation au PFA 4% consiste à immerger les cellules dans une solution de PFA diluée dans du PBS sucrose à 4%.

Les cellules sont au préalable cultivées dans des plaques à 4 puits dans 250µl de milieu/puits. Le milieu est aspiré et remplacé par la solution de PFA préchauffée à 37°. Cette opération doit se dérouler sous une sorbonne en raison de la toxicité des vapeurs de PFA. Après 15 à 30 minutes d'incubation à température ambiante, la PFA est aspirée sous une sorbonne à l'aide d'un pipetmain, et les cellules fixées lavées avec du PBS.

A ce stade, les cellules peuvent être conservées dans la chambre froide à 4° dans du PBS en vue d'une analyse microscopique ou un immuno-marquages ultérieurs.

## b- Perméabilisation des cellules

Cette opération permet d'une part de rendre les membranes des cellules perméables à l'anticorps grâce à l'action du triton 0,1% contenu dans la solution de blocage (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% triton X-100, 2% BSA, pH 7.5).

D'autre part, elle permet la saturation des sites non spécifiques de la protéine à marquer, grâce à l'action du BSA 2% (Bovine Serum Albumin) contenu dans cette même solution.

Les cellules fixées sont débarrassées du PBS et noyées dans 250µl de tampon de blocage pendant 1h à 37°. A ce stade, les cellules ne peuvent pas être conservées pour un immuno-marquage ultérieur. Le protocole doit se poursuivre.

## c- Immuno-marquages

Les échantillons ainsi préparés peuvent être soumis à l'immuno-marquage selon le même protocole que voici :

- L'anticorps primaire AC Iaire est dilué dans le tampon de blocage. Il s'agit de l'AC spécifique.
- ✓ Marquage anti Cx43 : AC polyclonal de lapin anti Cx43 (Abcam) dirigé contre le peptide A367-I382 appartenant au domaine C-ter de Cx43. Il est utilisé à une dilution de 1/1500
- ✓ Marquage anti-tubuline : AC monoclonal de souris anti- $\alpha$ -tubulin E7, dilué à 1/1200.
- ✓ Marquage anti du MTOC (marquage anti gamma tubulin) :
- ✓ Marquage anti-actin
- Les cellules perméabilisées sont débarrassées du tampon de blocage qui est remplacé par la solution de l'AC Iaire, puis incubées tout une nuit à 4° sous agitation. Les plaques sont couvertes de papier aluminium.
- Après cette étape, les cellules sont lavées 2 à 3 fois avec du PBS sous agitation pendant 15minutes.
- Après le lavage, les cellules sont traitées avec la solution de l'AC secondaire (AC IIaire) dilué dans le tampon de blocage. Elles sont incubées à température ambiante pendant 1h. Les plaques sont recouvertes de papier d'aluminium.

L'AC IIaire est l'AC marqué avec un fluorochrome, il doit être issu de la même espèce que l'AC Iaire :

- AC IIaire anti-goat rabbit IgG (Alexa fluor 594) dilué à 1/2500 (Invitrogen, USA)
- AC IIaire anti-goat mouse IgG (Alexa fluor 594) dilué à 1/2500 (Invitrogen, USA)

- AC IIaire anti-goat rabbit IgG (Alexa fluor 488) dilué à 1/2500 (Invitrogen, USA)
- AC IIaire anti-goat mouse IgG (Alexa fluor 488) dilué à 1/2500 (Invitrogen, USA)
- AC IIaire anti-goat mouse IgG (Alexa fluor 350) dilué à 1/500 (Invitrogen, USA)
- La dernière étape du marquage, consiste à laver les cellules avec du PBS sous agitation.
- Montage : Les échantillons marqués sont enfin prêts pour l'analyse microscopique. Pour cela, ils doivent être montés entre lame et lamelle.
- Mircsocopie

### 5- Méthodes de l'étude de la perméabilité cellulaire

L'étude de l'impact des différentes constructions (Cx43 mutées ou tronquées) sur la fonctionnalité des CGJ, a été réalisée par une méthode inspirée de la technique « de parachute » ou « préchargement » (Preloading assay) de **Goldberg et al. (1995)** (*figure 15*)

La perméabilité des canaux est testée par passage du colorant de cellules donneuses préalablement chargées vers des cellules receveuses mises en co-culture après le chargement.

Cette méthode consiste à utiliser la calcéine am (Molecular probes, USA), un colorant cellulaire infiltrant. Dans les cellules vivantes, cette molécule non fluorescente est convertie en une molécule fluorescente après hydrolyse de l'ester d'acétoxyméthyle par les estérases intracellulaires

Le principe de cette technique repose sur la co-culture de cellules « donneuses » préalablement chargées par le colorant, avec des cellules « receveuses » non chargées. La propagation du colorant dans la co-culture est une preuve de passage du colorant des cellules donneuses aux cellules receveuses et donc témoigne de la fonctionnalité des CGJ.

Cependant, s'est posé le problème de la coloration ; d'une part toutes les constructions longueur complète donnaient des protéines chimériques vertes, et la calcéine am donne également une fluorescence verte. D'autre part, les lignées cellulaires sont transfectées de manière transitoire ; et donc il ya coexistence de cellules transfectées et cellules non transfectées dans les cultures. Ces dernières expriment des connexines endogènes intactes et donc des CGJ fonctionnels. De ce fait, il devient impossible de distinguer après passage du colorant, les cellules transfectées des cellules non transfectées.

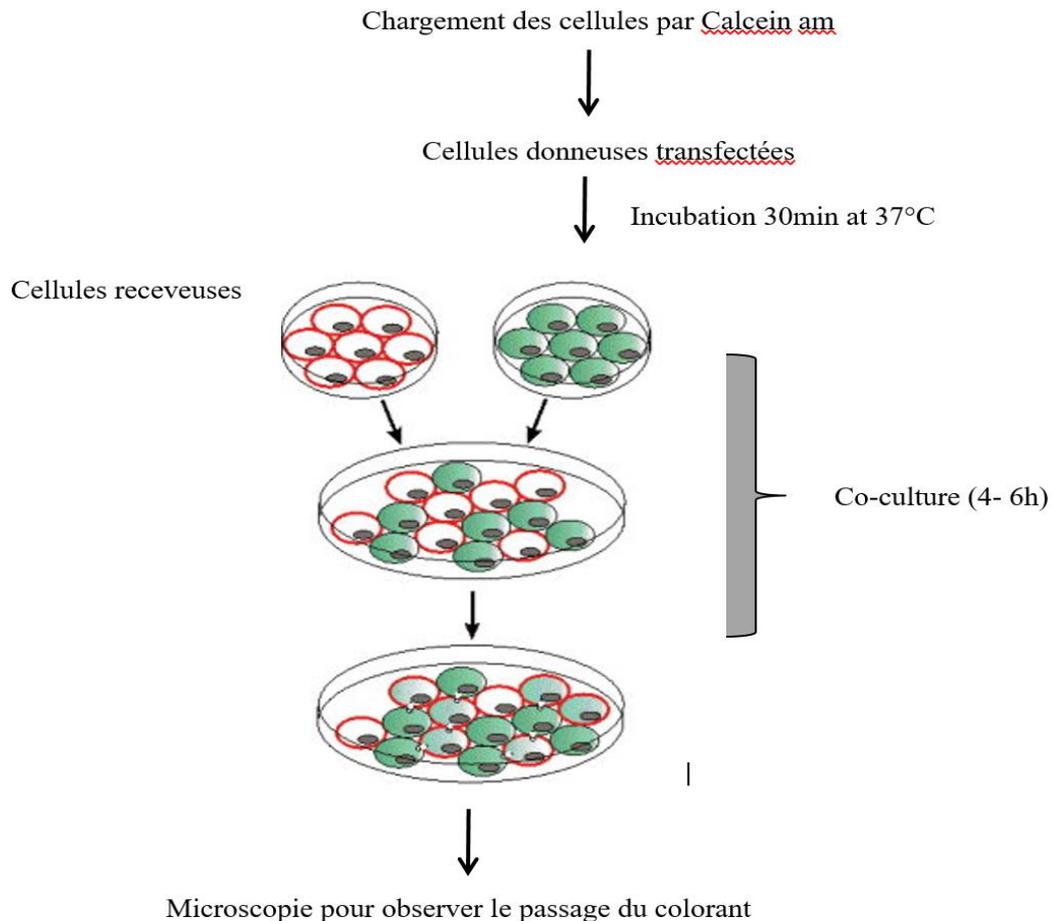
Pour remédier à ce problème de lecture :

- Ont été utilisées comme cellules donneuses, celles issues de cultures transfectées, et comme cellules receveuses celles issues de cultures non transfectées

- Les cellules n'ont été chargées par la calcéine qu'après vérification du taux de transfection (un taux de 80% de cellules transfectées est estimé satisfaisant pour mener l'expérience)
- Le mélange des deux populations de cellules dans a été réalisé dans un ratio 1 : 10. De cette manière, c'est le taux de cellules fluorescentes dans la co-culture qui renseigne sur l'impact ou non des sur la perméabilité des CGJ.

L'expérience est menée dans des conditions d'asepsie, selon le protocole expérimental suivant (*figure 15*) :

- a- La solution de calcéine am est utilisée à une concentration de 0,5 $\mu$ M
- b- Les cellules donneuses et receveuses sont platées séparément dans deux boites de 35mm<sup>2</sup>.
- c- Les cellules donneuses sont préalablement transfectées et ne seront utilisées que 24h après la transfection.
- d- Les cellules transfectées à confluence sont chargées par le colorant en remplaçant le milieu de culture par 2ml de milieu optiMEM contenant la calcéine am.
- e- Après 30min d'incubation dans l'étuve à 37° et 5% CO<sub>2</sub>, le milieu est aspiré et les cellules abondamment lavées avec du PBS préchauffé.
- f- Elles sont ensuite trypsinisées et resuspendues dans 1ml de milieu DMEM à10% de FBS. 100 $\mu$ l de cette suspension est prélevée pour servir de cellules donneuses.
- g- Les cellules non transfectées à confluence sont également trypsinisées et resuspendues dans 1ml de milieu DMEM à10% de sérum.
- h- Les cellules chargées sont mélangées aux cellules non chargées (100 $\mu$ l : 1ml)
- i- La co-culture est platée dans une boite de 35mm<sup>2</sup> et incubée à 37° et 5%CO<sub>2</sub> pendant 3h à 6h, le temps que les cellules adhèrent au support et le colorant puisse se propager entre elles.
- j- Observation au microscope à fluorescence.



**Figure 15 : Technique d'étude de la perméabilité cellulaire des gap junctions inspirée de la technique du « Parachute » (Preloading assay) (Goldberg *et al.*, 1995)**

## 6- Méthodes de l'étude de la migration cellulaire

Les cultures cellulaires pour cette analyse sont réalisées sur des boîtes de « Ibidi culture-insert ». Il s'agit de boîtes de 35mm de diamètre à surface traitée adaptée à la migration cellulaire, au milieu de laquelle se trouve un insert en silicone détachable à deux puits d'inserts en silicone collé sur une surface de culture cellulaire, et qui fournit deux réservoirs de culture séparés par une paroi épaisse de 500  $\mu\text{m}$ . Les cellules sont cultivées dans les deux réservoirs puis l'insert est détaché. Il en résulte deux surfaces de cellules définies avec précision, qui sont séparées par une zone qui est exactement de la même largeur que la paroi de séparation. Cet espace stable, propre, bien défini et sans cellules constitue la « blessure » (*figure 16*).

L'expérience est menée selon le protocole expérimental suivant (*figure 16*) :

- a- Les cellules sont d'abord transfectées après 24h d'incubation à 37° et 5% de  $\text{CO}_2$  et mises en culture dans des boîtes de 35mm

- b- Les cellules sont trypsinisées et mises en culture dans les puits de l'insert Ibidi. Les cellules sont d'abord comptées afin d'obtenir une confluence à 90% après 24h d'incubation dans les deux puits.
- c- L'insert est détaché délicatement à l'aide d'une pince, les cellules lavées puis :
- d- Placées sous vidéo microscopie pendant 24h à 48h dans des conditions de culture 37° et 5%CO<sub>2</sub>
- e- Incubées pendant 5h à 37° et 5% CO<sub>2</sub> afin de permettre leur migration. Elles sont ensuite fixées pour les différents immuno-marquages.

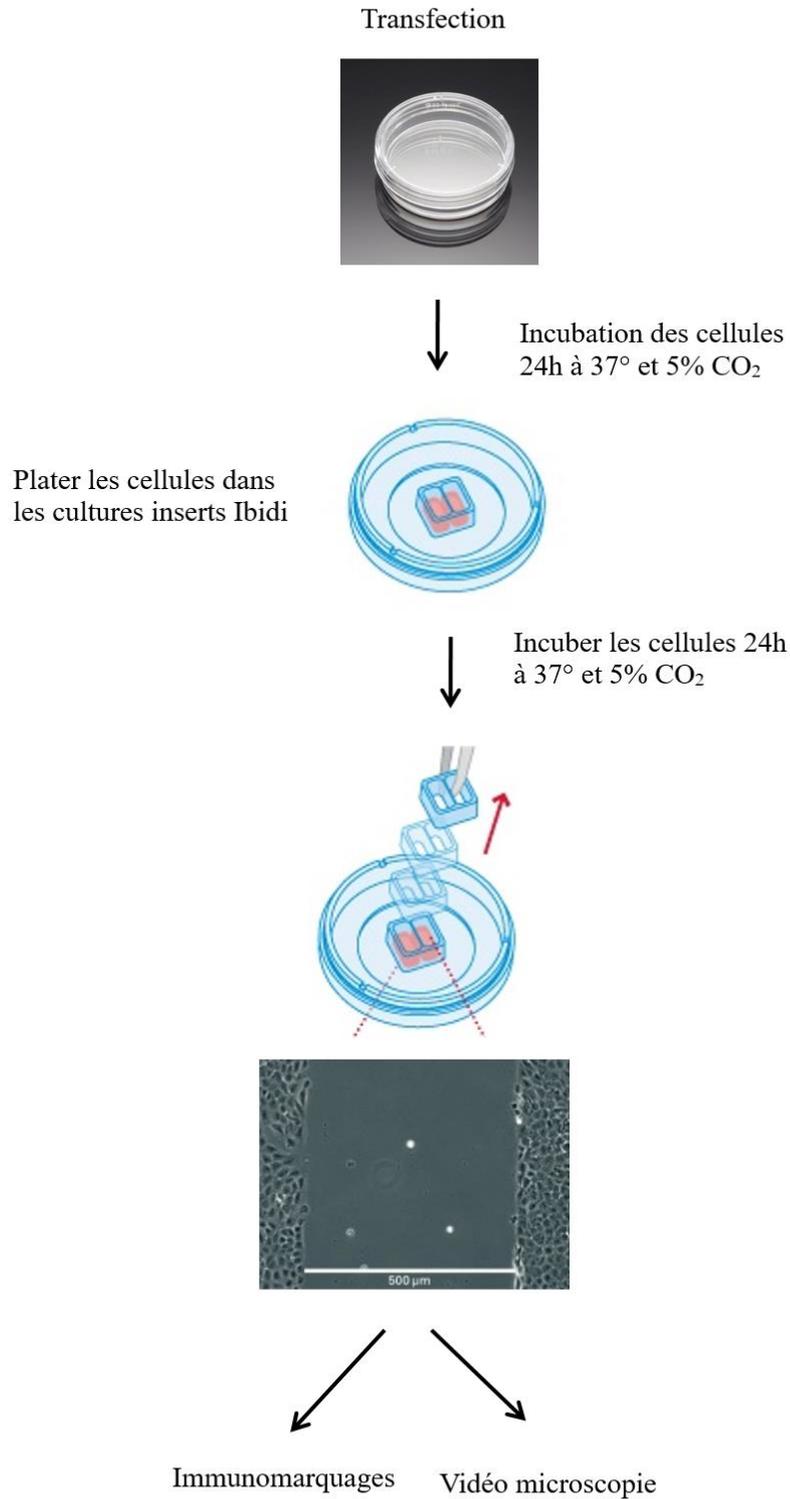
### 7- Analyse des images et vidéos

L'analyse des images a été réalisée par le logiciel *Image J* (Schneider et al., 2012).

Concernant les vidéos time-lapse, le suivi des trajectoires des cellules individuelles migrant, a été réalisé par le *Manual Tracking plugin* de Image j, un logiciel qui permet à l'utilisateur de quantifier le mouvement des objets entre les images d'une pile temporelle. Il permet de récupérer dans un tableau les coordonnées XY et XYZ. Les données ainsi récoltées, ont été utilisées pour quantifier le mouvement des cellules grâce à un logiciel d'analyse de la migration, *Chemotaxis and Migration Tool 2.0* de Ibidi.

### 8- Analyse statistique

Pour analyser la migration cellulaire et déterminer l'impact des différentes mutations et des peptides C-ter, nous avons comparé pour chaque type cellulaire, les différents paramètres quantifiés pour chaque isoforme, en utilisant le test de Tukey. Ce test de comparaisons multiples, est utilisé pour savoir s'il existe ou non une différence significative entre plusieurs groupes de moyennes.



**Figure 16: Protocole expérimental pour l'étude de la migration cellulaire par la technique du « Wound healing » (Réparation de la plaie)**

### 9- Recherche de signature moléculaire spécifique

Afin de rechercher la présence potentielle de peptides signal qui permettent l'adressage des Cx43C-ter à la membrane plasmique/noyau, nous avons consulté les programmes et les serveurs suivants pour la prédiction de peptides signal, des sites de clivage et de localisation subcellulaire:

Phobius: Une topologie transmembranaire combinée à un prédicteur de peptide signal (<http://phobius.sbc.su.se/>); PrediSi: Prédiction de peptides signal (<http://www.predisi.de/>); WOLF PSORT: Outil avancé de prédiction de protéines de localisation subcellulaire (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>); SignalP 4.0 serveur (**Petersen et al., 2011**); Cible P (**Emanuelsson et al., 2000**) et CELLO (**Yu et al., 2006**)

## **1- Expression et localisation des mutants Cx43 longueur complète des peptides C-ter dans les cellules HeLa, MDCK et NRK**

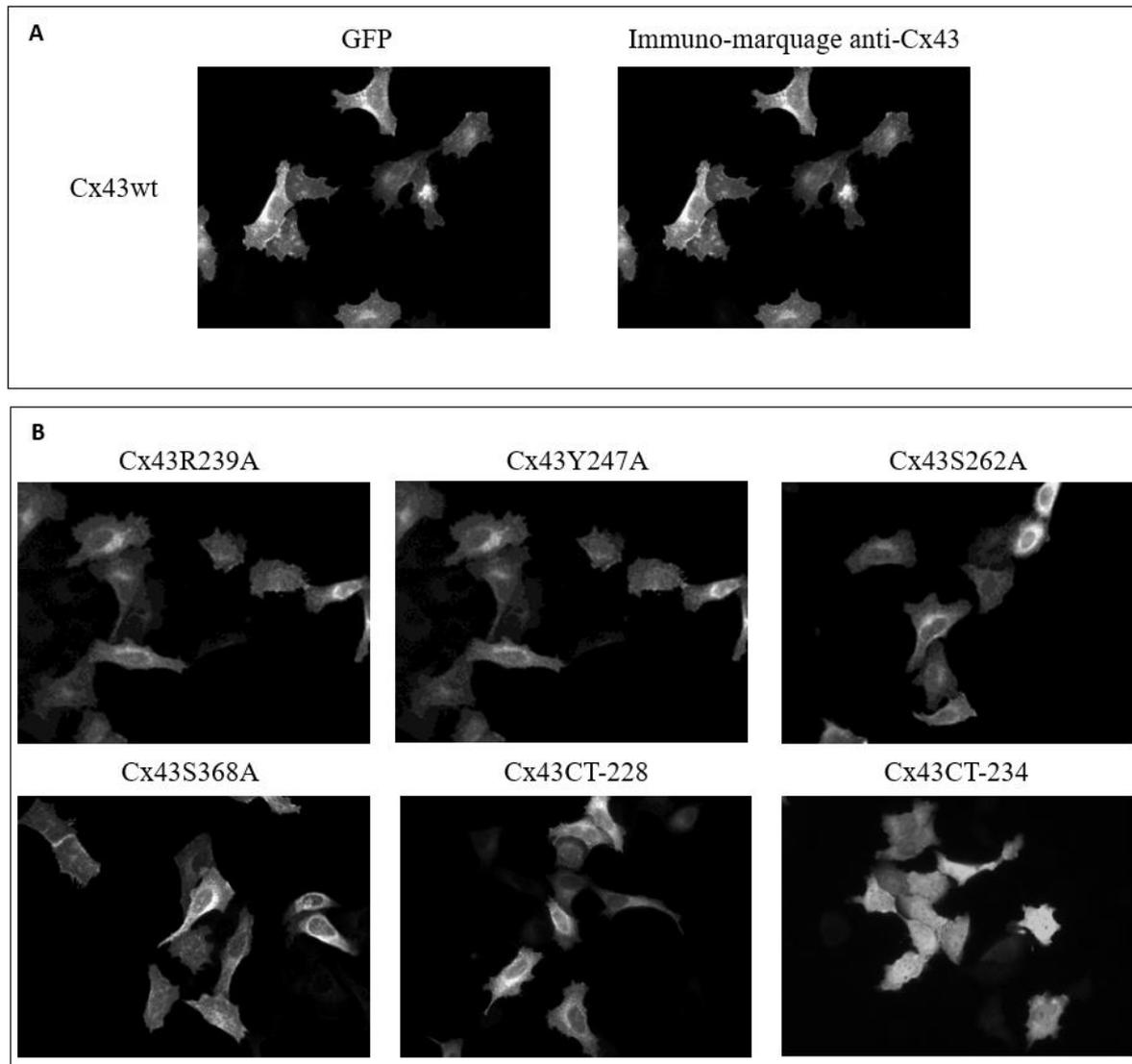
Le taux d'expression et la localisation de Cx43 sauvage, des formes mutantes longueur complète, ainsi que des formes tronquées ; ont été analysés sur trois types cellulaires. L'examen est basé sur l'observation au microscope de l'intensité de la fluorescence GFP/RFP.

Au début de l'expérimentation, les cellules HeLa ont été choisies comme modèle cellulaire pour étudier l'impact des mutations de Cx43 sur l'assemblage, le transport et les fonctions de cette connexine. En effet, les cellules HeLa n'expriment ni Cx43 ni aucune autre connexine, et donc ne forment pas des GJ (**Elfgang et al., 1995 ; Eckert et al., 1993**). Ceci facilite l'interprétation des résultats, puisque l'absence de connexines endogènes normales, exclue l'intervention potentielle de mécanismes de compensation capables d'annuler les effets des mutations étudiées.

Pour cette même raison, nous avons réalisé l'immuno-marquage de Cx43 dans les cellules HeLa qui en sont dépourvues, afin de confirmer que le signal de fluorescence observé correspondait bel et bien aux formes surexprimées. L'anticorps anti Cx43 utilisé à cette fin, reconnaît un épitope situé sur l'extrémité C-terminale de Cx43 s'étendant du résidu 367 au résidu 382.

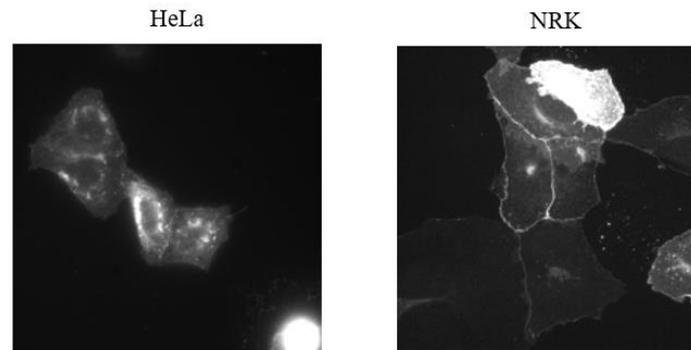
Les résultats ont montré que même si la connexine 43 avait une localisation intracellulaire dans les cellules HeLa, sa présence au niveau de la membrane plasmique est extrêmement limitée (**figure 17**). Cette observation suggère que le transport des connexons de Cx43 vers la membrane et/ou la formation des GJ sont très limités dans ce type cellulaire.

Pour cette raison, les expérimentations ont été poursuivies dans deux autres types cellulaires, qui expriment plusieurs connexines dont la Cx43, MDCK et NRK (**figure 18**)



**Figure 17: Localisation de Cx43wt et les différentes formes mutantes ainsi que les peptides tronqués dérivés du C-ter de Cx43 dans les cellules HeLa**

**A.** Pour la protéine Cx43wt, la co-localisation de la protéine taguée avec la GFP et la protéine surexprimée révélée par l'anticorps anti-Cx43, certifie que le signal fluorescence GFP correspond à la protéine surexprimée Cx43wt comme le montre la figure. **B.** Le signal GFP a montré une localisation intracellulaire pour les protéines Cx43 longueur complète et les peptides C-terminaux, avec une faible localisation membranaire, sauf pour la forme Ct-234 qui présente une localisation intranucléaire prédominante.



**Figure 18: Expression et localisation de la protéine Cx43wt dans les cellules HeLa et les cellules NRK**

*Dans les cellules HeLa, le signal fluorescence GFP apparaît principalement au niveau du cytoplasme et près du noyau et très faiblement au niveau de la membrane plasmique. En revanche, les cellules NRK présentent un marquage péri-nucléaire faible mais un signal membranaire très marqué.*

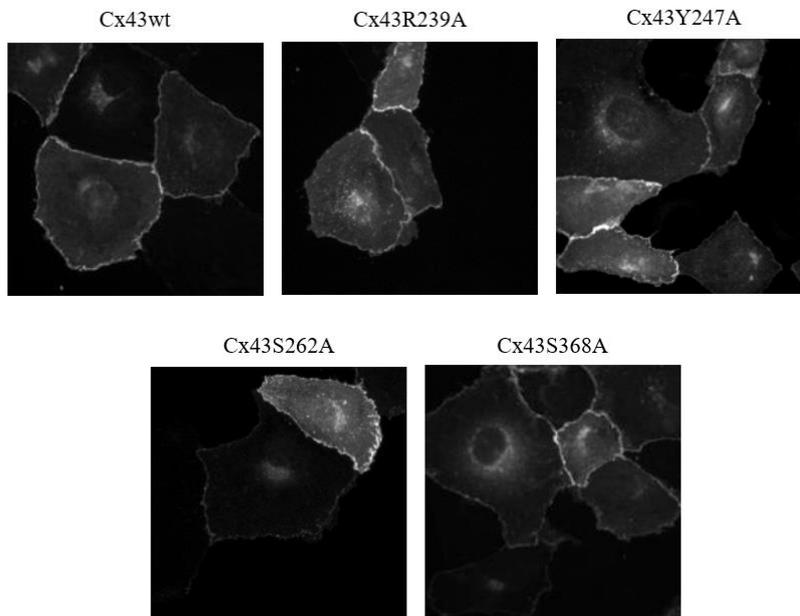
Les conversions alanine ne semblent pas affecter le transport des néo-connexons et la formation des PGJ. En effet, tous les mutants exhibent la même distribution que la forme sauvage, c'est à dire une localisation péri-nucléaire faible et une localisation membranaire marquée.

Dans ces types cellulaires, les formes longueur complète, sauvage et mutées, exhibent une localisation péri-nucléaire et membranaire (*figures 17 et 19*). Ce profil correspond probablement à la présence de ces isoformes dans l'appareil de Golgi et au niveau des plaques de GJ. Ces observations, concordent avec le fait que les connexines 43 sont assemblées dans l'appareil de Golgi en connexons puis délivrées à la membrane plasmique pour la formation de GJ avec les cellules adjacentes et éventuellement des hémicanaux.

Par ailleurs, il semble que la conversion en alanine de résidus phosphorylables (Y247, S262 et S368), potentiellement impliqués dans le transport des connexons et/ou la formation de GJ n'a aucun impact sur ces processus. En effet, aucune différence concernant l'expression et la localisation de ces isoformes dans les différents types cellulaires n'est observée (*figure 19*)

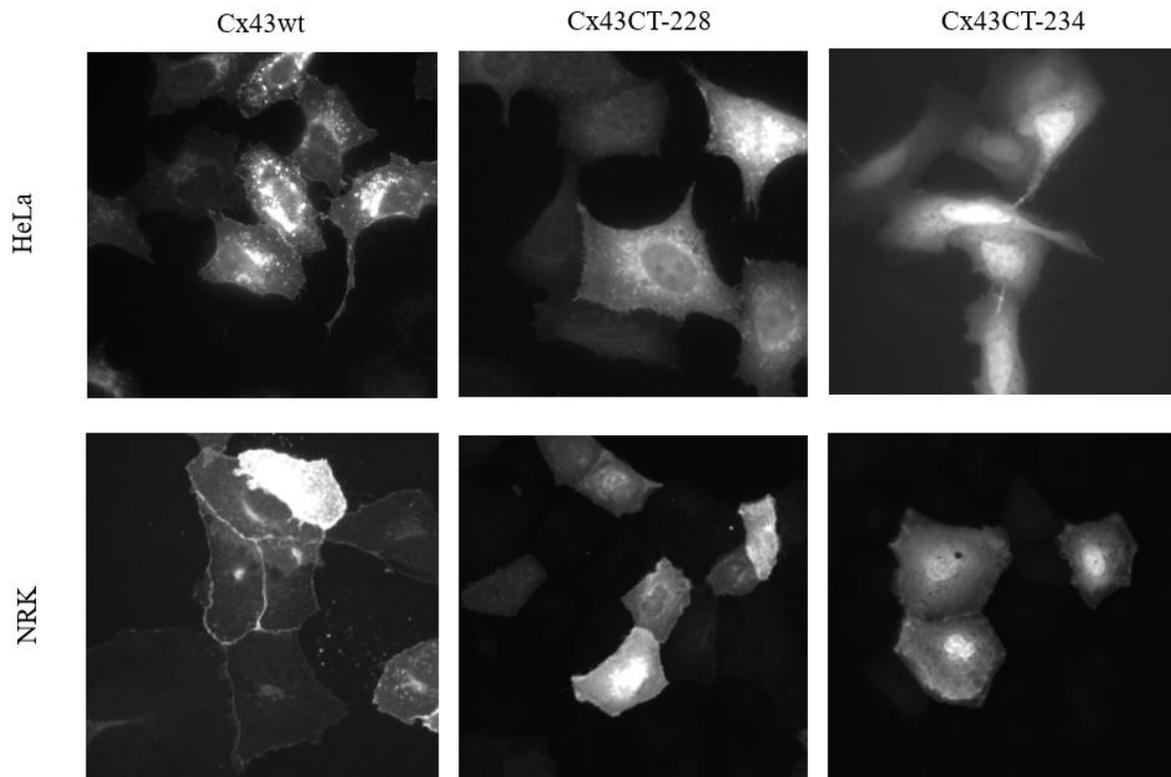
Il semblerait aussi que les mutations au niveau de sites potentiellement impliqués dans l'interaction Cx43/tubuline/microtubules, n'impactent pas l'adressage à la membrane des mutants R239A et Y247A, qui présentent exactement le même profil d'expression et de localisation observés pour la forme sauvage et les autres mutants (*figure 19*).

Cependant, pour les peptides Ct-228 et Ct-234, qui ne diffèrent que par six acides aminés hydrophobes au niveau de leur séquence, le profil de distribution est spécifique pour chaque peptide. En effet, la forme longue est capable de migrer vers la membrane et s'y localiser, tandis que la forme courte est caractérisée par la prédominance de sa localisation au niveau du noyau (*figure 20*).



**Figure 19: Distribution et localisation des protéines Cx43wt et ses formes mutantes longueur complète dans les cellules NRK**

*La fluorescence GFP très marquée au niveau de la membrane plasmique et l'interface intercellulaire, indique que tous les isoformes mutants Cx43 longueur complète sont capables de se déplacer de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique et former des PGJ. Tous les mutants exhibent la même distribution que la forme sauvage, c'est à dire une localisation périnucléaire faible et une localisation membranaire marquée.*



**Figure 20: Distribution et localisation des deux peptides dérivés du domaine C-ter de Cx43 dans les cellules HeLa et les cellules NRK**

*Le peptide Cx43C-ter long, Ct-228, se retrouve à la membrane plasmique, tandis que le peptide court Ct-234, est principalement présent dans le noyau et le cytosol.*

## **2- Impact de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur la perméabilité des gap jonctions**

Afin de tester la perméabilité des GJ, la méthode de pré-chargement « Preloading assay » ou technique dite du « Parachute » a été utilisée. Le but de cette manipe est d'investiguer l'impact de l'expression des différents isoformes sur la fonctionnalité des canaux, en particulier ceux dont les résidus mutés correspondent à des sites phosphorylables connus pour leur rôle dans la régulation de la perméabilité des canaux de GJ.

Cette technique permet de visualiser la propagation de colorant parmi les cellules de la co-culture. Elle consiste à mélanger dans une même boîte deux populations de cellules : cellules « donneuses » préalablement chargées par la calcéine AM avec des cellules dites « receveuses ». Le passage du colorant vert via les GJ atteste de la perméabilité et donc la fonctionnalité des canaux de GJ.

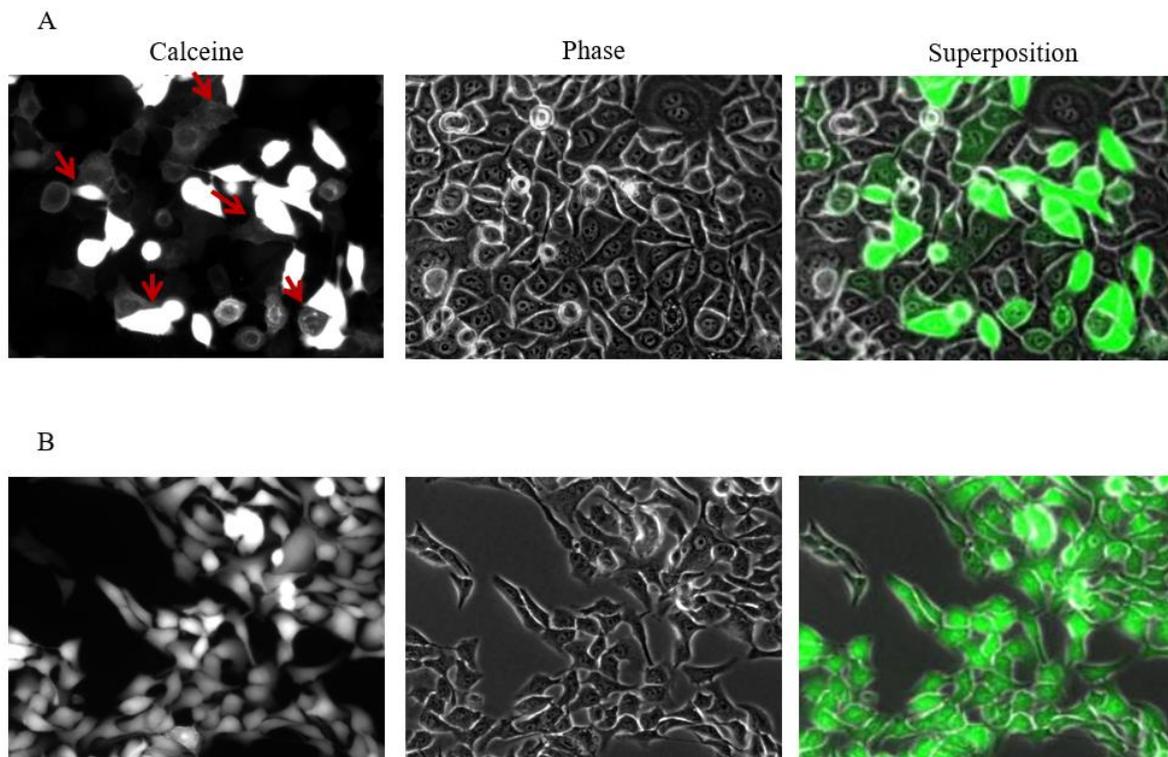
Dans le protocole suivi, les deux populations de cellules sont préalablement transfectées lorsque la manipe est réalisée sur des cellules HeLa. Comme il été déjà évoqué plus haut, ces cellules sont dépourvues de GJ et de ce fait la propagation du colorant ne peut être observée. C'est pourquoi, la Cx43wt a été surexprimée dans ces cellules afin qu'elles puissent former des canaux potentiellement fonctionnels. Pour tester l'impact des différents isoformes, les cellules donneuses sont transfectées avec la forme sauvage et les cellules receveuses avec le mutant étudié.

Pour les cellules NRK et MDCK, seules les cellules receveuses sont transfectées par les différents isoformes testés puisque ces cellules expriment naturellement les connexines et donc forment des GJ fonctionnels.

Après 24h de transfection, les cellules donneuses sont chargées avec la calcéine am, puis mises en co-culture 30min plus tard avec les cellules receveuses, dans un ratio de 1/10. Après 3h à 6h d'incubation, on procède à l'observation au vidéo microscope des cellules vivantes pour évaluer la propagation du colorant parmi les deux populations de cellules.

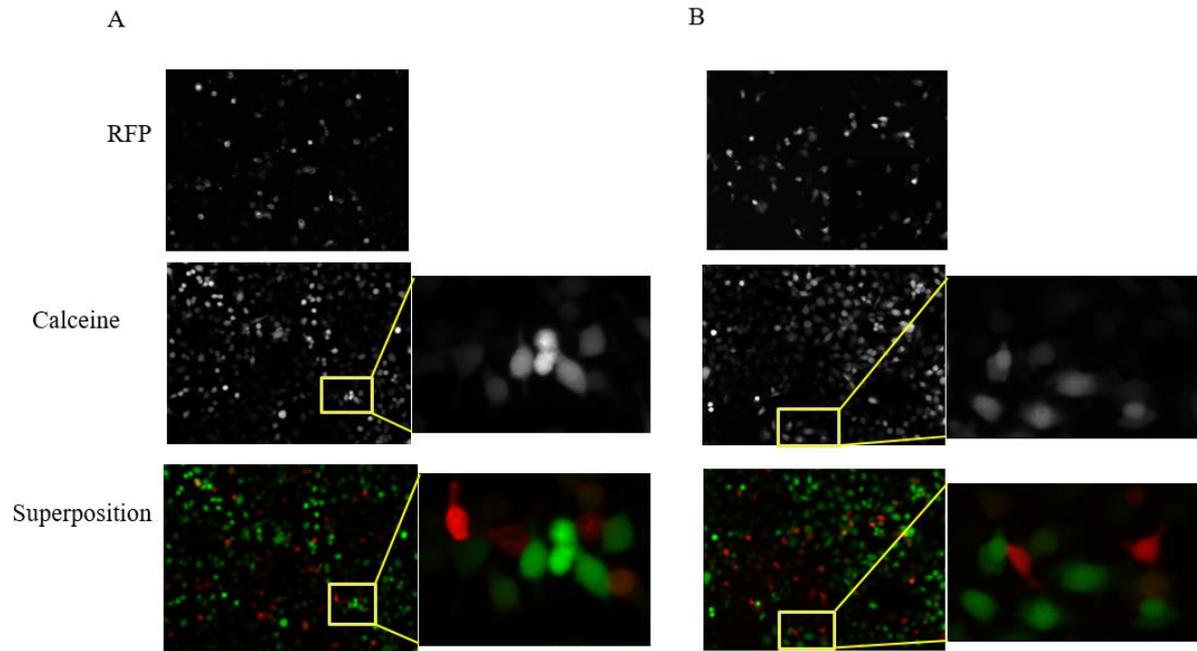
Comme attendu, les résultats ont montré que les cellules HeLa n'échangent pas de colorant entre elles ou avec les cellules NRK et/ou MDCK (*figure 21*), même quand elles sur-expriment la forme Cx43 sauvage.

Cependant, une propagation du colorant est observée parmi les cellules qui expriment les connexines endogènes, aussi bien celles qui sur-expriment la forme Cx43 sauvage que celles qui sur-expriment les formes mutantes (*tableau 1*). Il semblerait que la conversion de sites phosphorylables en alanine n'affecte pas la fonctionnalité des GJ dans les cellules NRK et MDCK, comme en atteste le passage du colorant entre les cellules de co-cultures homogènes (NRK/NRK et MDC/MDCK) et/ou hétérogènes NRK/MDCK. A l'inverse, la sur-expression des peptides C-ter semble perturber la perméabilité des canaux en empêchant le passage du colorant entre les cellules en contact (*figure 22 et tableau 1*).



**Figure 21: Test de la fonctionnalité des gap junctions par la méthode du “Parachute” (Preloading assay) sur les cellules HeLa et NRK transfectées par le plasmide Cx43wt**

Les cellules sont transfectées avec le plasmide Cx43wt. Après 24h d’incubation, les cellules réceptrices sont co-cultivées avec les cellules donneuses avec un ratio de 1:10. Les cellules donneuses sont préalablement chargées avec la calceine am avant d’être mélangées avec les cellules réceptrices. **A.** Le colorant ne se propage pas des cellules donneuses aux cellules réceptrices (flèches dans les images calceine) ce qui indique que les GJ ne sont pas fonctionnelles chez les cellules HeLa. **B.** Le passage du colorant entre les cellules NRK est évident et témoigne de la perméabilité et donc la fonctionnalité des CGJ au niveau de ces cellules.



**Figure 22: Test de la fonctionnalité des gap junctions par la méthode du “Parachute” (Preloading assay) sur les cellules NRK transfectées par les plasmides codant les peptides tronqués C-ter**

Les cellules donneuses non-transfectées et préchargées par la calceine am (en vert sur les images de superposition) sont mélangées avec des cellules transfectées (en rouge sur les images de la superposition). La surexpression des peptides Cx43 C-ter, aussi bien la forme longue Cx43-Ct228 (A) que la forme courte (B) bloque la propagation du colorant inhibant ainsi la perméabilité des CGJ.

**Tableau 1: La communication intercellulaire via les gap junctions de Cx43 dans les cellules NRK (testée par la méthode de préchargement)**

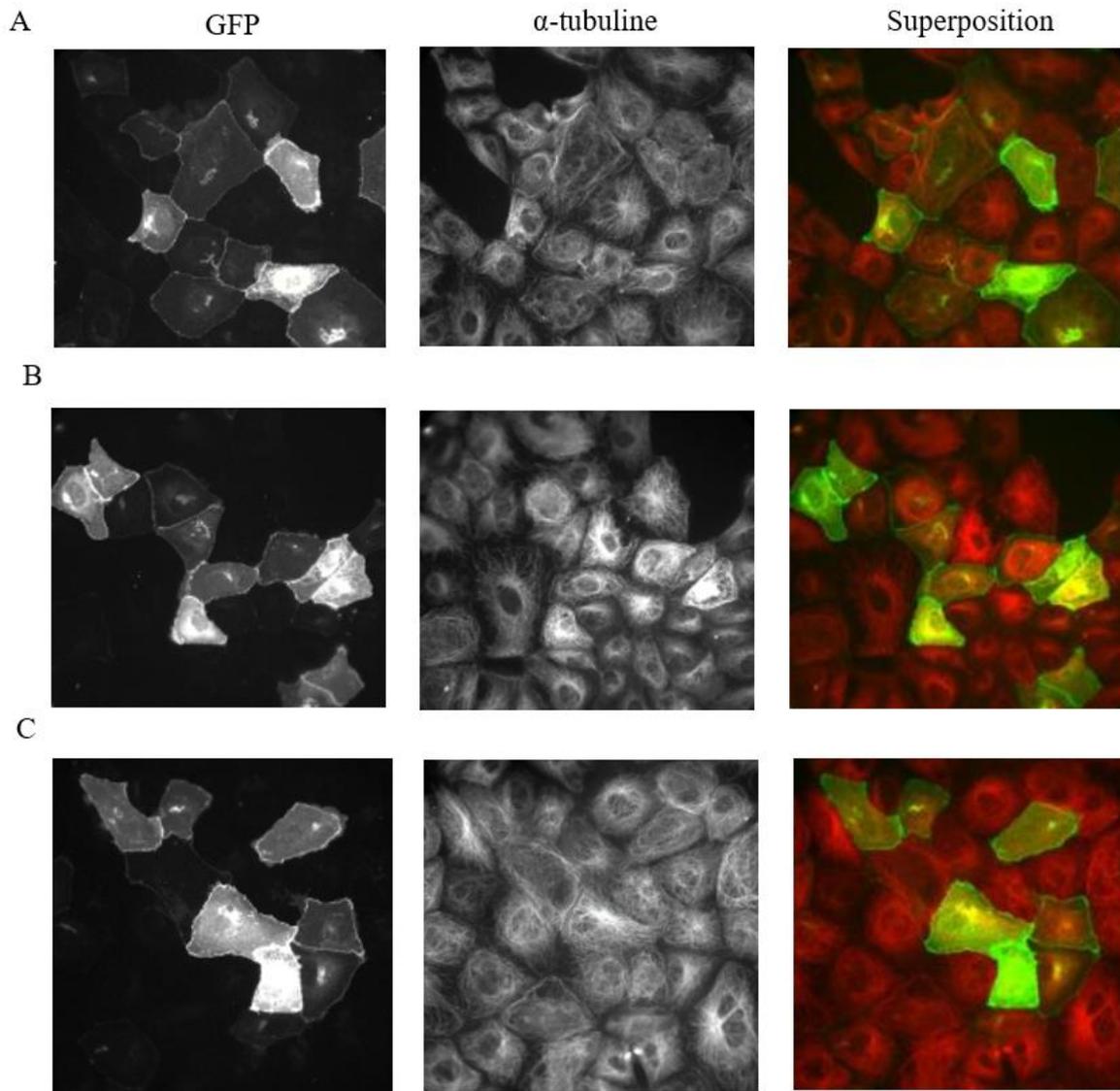
Cellules réceptrices	Transfert de Calceine
Non transfectés	+++
Cx43wt	+++
Cx43Y247A	+++
Cx43R239A	+++
Cx43S262A	+++
Cx43S262A	+++
Cx43CT-228	-
Cx43CT-234	-

Sont reportés sur le tableau les résultats du passage de colorant de cellules donneuses (non transfectées et préchargées par la calceine am) aux cellules receveuses (transfectées avec les différents isoformes) dans des co-cultures homogènes de cellules NRK.

### **3- Effets de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur l'organisation du réseau de microtubules**

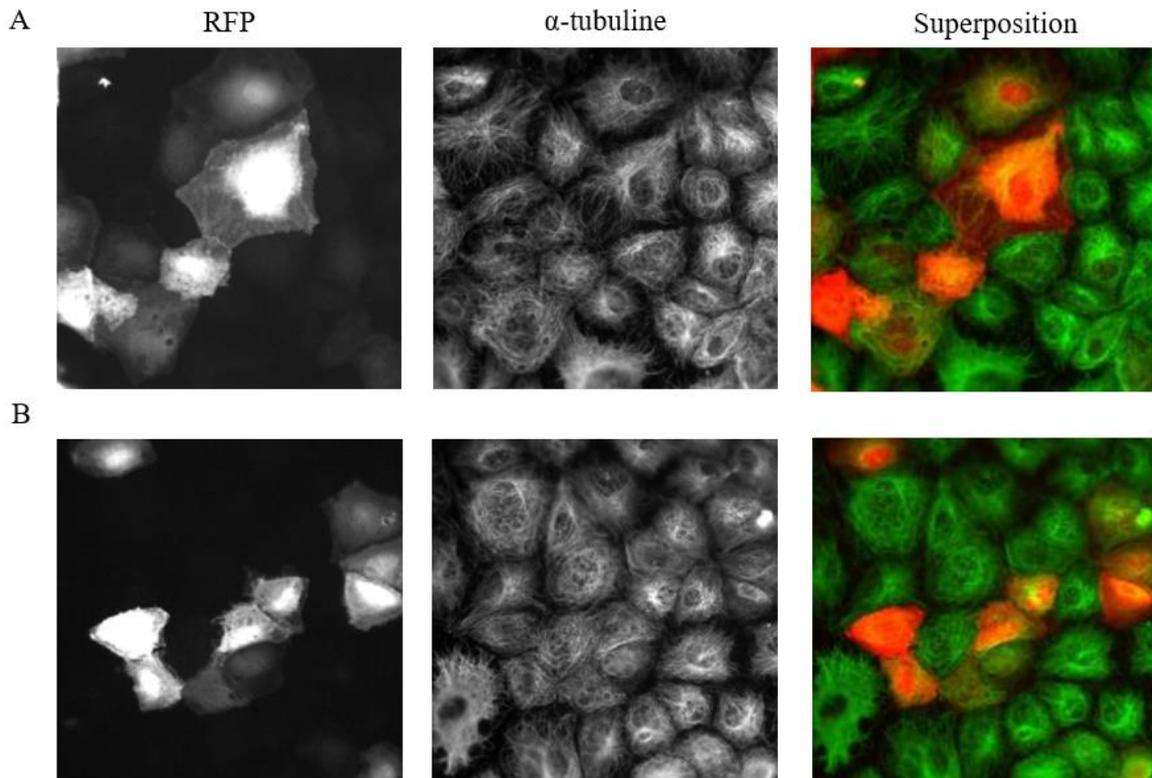
Comme il a été déjà mentionné, les résidus de la queue C-terminale concernés par cette étude, sont impliqués dans la migration cellulaire et/ou l'interaction spécifique de Cx43 avec les microtubules/tubuline. Selon l'étude réalisée par **Saidi Brikci-Nigassa et al.(2012)**, les deux résidus R239 et Y247 jouent un rôle critique dans cette interaction.

En convertissant ces sites en alanine, nous pensions abolir cette interaction et éventuellement perturber l'organisation du réseau de microtubules. Cependant, les résultats de marquage de la  $\alpha$ -tubuline, ont montré que ni les isoformes mutés longueur complète, ni les peptides tronqués n'exercent un effet négatif sur l'organisation du cytosquelette de microtubules (*figures 23 et 24*).



**Figure 23: Effets des mutations R239A et Y247A de Cx43 sur l'organisation du réseau de microtubules dans les cellules NRK**

*Le marquage des microtubules (rouge) des cellules transfectées (vert) avec les plasmides Cx43wt (A), Cx43R239A (B) et Cx43Y247A (C) montre que la conversion en alanine des résidus impliqués dans l'interaction de Cx43 avec la tubuline/microtubules, ne modifie pas l'organisation générale du cytosquelette de microtubules.*



**Figure 24: Effets de la sur-expression des peptides C-ter sur l'organisation du réseau de microtubules dans les cellules NRK**

Le marquage des microtubules (rouge) des cellules transfectées (vert) avec les plasmides Ct-228 (A) et Ct-234 (B) montre que la sur-expression des peptides correspondant au domaine C-ter de Cx43 ne modifie pas l'organisation générale du cytosquelette de microtubules.

#### **4- Effets de la Cx43wt, des variants mutants et des formes tronquées sur la migration cellulaire**

Afin d'analyser l'impact de Cx43 et/ou son C-ter, sur la migration et la polarisation cellulaires, nous avons surexprimé les différents plasmides dans trois modèles cellulaires pour chaque construction, puis, nous avons effectué l'essai du « wound healing » ou « essai de la cicatrisation » qui consiste à créer une blessure sur une monocouche de cellules confluentes, puis de suivre la migration des cellules qui envahissent le gap ainsi créée, par vidéo microscopie en temps réel. Cette approche est inspirée de la cicatrisation des blessures *in vivo*. Elle consiste à créer une lésion dans un tapis cellulaire afin d'inciter les cellules à migrer et proliférer pour combler le vide en mimant le processus de cicatrisation.

Cette blessure peut être créée manuellement en rayant la monocouche de cellules par le bout d'un cône, ce qui a l'inconvénient de générer des gaps de diamètres différents à chaque essai, et surtout de stresser les cellules aux bords de la blessure et parfois détacher les cellules de la boîte où elles sont cultivées. Afin de pallier à ces contraintes qui peuvent interférer avec les paramètres de la migration et empêcher la reproductibilité du test, nous avons mené nos essais sur les boîtes Ibidi spécialement conçues pour ce type de test et qui permettent de créer un gap de même largeur, qui sera comblé par les cellules qui migrent.

Cette migration est alors suivie par vidéo microscopie en temps réel dans des conditions physiologiquement adaptées (température de 37°, 4% de CO<sub>2</sub> et humidité). Une photo est prise chaque 15 minutes sur une durée minimale de 24, maximale de 72h.

Trois vidéos sont réalisées pour chaque isoforme dans chaque type cellulaire. Toutefois, toutes les vidéos n'ont pas pu être exploitées en raison de problèmes techniques. Comme par exemple des dérèglements de la caméra qui interrompent le suivi de la migration. Par ailleurs, la transfection étant transitoire, le signal GFP ou RFP peut s'éteindre ce qui rend impossible la traque des cellules.

L'analyse des vidéos ainsi obtenues par le logiciel Image J et plus précisément le logiciel « Manual tracking », permet de suivre une cellule depuis le début de la migration jusqu'à l'interruption de la vidéo, juste en cliquant sur la cellule en déplacement. Pour chaque vidéo, un minimum de 20 cellules sont ainsi traquées pour les cultures où le pourcentage de transfection est faible, plus de 60 cellules pour les cultures avec un pourcentage de transfection moyen ou élevé. Les coordonnées des cellules ainsi traquées sont ensuite soumises à un programme Ibidi d'analyse de la migration « Chemotaxis and Migration tool ». Pour chaque cellule des mesures quantitatives de la migration sont ainsi obtenues, permettant la quantification de la migration par la vitesse, le déplacement et la directionnalité du mouvement. Les moyennes de ces mesures ont servi aux comparaisons multiples par le test de Tukey qui nous a permis de comparer entre la migration des cellules en fonction des différents types cellulaires et des différents isoformes de Cx43 étudiés.

Les résultats de l'analyse statistique par le test de Tukey ont révélé une hétérogénéité entre les différents types cellulaires quant à l'impact des différents isoformes sur les paramètres de la migration (*annexes 1, 2 et 3*). Les résultats des différentes comparaisons effectuées sont résumés sur les *tableaux 2 et 3*.

Les résultats ci-dessous, sont présentés en fonction de trois angles différents ; en effet, nous les avons comparés :

**Tableau 2: Impact de Cx43 et ses isoformes sur les paramètres de la migration cellulaire (témoin : cellules non transfectées)**

Paramètres isoformes Cx43	HeLa					MDCK					NRK				
	D	CM	DE	DA	V	D	CM	DE	DA	V	D	CM	DE	DA	V
Cx43wt	-	NS	-	-	-	-	NS	-	NS	-	-	NS	+	+	+
Cx43R239A	/	/	/	/	/	-	NS	-	+	-	-	NS	+	+	+
Cx43Y247A	-	-	-	+	NS	/	/	/	/	/	-	NS	+	+	+
Cx43S262A	/	/	/	/	/	-	NS	-	+	-	-	NS	+	+	+
Cx43S368A	/	/	/	/	/	-	NS	-	+	-	-	NS	-	NS	-
Ct-228	-	NS	-	-	NS	-	NS	-	-	-	-	NS	+	+	+
Ct-234	-	-	-	+	-	-	NS	-	+	-	-	NS	+	+	+
Ct-234M	/	/	/	/	/	-	NS	NS	+	-	-	NS	+	+	+

**Tableau 3: Impact de Cx43 et ses isoformes sur les paramètres de la migration cellulaire (témoin : cellules sur-exprimant la Cx43wt)**

Paramètres isoformes Cx43	HeLa					MDCK					NRK				
	D	CM	DE	DA	V	D	CM	DE	DA	V	D	CM	DE	DA	V
Cx43R239A	/	/	/	/	/	-	NS	NS	NS	+	NS	NS	-	NS	NS
Cx43Y247A	+	-	+	+	+	/	/	/	/	/	NS	NS	-	NS	+
Cx43S262A	/	/	/	/	/	+	NS	NS	NS	+	NS	NS	-	NS	-
Cx43S368A	/	/	/	/	/	-	NS	NS	+	+	-	NS	-	-	-
Ct-228	NS	NS	+	+	+	NS	NS	-	NS	NS	+	NS	+	-	+
Ct-234	NS	-	+	+	+	NS	NS	+	+	+	+	NS	+	+	+
Ct-234M	/	/	/	/	/	NS	NS	+	+	+	NS	NS	+	+	+

NS : Effet non significatif ; - : Réduction significative ; + : Augmentation significative

D : Directionnalité ; CM : Centre de Masse ; DE : Distance Euclidienne ; DA : Distance Accumulée ; V : Vitesse

- Par rapport au type cellulaire : Afin de voir si les différentes mutations et les C-ter impactent la migration de la même manière quel que soit le type cellulaire considéré, ou si les voies de signalisations diffèrent d'un type cellulaire à l'autre
- Par isoforme : Afin de voir la ou les voies de signalisations impliquées dans la régulation de la migration cellulaire par Cx43 et son C-ter
- Par rapport à chaque paramètre analysé : Cet angle nous permet de voir comment les différentes mutations ainsi que les C-ter impactent la migration (vitesse ou directionnalité ou les deux)

### **1- Par paramètre**

#### **a- Directionnalité**

Quel que soit le type cellulaire, on remarque que les cellules transfectées migrent de manière désorientée comparées aux cellules témoin aussi bien celles qui expriment la Cx43 endogène (MDCK et NRK) que celles qui en sont dépourvues (HeLa) (*tableau 2*)

Lorsqu'on compare les effets des différents variants à celui de la forme sauvage, on constate quelques disparités entre les différents types cellulaires. En effet, la directionnalité des cellules HeLa qui sur-expriment la forme mutée au niveau de Y247 sont significativement mieux orientées dans leur déplacement que les cellules qui expriment la protéine normale. Pour les cellules MDCK, c'est le variant muté au niveau de la serine 262 qui augmente significativement la directionnalité des cellules par rapport à la protéine normale. Quant aux cellules NRK, leur directionnalité est significativement stimulée par l'expression des peptides C-ter aussi bien la forme longue que la forme courte (*tableau 3*)

#### **b- Déviation du centre de masse**

Le centre de masse (CM) est très important ; la trajectoire d'un corps qui meut est en fait celle de son centre de masse. Concernant ce paramètre, les résultats de l'analyse statistique indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les cellules quel que soit l'isoforme Cx43 qu'elles expriment, aussi bien pour les cellules MDCK que les cellules NRK (*tableau 2*).

En revanche, pour les cellules HeLa, on note une différence significative entre, d'une part, les cellules qui expriment le variant Cx43Y247 et le peptide Ct-234, et d'autre part, les cellules témoin, aussi bien celles qui sont dépourvues de la connexine 43 (*tableau 2*) que celles qui expriment cette protéine (*tableau 3*).

#### **c- Vitesse**

Tous les isoformes testés dans les cellules MDCK réduisent significativement sa vitesse de migration, tandis qu'elles stimulent significativement la vitesse des cellules NRK. Seule la

mutation du site phosphorylable serine 368 impacte négativement la vitesse des cellules NRK au cours de leur déplacement (*tableau 2*). Pour les cellules HeLa, la forme sauvage et le Ct-234 impactent la vitesse de migration des cellules en diminuant significativement leur vitesse par rapport aux cellules non transfectées (*tableau 2*).

Si on compare les effets des isoformes par rapport aux cellules qui expriment la Cx43 sauvage, les résultats varient aussi d'un type cellulaire à un autre. En effet, dans les cellules HeLa, la vitesse de migration des cellules est significativement augmentée par le variant Cx43Y247A, et les C-ter court et long. Tandis que dans les cellules MDCK, tous les isoformes testés accélèrent le mouvement des cellules par rapport à la Cx43 complète et normale à l'exception du peptide Ct-228. Pour les cellules NRK, les mutations des sites serines, diminuent significativement la vitesse de migration, tandis que les autres isoformes l'augmentent par rapport à la Cx43 sauvage (*tableau 3*)

#### **d- Distance**

La mesure de la distance euclidienne (DE) et de la distance accumulée (DA) sont utiles pour déterminer la trajectoire des cellules. La DE représente la distance parcourue si la trajectoire entre le point de départ et le point d'arrivée était rectiligne, tandis que la DA représente la distance réellement parcourue par les cellules, et donc renseigne sur le mode de déplacement des cellules et son orientation. La directionnalité des cellules est en effet, déterminée par le rapport DE/DA

Lorsque les cellules désorientées se déplacent dans différentes directions, leur distance accumulée est nettement plus élevée que si elles suivaient une trajectoire rectiligne, comme c'est le cas pour un mouvement orienté.

L'analyse de la migration par la distance réellement parcourue, indique que les cellules HeLa accumulent une distance de déplacement significativement plus élevée lorsqu'elles sur-expriment le variant Cx43Y247A et le Ct-234. Pour les cellules MDCK, tous les isoformes testés augmentent la distance à l'exception du Ct-228 qui la diminue significativement et la forme sauvage qui n'impacte pas ce paramètre. Enfin, pour les cellules NRK, tous les isoformes augmentent significativement cette mesure, mis à part le variant Cx43S368A dont la surexpression n'engendre aucun effet significatif (*tableau 2*)

Si on prend les cellules sur-exprimant la Cx43wt comme témoin, les résultats fluctuent considérablement, mais on constate que pour les 3 types cellulaires, la distance parcourue augmente significativement par la surexpression des C-ter (*tableau 3*)

## 2- Par type cellulaire

### a- HeLa

L'expression de Cx43 ou de l'un de ses isoformes testés module significativement la migration des cellules. Globalement, les effets observés indiquent que Cx43 sous sa forme sauvage, mutante ou tronquée impacte négativement les paramètres de migration. En effet, l'expression de Cx43 dans les cellules HeLa diminue significativement leur directionnalité (pour l'ensemble des variants testés) et leur vitesse (Cx43wt et Ct-234). La forme mutée au niveau de Y247, ainsi que le Ct-234, impactent significativement la trajectoire de déplacement des cellules en augmentant la distance accumulée et en diminuant la distance euclidienne (*tableau 2*). Comparées aux cellules qui sur-expriment la Cx43 sauvage, les formes tronquées augmentent significativement la vitesse de migration des cellules. Quant à la mutation Y247A, elle améliore aussi bien la directionnalité des cellules qu'elle augmente leur vitesse de déplacement (*tableau 3*)

### b- MDCK

La surexpression de Cx43 ou de ses mutants ou de ses C-ter seuls dans les cellules MDCK, désoriente significativement les cellules en migration comparées aux cellules qui n'expriment que la connexine endogène. Les mêmes effets sont observés quant à la vitesse de migration (*tableau 2*). Toutefois les variants testés, à l'exception du Ct-228, accélèrent la migration des cellules, comparées à celles qui sur-expriment Cx43 sauvage ; et la mutation S262A améliore significativement la directionnalité des cellules (*tableau 3*)

### c- NRK

Les cellules NRK en migration sont significativement désorientées lorsqu'elles sur-expriment Cx43 ou l'un de ses isoformes longs ou tronqués. Cependant, la vitesse de migration est significativement augmentée, à l'exception de Cx43S368A, dont l'expression dans les cellules NRK les ralentit significativement (*tableau 2*). Par ailleurs, le mutant Cx43Y247 augmente significativement la vitesse de migration des cellules par rapport à celles qui sur-expriment Cx43wt. Le même effet est obtenu lorsque les cellules expriment un des peptides C-ter seul. En revanche, les mutations des sites serines 262 et 368, réduisent significativement la vitesse des cellules. En ce qui concerne la directionnalité, les cellules sur-exprimant les C-ter sont significativement plus orientées par rapport aux cellules exprimant la Cx43wt, alors que l'effet inverse est observé pour le mutant S368A (*tableau 3*).

### 3- Par isoforme

#### a- Cx43wt

Les résultats de l'analyse de la migration indiquent que l'expression de Cx43 sous sa forme sauvage module la migration des cellules différemment selon le type cellulaire. Tandis qu'elle stimule la vitesse de migration des cellules NRK, elle réduit significativement la vitesse des cellules HeLa et des cellules MDCK. Toutefois, son expression réduit significativement la migration, quel que soit le type cellulaire testé (*tableau 2*).

#### b- Cx43R239A

D'après les résultats, la mutation R239A réduit significativement la directionnalité des cellules MDCK et NRK, mais augmente significativement la vitesse de ces dernières, alors qu'elle réduit significativement la vitesse des premières (*tableau 2*). Comparé à la Cx43 sauvage, ce mutant impacte la migration des cellules MDCK en augmentant significativement leur vitesse de migration et en réduisant leur directionnalité (*tableau 3*)

#### c- Cx43Y247

Les effets de la mutation Y247A se manifestent par une réduction significative de la directionnalité des cellules HeLa et NRK, et une accélération significative de la migration de ces dernières (*tableau 2*). Comparé à la forme sauvage, ce variant améliore la directionnalité des cellules HeLa, et stimule la vitesse des cellules HeLa et NRK (*tableau 3*)

#### d- Cx43S262

L'analyse des résultats indiquent que la mutation S262A impacte également la migration en modulant quelques paramètres dans les deux types cellulaires testés. En effet, elle diminue la directionnalité des cellules MDCK et NRK par rapport aux cellules témoins ; en revanche, elle augmente significativement la vitesse des cellules NRK et ralentit les cellules MDCK (*tableau 2*). En comparaison avec les cellules transfectées par la forme sauvage de Cx43, on observe une augmentation de la directionnalité des cellules MDCK accompagnée d'une accélération du mouvement des cellules. Pour les cellules NRK, la vitesse est réduite (*tableau 3*).

#### e- Cx43S368

L'abolition du site phosphorylable S368, impacte significativement les cellules MDCK et NRK, en réduisant aussi bien leur directionnalité que leur vitesse de migration (*tableau 2*). Par rapport à la connexine sauvage, le mutant réduit significativement la directionnalité des

cellules NRK et MDCK. Pour la vitesse, on note une réduction significative dans les cellules NRK et une stimulation significative dans les cellules MDCK (**tableau 3**).

#### **f- Cx43C-ter**

L'expression des peptides de Cx43 dans les différents types cellulaires analysés, montrent que l'expression du C-ter de Cx43, seul, impacte significativement la migration des cellules en modulant les différents paramètres quantifiés.

- **Ct-228** : La forme longue Ct-228 réduit significativement la directionnalité des trois types cellulaires. Il est sans effet sur la vitesse des cellules HeLa, mais accélère la migration des cellules NRK et ralentit celle des cellules MDCK (**tableau 2**). En comparaison avec la protéine sauvage, l'expression du C-ter long dans les cellules HeLa stimule significativement leur vitesse de migration. Dans les cellules NRK, son expression stimule aussi bien la vitesse que la directionnalité des cellules par rapport à la Cx43wt (**tableau 3**).
- **Ct-234** : L'expression de ce peptide réduit la directionnalité des trois types cellulaires testés. Il en est de même pour la vitesse, dans les cellules HeLa et MDCK; par contre il stimule la vitesse de migration des cellules NRK (**tableau 2**). Par rapport à la forme sauvage, il stimule la vitesse de migration des trois types cellulaires, et même la directionnalité des cellules NRK (**tableau 3**).
- **Ct-234M** : Le C-ter court qui est adressé à la membrane impacte la migration des cellules MDCK et NRK de la même manière que les autres peptides tronqués, c'est-à-dire en réduisant la directionnalité des cellules NRK et MDCK et en augmentant la vitesse des cellules NRK et en réduisant celle des cellules MDCK (**tableau 2**). Par rapport à Cx43wt, le Ct-234 à localisation membranaire, comme le Ct-234 à localisation nucléaire, stimule la vitesse de migration des cellules MDCK et NRK (**tableau 3**).

Parmi les 21 connexines identifiées chez l'homme, la Cx43 est la connexine la plus abondamment exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires (**Hervé, 2012 ; Marquez-Rozado et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009b**). Cette connexine ubiquitaire, aurait la demi-vie la plus courte, 1 à 3h seulement et moins de 2h au niveau de la membrane plasmique (**Smyth et Shaw, 2012**). Cela implique qu'elle est constamment renouvelée afin d'assurer sa disponibilité au niveau des plaques de gap jonction et de maintenir le bon fonctionnement des canaux, indispensables à de nombreuses fonctions physiologiques dont le développement embryonnaire, le couplage des cellules nerveuses et cardiaques, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la migration cellulaire... (**Kotini et Mayor, 2015 ; Solan et Lampe, 2014; Zhang et Shaw, 2014 ; Matsuuchi et Naus, 2013**)

Le premier volet de notre étude est consacré à l'étude de l'impact de Cx43 sur la migration cellulaire. En effet, de plus en plus d'études attribuent aux connexines et surtout la connexine 43 un rôle crucial dans ce processus fondamental dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'immunité, l'angiogenèse, la cicatrisation du derme... (**Lilly et al., 2016; Sutcliffe et al., 2015; Wright et al., 2009**) mais aussi dans certains mécanismes physiopathologiques notamment la croissance des tumeurs et les métastases (**Sun et al., 2018 et 2012 ; Tabernero et al., 2016; Mesnil, 2004**). La plupart de ces études s'accordent sur le fait que cet impact est dû à la fonction d'adhésion médiée par cette protéine ainsi que des processus intracellulaires, plutôt qu'à la fonction de perméabilité cellulaire assurée par les connexines au sein de la gap jonction au niveau de la membrane plasmique (**Kameritsch et al., 2012**).

C'est pourquoi, avant de rapporter les résultats relatifs à l'impact de Cx43 sauvage et ses isoformes mutés et tronqués sur la migration cellulaire, nous avons d'abord exploré l'impact des mutations étudiées sur la localisation des différents isoformes et leur aptitude à former des canaux de gap jonction fonctionnels. Nous avons également testé la fonctionnalité des gap jonctions lorsque les peptides sont sur-exprimés dans les différents modèles cellulaires. Le but est de distinguer les effets de Cx43 dépendants et indépendants de la fonction canal, sur la migration cellulaire. D'autant plus que certains sites mutés, notamment les Y247, S368 et S262 sont connus pour leur rôle dans la régulation de la fonction de perméabilité cellulaire par mécanisme de phosphorylation (**Matsuuchi et Naus, 2013 ; Solan et Lampe, 2009a ; Solan et al., 2003**).

En effet, des changements de l'expression et la localisation de Cx43 sont particulièrement observés au cours du cycle cellulaire. L'occurrence de ces événements est étroitement associée à des changements de son profil de phosphorylation. En effet, l'activation de différentes kinases

serait un mécanisme majeur de la régulation de la biologie des connexines (**Zhang et Shaw, 2014 ; Solan et Lampe ; 2009 ; Lauf et al., 2002**). Ces anomalies sont souvent dues à des mutations ponctuelles qui affectent le transport et/ou l'assemblage des connexons ainsi que la fonction canal assurée par les GJ. Les effets dépendent du site de mutation et du type d'isoforme de connexine concerné. Dans la plupart des cas, ces mutations entraînent le blocage du transport des connexons vers la membrane plasmique et leur accumulation dans l'appareil de Golgi et/ou du réticulum endoplasmique (**Gilleron et al., 2012**).

Les mutations les mieux décrites sont celles qui touchent le gène GJA1 qui code pour la connexine 43 et qui sont responsables du syndrome ODDD (**Boyden et al., 2015 ; Paznekas et al., 2009**). D'ailleurs, des aberrations de l'expression des connexines et leur transport sont souvent associées à des pathologies telles que les maladies cardiaques, des pathologies liées à la myéline, la cataracte congénitale, la surdité et la carcinogénèse... (**Ye et al., 2015 ; Wingard et Zhao, 2015 ; Laird, 2014 ; Molica et al., 2014 ; Zhang et Shaw, 2014 ; Marquez-Rosado et al., 2012 ; Berthoud et Beyer, 2009**). Par ailleurs, de plus en plus d'études ont reporté des corrélations entre les aberrations de localisation des connexines et différents types de cancers et tumeurs (**Gilleron et al., 2012 ; Kanczuga-Koda et al., 2010**). Ces anomalies en seraient même une principale caractéristique, et seraient dues à des altérations de la phosphorylation des connexines et/ou leur interaction avec leurs partenaires protéiques (**Gilleron et al., 2012 ; Omori et al., 2007 ; Pointis et al., 2007**).

Dans la première partie de cette étude, nous avons tenté d'établir l'impact des substitutions alanine de résidus qui sont soit sujets à des événements de phosphorylation (Y247, S262 et S368) soit impliqués dans l'interaction spécifique de cette connexine avec la tubuline/microtubule (R239 et Y247), sur le transport, la localisation et la capacité de la Cx43 à former des GJ fonctionnels. L'ensemble de ces sites sont potentiellement impliqués dans la migration cellulaire via différentes voies de signalisation (**Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012 ; Behrens et al., 2010 ; Richards et al., 2004**).

Les résultats de notre étude, montrent qu'aucun des sites mutés n'exerce un impact négatif aussi bien sur la biologie de la Cx43 et sa localisation que sur sa capacité à assurer le rôle de communication intercellulaire via les canaux de GJ. Pourtant des études ont montré que des conversions de résidus sérine appartenant à l'extrémité C-terminale (C-ter) de Cx43 en alanine, entraînaient des altérations de la communication intercellulaire (**Lampe et al., 2000**).

Il a été démontré que la phosphorylation de Cx43 au niveau des résidus S262 et S368 se produisait de manière directe ou indirecte sous l'effet d'activateurs de PKC et aurait une pertinence fonctionnelle. En effet, des données de la littérature, ont montré que le

fonctionnement du canal de GJ serait régulé par la phosphorylation de S368 par les PKC (**Laird, 2014; Hervé, 2012, Solan et Lampe, 2009a; Richards et al., 2004**). D'une part la réduction de la communication cellulaire via les GJ serait liée à une réduction de la phosphorylation de S368 par les PKC. D'autre part, la sélectivité du canal serait également sous la dépendance de cet évènement (**Lilly et al., 2016; Sutcliffe et al., 2015; Wright et al., 2009; Richards et al., 2004**). La phosphorylation de S368 par les PKC serait également impliquée dans l'ischémie, puisqu'elle confère au coeur préconditionné une protection contre les dégâts que pourrait provoquer une attaque prolongée (**Ek-Vitorin et al., 2018 ; Marquez-Rosado et al., 2012**).

Concernant la serine 262, sa phosphorylation exerce selon des données de la littérature, des effets sur le couplage métabolique et la communication cellulaire via les GJ. Des études sur les myocytes, ont indiqué une augmentation de la perméabilité cellulaire via les GJ dans les cellules qui sur-expriment Cx43S262A comparées à Cx43S262D ou la forme sauvage (**Doble et al., 2004**). La phosphorylation du résidu S262 serait également impliquée dans la communication via l'hémicanal en réduisant son ouverture (**Laird, 2014 ; Mylvaganam et al., 2014; Gilleron et al., 2012; Hervé, 2012**). Cet évènement de phosphorylation serait aussi un mécanisme permettant la régulation de l'inhibition de la croissance cellulaire et la synthèse de l'ADN dans les cardiomyocytes primaires chez le rat (**Doble et al., 2004**).

Par ailleurs, des données expérimentales, ont rapporté un effet des activateurs de kinases sur la localisation de Cx43. En effet, des activateurs de PKA favoriseraient la présence de Cx43 au niveau des plaques de GJ tandis que des activateurs de MAPK et PKC causeraient son internalisation. Des changements de distribution de Cx43 à la fin de la division cellulaire seraient également régulés par des évènements de phosphorylation (**Boassa et al., 2010**).

Toutefois, des données de la littérature semblent indiquer que la formation des canaux de GJ n'est pas dépendante de la phosphorylation des connexines, puisque des formes tronquées ou dépourvues de sites phosphorylables peuvent toujours former des canaux de GJ. En effet, des expériences avec des protéines de Cx43 tronquées du peptide 258-382, ont montré que cet isoforme est capable de former des GJ fonctionnelles, néanmoins avec un taux moins élevé comparé au type sauvage. La phosphorylation semble donc être plutôt un moyen pour réguler la fonction des canaux et/ou le taux de leur assemblage ainsi que leur dégradation (**Jhonson et al., 2012**).

Ceci pourrait expliquer en partie nos résultats. En effet, bien que les résidus S262 et S368 soient activement phosphorylés au niveau de la connexine Cx43 durant son cycle de vie, leur substitution en alanine n'a affecté ni l'expression de la protéine ni sa localisation ni l'adressage

des connexons à la membrane et la formation de canaux de GJ fonctionnels dans les modèles cellulaires utilisés pour cette étude (HeLa, NRK et MDCK).

Concernant les cellules HeLa, nous avons observé une faible présence de la connexine 43 aussi bien sauvage que mutée au niveau de la membrane, ce qui semble indiquer un déficit de la cellule dans l'adressage des connexines à la membrane et la formation des GJ. Il faut rappeler que les cellules HeLa sont dérivées de cellules cancéreuses et n'expriment pas les GJ endogènes (**Elfgang et al., 1995 ; Eckert et al., 1993**). Nous pensons que l'absence de machinerie et de partenaires protéiques nécessaires au transport des connexons et à la formation des GJ dans ce type cellulaire, serait en grande partie responsable de ce résultat. De plus, nous avons observé que même dans les cellules HeLa transfectées par la forme sauvage de Cx43, il n'y a pas de passage du colorant, ce qui indique probablement que les rares GJ formés ne sont pas fonctionnelles.

Cependant dans les cellules NRK et MDCK qui expriment les connexines endogènes dont la Cx43, nous avons observé au niveau de la membrane plasmique la présence abondante des isoformes transfectés. Nous pensons qu'un mécanisme de compensation pourrait aussi expliquer en partie la différence d'expression des connexines 43 à la surface des cellules HeLa et NRK/MDCK. En effet, les connexines s'assemblent en structures hexamériques appelées connexons (**Hervé, 2012 ; Solan et Lampe, 2009b ; Laird, 2006**). Et nous n'avons aucune idée sur la manière dont ces sous unités sont phosphorylées au sein de cette structure. De plus, il est bien connu que les connexines peuvent oligomériser avec des connexines de même isoforme ou des isoformes différents (**Hervé, 2012 ; Laird, 2006**). Donc il est fort probable que dans les expériences de surexpression dans les cellules NRK et MDCK, les connexons soient composés de connexines endogènes et de connexines transfectées. Cette combinaison hétéromérique ne semble pas altérer le transport des connexons et la formation des GJ. Il est possible que les protéines normales endogènes compensent les défauts des isoformes mutés surexprimés dans ces cellules. Il se pourrait aussi que le signal correspondant à la phosphorylation de quelques sous unités soit suffisant pour assurer le transport des connexons et leur livraison au niveau des plaques de GJ.

De tels mécanismes de compensation ont déjà été décrits dans le cas d'une perte de connexine ou de mutations dans des cellules qui co-expriment deux ou plusieurs isoformes de connexines (**Laird, 2006**).

En ce qui concerne le résidu Y247 cible des Src-kinases, sa substitution en alanine n'impacte ni la localisation de Cx43 ni la fonctionnalité des GJ. D'après la littérature, la phosphorylation du résidu Y247, permet la régulation de la fonction canal en réduisant la communication

cellulaire via les GJ (Solan et Lampe, 2009a). Ce résidu est également impliqué dans l'interaction de Cx43 avec la tubuline/ microtubule, avec le résidu R239, comme il a été démontré par RMN. Les auteurs ont également que la phosphorylation de Y247 abolissait cette interaction (Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012). Ce résultat concorde avec des données antérieures de la littérature qui ont montré que des mutations phospho-mimétiques du C-ter étaient associées à des changements structuraux du peptide. Selon les auteurs, ces changements permettent le gain ou la perte de sites d'interaction des connexines avec leurs partenaires protéiques (Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009b).

Pour rappel, la Cx43 est la seule connexine connue à ce jour comme interagissant avec le réseau de microtubules (Leithe et al., 2018). Des études ont montré que le transport des connexons de Cx43 de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique se faisait le long des microtubules (Leithe et al., 2018 ; Smyth et Shaw, 2012 ; Lauf et al., 2002). C'est pourquoi nous avons vérifié si la substitution de ces sites en alanine ne perturbait pas cette interaction et éventuellement l'adressage des connexons de Cx43 à la membrane.

Nos résultats indiquent que ces mutations n'affectent pas le transport des connexons et la formation des gap jonctions. D'une part, il est possible que les connexines endogènes oligomérisées avec la connexine transfectée au sein du même connexon, assurent le maintien de cette interaction entre le connexon et le cytosquelette de microtubules, ce qui permet de masquer les effets négatifs engendrés par les mutations. D'autre part, il est probable que même si l'interaction est perturbée, elle n'affecte pas le transport des néo-connexons de l'appareil de Golgi à la membrane, parce qu'elle ne lui est pas indispensable du fait que les connexons sont transportés dans des vésicules. D'ailleurs, des études ont montré que le traitement de cellules avec le nocodazole, un agent qui désorganise le réseau de microtubules, n'affecte pas le transport des néo-connexons. Néanmoins, ce traitement diminue significativement le nombre de vésicules transportées (Gilleron et al., 2012). On peut également supposer, que cette voie ne soit pas l'unique voie empruntée par les vésicules pour atteindre la membrane plasmique. Il s'est avéré en effet, que le réseau d'actine serait aussi important que le réseau de microtubule pour le transport de Cx43 dans les cardiomyocytes (Smyth et Shaw, 2012).

Bien que les mutations générées n'ont entraîné aucun des effets suspectés, la substitution S368A a engendré un impact très surprenant. En effet, les cellules NRK sur-exprimant la connexine mutée Cx43S368A sont significativement plus grandes que les cellules exprimant la forme sauvage (*résultats en annexe*) ou les autres isoformes. De plus les cellules transfectées avec la Cx43S368A expriment à la surface de la membrane la connexine mutée avec une densité significativement plus élevée comparée à la forme sauvage et/ou les autres isoformes, d'après

le signal de la GFP. Une corrélation entre l'expression de Cx43 et la morphologie des cellules a été rapportée par la littérature. En effet, une étude sur l'impact de Cx43 sur la migration des cellules, a montré que des cellules épithéliales du sein MCF-10A, Cx43 KO, apparaissaient plus larges et plus étalées, avec une forme irrégulière. Selon les auteurs, ces changements de la forme et la taille des cellules, seraient liés des réarrangements du cytosquelette, affectés par l'expression de Cx43 (**Matsuuchi et Naus, 2013**). Ce n'est pas le cas pour notre étude, puisque les résultats des marquages aussi bien du cytosquelette de tubuline/microtubules que celui de l'actine, indiquent que l'organisation des deux réseaux n'est pas affectée par la mutation de S368.

Comme nous l'avons déjà cité, nous avons également testé les effets de la sur-expression de peptides correspondants au domaine C-terminal de Cx43 : un C-ter long (Ct-228) et une version courte qui commence au niveau du résidu K234 (Ct-234) et qui est dépourvue par conséquent de la séquence hydrophobe (LFYVFF) qui rend le peptide insoluble en solution. Les deux versions se terminent de manière similaire au niveau de l'extrémité C-ter (résidu 382) et comportent le motif nécessaire à l'interaction avec la tubuline/microtubules.

Curieusement, la localisation des deux peptides tronqués de Cx43 au sein des cellules où ils sont surexprimés n'est pas similaire. La forme courte (234-382) est présente de manière prédominante dans le noyau et absente de la membrane plasmique, tandis que la forme longue (228-382) présente une distribution cytosolique et membranaire.

La différence entre ces deux isoformes, réside au niveau d'une séquence de 6 acides aminés hydrophobes. Nous avons donc essayé de vérifier la possibilité que les 6 résidus en question puissent influencer la localisation des peptides. Pour ce faire, nous avons soumis la séquence des deux peptides étudiés à des logiciels permettant l'identification de signaux expliquant une localisation nucléaire ou subcellulaire particulière.

Les résultats ont montré que les deux peptides, de par leur poids moléculaire (13kDa) pourraient passer à travers les pores de la membrane nucléaire. D'autre part, aucun peptide signal n'est détecté au niveau des deux peptides pour expliquer l'adressage de la forme longue à la membrane plasmique.

Il est évident que cette différence de localisation n'est pas due au hasard, et serait certainement liée à une différence fonctionnelle entre les deux formes. De tels isoformes tronqués de connexines ont déjà été rapportés par la littérature (**Salat-Canela et al., 2015 et 14 ; Ul-Hussain et al., 2014 et 2008 a et b**). Des données d'expériences de western-blot ont en effet révélé la coexistence avec la connexine longueur complète, de peptides correspondants à des formes tronquées de connexines et qui ne seraient pas des produits de protéolyse. En effet, il a

été démontré que ces connexines tronquées sont traduites à partir d'ARNm codant la protéine longueur complète (**Salat-Canela et al., 2015**). Par ailleurs, plusieurs études ont décrit des peptides libres de différentes tailles, correspondant au domaine C-ter de Cx43 et Cx55,5, avec une localisation nucléaire dans des cellules de mammifères et différents organes de poissons zèbre (**Salat-Canela et al., 2015 ; Ul-Hussain et al., 2008 a et b**). Un fragment Cx43 de 20kDa serait vraisemblablement présent avec la Cx43 longueur complète dans la plupart des cellules exprimant abondamment la Cx43, notamment les cellules humaines épithéliales primaires, les cellules mésenchymateuses, les kératinocytes et les fibroblastes (**Salat-Canela et al., 2014 ; Smyth et Shaw, 2013**). Ce fragment serait produit en réponse à des stimuli tels que l'hypoxie et l'ischémie dans le cerveau de rat et de souris (**Ul-Hussain et al., 2014**). Selon la littérature, le fragment Cx43 20kDa, joue un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire et la prolifération, probablement en modulant la transcription des gènes (**Joshi-Mukherjee et al., 2007 ; Kardami et al., 2007 ; Dang et al., 2003**). Les auteurs suggèrent également que ce fragment jouerait un rôle dans des mécanismes impliquant la Cx43 dans la carcinogénèse (**Joshi-Mukherjee et al., 2007**). Ce court peptide serait également impliqué dans l'adressage de la protéine Cx43 longueur complète à la membrane plasmique. Ces fragments seraient des protéines chaperonnes. En effet, leur localisation subcellulaire suit la voie empruntée par les vésicules transportant les connexons, mais ils n'ont jamais été observés à la surface de la membrane plasmique (**Sorgen et al., 2018 ; Smyth et Shaw, 2013**).

A partir de ces données, il apparaît clairement que les peptides correspondant au domaine C-ter de connexines, en particulier les fragments de Cx43, exercent des effets biologiques indépendants de la fonction canal.

D'un autre côté, nos résultats ont montré un impact négatif de la surexpression des deux peptides C-ter étudiés sur la communication intercellulaire via les GJ dans les cellules NRK. En effet, l'analyse de la perméabilité cellulaire a révélé un effet compétitif des deux isoformes sur la fonctionnalité du canal de GJ.

Il faut noter que le C-ter de Cx43 est impliqué dans la régulation de la perméabilité intercellulaire, puisque des formes Cx43 tronquées de la majeure partie C-terminale forment des canaux fonctionnels, mais présentent des perméabilités différentes (**Lampe et Lau, 2004**). On pourrait penser qu'une perturbation de la phosphorylation des connexines endogènes soit à l'origine des effets observés sur la perméabilité des canaux. Par ailleurs et comme nous le savons, l'oligomérisation ainsi que le transport des connexons à la membrane, sont régulés par un mécanisme de phosphorylation des résidus situés sur la partie C-ter de la connexine. Etant donné que le Ct-228 est pourvu de tous les résidus phosphorylables, nous pensons que ce

fragment pourrait oligomériser avec les connexines endogènes, longueur complète et accéder au sein du connexon à la membrane plasmique. Une fois la jonction lacunaire formée, nous supposons que le peptide tronqué pourrait adopter une conformation spatiale lui permettant de bloquer l'ouverture du canal. Cependant, il est étonnant que le Ct-234 engendre le même effet sur la perméabilité cellulaire, bien que sa localisation soit exclusivement nucléaire. Des investigations plus poussées seraient nécessaires pour expliquer ces résultats.

La deuxième partie de ce premier volet, est consacrée à l'analyse des effets des différentes versions de Cx43 sur la migration cellulaire.

Pour rappel, nous avons testé chaque isoforme à part dans chacun des trois modèles cellulaires sélectionnés pour cette étude. Rappelons que nous avons mené nos expérimentations sur les cellules HeLa qui n'expriment pas les gap junctions de connexine et les cellules MDCK et NRK qui en revanche expriment les connexines dont Cx43.

Nous avons donc opté pour deux approches expérimentales pour explorer le rôle de Cx43 dans la migration cellulaire :

- 1- Exprimer la protéine sauvage dans un système cellulaire qui en est dépourvu afin de voir si la protéine stimule ou ralentit la migration. Ensuite explorer les mécanismes sous-jacents (phosphorylation et/ou interaction avec le cytosquelette) en exprimant un à un chacun des isoformes mutés au niveau d'un site critique pour la voie de signalisation étudiée (Src, PKC, MAPK, interaction Cx43-tubuline/microtubules). Enfin, tester l'effet du C-ter seul dans la stimulation ou le ralentissement de la migration. Le but est de déterminer l'importance du C-ter dans ce processus physiologique et physiopathologique crucial pour l'organisme. Par ailleurs, voir si le C-ter est capable à lui seul d'assurer les effets de Cx43 sur la migration cellulaire, et ce indépendamment de la fonction de perméabilité intercellulaire assurée par les GJ absents dans ce modèle cellulaire comme nous l'avons mentionné.
- 2- Sur-exprimer ces mêmes isoformes longueur complète et tronqués dans des systèmes cellulaires exprimant les connexines endogènes dont Cx43, et explorer les effets négatifs ou positifs sur la migration cellulaire. Cette approche permet de mettre en évidence les différentes voies de signalisation impliquées par phénomène de compétition entre la connexine endogène et les isoformes transfectés.

-Ces deux approches complémentaires, nous ont révélé une hétérogénéité entre les différents types cellulaires quant à l'impact des différents isoformes sur les paramètres de la migration.

Dans tous les cas, il apparaît clairement que la Cx43 sous sa forme sauvage, mutée ou tronquée exerce un effet sur la migration en modulant positivement ou négativement, soit la vitesse et/ou la distance de déplacement et/ou la directionnalité des cellules.

D'ailleurs, de nombreuses études sur l'impact de Cx43 sur la migration cellulaire, ont conclu à un rôle majeur de son expression sur la régulation de ce processus (**Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012**). En effet, d'une part, une stimulation de la migration est associée à la sur-expression de cette protéine dans des types cellulaires qui en sont dépourvues comme les cellules HeLa (**Behrens et al., 2010**); et d'autre part, une inhibition de la migration est observée lorsque Cx43 est inactivée et/ou déletée dans des types cellulaires qui expriment naturellement cette protéine (**Liu et al., 2012 ; Francis et al., 2011; Behrens et al., 2010; Cina et al., 2009 ; Xu et al., 2006 ; Richards et al., 2004**).

Ces observations ont été rapportées dans différents types cellulaires et par différentes approches expérimentales. Par exemple, **Behrens et al. (2010)** ont observé une réduction significative de la migration des cellules EPC (Endothelial Progenitor Cells) dont le gène Cx43 est inactivé par Si RNA. Ces cellules qui expriment uniquement la Cx43, jouent un rôle très important dans l'angiogenèse. Par ailleurs, des essais sur des cellules CNCs (Cardiac Neural Crest Cells), dérivées de souris transgéniques sur-exprimant Cx43, ont montré une stimulation de la migration et de la directionnalité des cellules (**Xu et al., 2006**)

D'un autre côté, des expériences *in vivo* (**Liu et al., 2012 ; Cina et al., 2009**) et *in vitro* (**Rhee et al. 2009 ; Xu et al., 2006**), ont rapporté des anomalies du développement du néocortex, ainsi que des déficiences cardiaques et coronaires chez les souris invalidées pour le gène Cx43, entraînant leur mort après la naissance. Des anomalies de la migration des cellules neuronales et des cellules épicrodiques, des souris Cx43 KO (knock-out), seraient responsables des effets observés chez les embryons. Cette réduction de motilité durant l'embryogenèse serait associée à une réduction significative de la directionnalité des cellules, selon les auteurs (**Cina et al., 2009 ; Rhee et al. 2009 ; Xu et al., 2006**).

Toutefois, il faut noter que les effets de la connexine 43 sur la migration diffèrent dans d'autres types cellulaires, comme c'est le cas pour les kératinocytes, où une augmentation de l'expression de cette protéine serait associée à une réduction de la migration des cellules. En effet, l'application en cas de blessure, de Cx43 anti-sens accélère la migration des cellules et améliore ainsi la cicatrisation du derme (**Montgomery et al., 2018 ; Pollok et al., 2011 ; Wrigt et al., 2009 ; Richards et al., 2004**).

Concernant nos résultats, il apparaît que l'expression du plasmide Cx43wt ralentit significativement la migration des cellules HeLa et MDCK. Paradoxalement, la surexpression de Cx43 stimule la vitesse des cellules NRK de manière significative. Il en est de même pour les formes tronquées. En effet, les trois variants du C-ter stimulent significativement la migration de ce type cellulaire, aussi bien par comparaison aux cellules exprimant uniquement la forme endogène que les cellules sur-exprimant la protéine Cx43. Cependant, dans les cellules MDCK et HeLa, les C-ter courts et long accélèrent la migration des cellules par rapport à celles qui sur-expriment Cx43wt. Toutefois, la migration des cellules non transfectées est plus rapide. Ces résultats laissent supposer que la régulation de la migration cellulaire par Cx43 implique des résidus du C-ter, et s'accordent avec les données de la littérature. En effet, des études *in vivo* (Cina et al., 2009) et *in vitro* (Elias et al., 2010) sur des neurones de souris, ont confirmé l'importance du C-ter de Cx43 dans la régulation de la migration cellulaire. L'approche expérimentale dans ces deux études consiste à exprimer des variants de Cx43 délétés de leur C-ter dans les cellules dont le gène Cx43 a été désactivé par knock-out ou par interférence. Il s'agit des protéines Cx43 tronquées, délétées du peptide 259-382 (Cina et al., 2009) et du peptide 246-382 (Elias et al., 2010). Les résultats ont montré dans les deux cas un échec de la restauration de la migration.

D'autre part, Behrens et al. (2010) ont montré, en sur-exprimant une protéine tronquée de Cx43 correspondant au peptide (257-382), que le C-ter de Cx43 exprimé seul dans les cellules HeLa engendrait les effets stimulateurs observés lorsque Cx43 longueur complète est exprimée dans ce type cellulaire. Par ailleurs, la surexpression de l'extrémité N-terminale de Cx43 seule dans les cellules HeLa ne stimule pas la migration des cellules (Behrens et al., 2010). Le même constat est rapporté par une étude de Crespin et al. (2010) dans un autre type de cellules cancéreuses. Les auteurs ont observé une stimulation de la migration des cellules LN18 de gliome humain, lorsqu'elles sur-expriment une Cx43 tronquée seule, le peptide (243-382). Toutefois, les mêmes auteurs ont observé un effet similaire lorsqu'un variant de Cx43 délété du C-ter est exprimé dans ces cellules. Ces résultats, qui semblent contradictoires, laissent supposer qu'il existe au moins deux voies de signalisation différentes pour réguler la migration cellulaire via la Cx43.

D'après la littérature, la régulation de la migration cellulaire, via le C-ter, implique également l'interaction de Cx43 avec le réseau de microtubules. Les microtubules ont en effet, un rôle important dans le contrôle de la polarisation et la migration cellulaires. Ils sont hautement dynamiques dans les cellules en migration. Par ailleurs, l'alignement correct du MTOC (Centre

d'Organisation des MicroTubules), est prérequis pour un mouvement orienté durant la migration cellulaire. L'interaction de Cx43 avec la tubuline/microtubules semble essentielle à la polarisation et la migration cellulaires. D'après la littérature, les déficiences de la migration cellulaire observées lorsque Cx43 est inhibée ou inactivée seraient associées à une déficience de l'orientation des cellules et une déstabilisation du cytosquelette de (Matsuuchi et Naus, 2013 ; Kameritsh et al., 2012 ; Francis et al., 2011 ; Rhee et al., 2009)

Ce type d'observation a été rapporté par les travaux de Francis et al. (2011). Les auteurs ont analysé la migration de cellules MEFs (Mice Embryonic Fibroblasts) dérivées de souris Cx43KO, en culture, après un essai de migration par wound healing. Ils ont observé une déficience de polarisation des cellules associée à une déstabilisation du réseau de microtubules et une désorganisation du MTOC et donc incapacité des cellules à orienter leur déplacement en direction de la blessure. Des effets similaires sont observés pour les fibroblastes NHI3T3, les cellules de la crête neuronale, les cellules MEFs et les cellules épicaudiques, Cx43 KO, transfectées par des variants Cx43 déletées du domaine (234-243) du C-ter nécessaire à l'interaction Cx43/tubuline-microtubuline (Francis et al., 2011 ; Rhee et al., 2009).

En ce qui concerne notre étude, les résultats obtenus bien qu'en faveur d'un effet de cette interaction sur la migration cellulaire, ne semblent pas indiquer qu'elle stimule ce processus. En effet, les variants mutants de Cx43 au niveau des résidus Y247 et R239, stimulent la vitesse de migration des cellules NRK par rapport aux cellules non transfectées. Le Cx43Y247A, accélère la migration aussi bien des cellules HeLa que des cellules NRK, comparées aux cellules qui sur-expriment Cx43 sauvage. Il est à rappeler que ces deux sites ont été identifiés comme nécessaires à l'interaction Cx43-tubuline/microtubules (Saidi Birkci-Nigassa et al., 2012) et donc leur mutation est censée abolir l'interaction. Toutefois, il faut noter que la phosphorylation de Y247 abolit l'interaction (Saidi Birkci-Nigassa et al., 2012), on peut donc croire que la conversion de ce site en alanine, empêche cette réaction et donc l'interaction est maintenue dans les cellules transfectées. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que l'expression de la Cx43 endogène peut compenser les effets des variants transfectés.

Bien que ces deux mutations n'affectent pas négativement la vitesse de migration, elles perturbent significativement la directionnalité des cellules comme en témoigne les autres paramètres. Les résultats indiquent pour les trois types cellulaires testés, une déficience significative de la directionnalité par rapport aux cellules non transfectées. Ces résultats corroborent les données de la littérature. Toutefois, il est nécessaire de souligner que l'ensemble des variants surexprimés, dans les trois types cellulaires réduisent significativement la directionnalité des cellules. Mais il est également important d'indiquer que l'isoforme Cx43Y247A,

améliore la directionnalité des cellules HeLa par rapport à la forme sauvage, et que les C-ter court et long, améliorent l'orientation des cellules NRK comparés à la forme sauvage.

Il semble bien, que l'interaction de Cx43 avec la tubuline/microtubules soit une des voies de signalisation par lesquelles Cx43 module la migration cellulaire et plus particulièrement l'orientation du mouvement de déplacement.

Nos résultats indiquent que la Cx43, n'exerce pas ses effets sur la migration uniquement via les gap junctions. De nombreuses études soutiennent que la régulation de la migration par Cx43 est indépendante de la fonction canal (**Francis et al., 2011 ; Kameritsh et al., 2011, Elias et al. 2007 et 2010**). En effet, des expériences sur des cellules en culture (**Francis et al., 2011 ; Elias et al., 2010 et 2007**), ont montré que des mutations touchant des sites nécessaires à l'ouverture du canal de gap junctions, n'altèrent pas la migration des cellules.

Il en est de même pour notre étude, puisque la surexpression dans des cellules NRK des peptides C-ter altère la communication intercellulaire, mais stimule la vitesse de la migration des cellules comme nous l'avons déjà indiqué. Cependant, là aussi il ne faut pas oublier que les cellules NRK expriment la Cx43 endogène, qui peut compenser les effets de la surexpression des C-ter sur la communication intercellulaire.

D'après **Liu et al. (2012)**, le C-ter de Cx43 aussi bien que la fonction canal contribuent au processus de migration des cellules neuronales.

La communication intercellulaire serait spécialement importante pour les cellules qui migrent collectivement comme c'est le cas de l'embryogenèse ou le cancer. Dans ces amas, le calcium se propage pour coordonner la migration (**Kameritsh et al., 2012**). Il en est de même pour les cellules du derme, puisque la cicatrisation est régulée activement par la phosphorylation par les PKC de la serine S368 (**Richards et al., 2004**), un résidu impliqué dans la modulation de la perméabilité des gap junctions et la conductance du canal (**Marquez-Rosado et al., 2012 ; Solan et Lampe, 2009a et b; Lampe et al., 2000**). Par ailleurs, le blocage de la communication intercellulaire par des peptides mimétiques, améliore la cicatrisation en stimulant la migration des fibroblastes et des kératinocytes au cours de la cicatrisation chez les diabétiques (**Wright et al., 2009**).

La phosphorylation de S368 aurait un impact sur la migration des cellules NRK et MDCK, puisque sa conversion en alanine, réduit significativement la vitesse et la directionnalité des cellules, comme l'indiquent nos résultats.

La phosphorylation du C-ter de Cx43 serait un processus important dans la régulation de la migration. D'après la littérature, outre la phosphorylation par les PKC au niveau du derme, la phosphorylation par la p38MAPK serait impliquée dans la migration cellulaire. En effet,

**Behrens et al. (2010)**, ont noté une association entre une augmentation de l'activité de cette enzyme et la stimulation de la migration dans les cellules HeLa transfectées par la Cx43 ou uniquement le C-ter de cette protéine. Par ailleurs, les auteurs, ont observé une déficience de la migration de ces mêmes cellules lorsqu'elles sont traitées par un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK. Cette voie de signalisation serait indépendante de la fonction canal, puisque le C-ter (257-382) testé ne forme pas le canal.

Afin de tester l'impact de cette voie de signalisation, nous avons converti la serine 262 en alanine, un des sites phosphorylables par les MAPK. Les résultats indiquent que cette mutation affecte la vitesse de migration des cellules NRK et MDCK, négativement pour le premier type cellulaire, positivement pour le second. Les effets s'inversent lorsqu'on compare l'impact de cette mutation par rapport à la Cx43 sauvage.

Quoique nous ne soyons pas en mesure d'expliquer ces résultats, nous pouvons néanmoins conclure à un rôle indéniable de Cx43 sur la migration et la polarisation cellulaires. Il est évident que des résidus du C-ter soient impliqués dans cette régulation via différentes voies de signalisation dont la phosphorylation et l'interaction Cx43-tubuline/ microtubules.

## **VOLET 2**

**Repositionnement de médicaments  
pour cibler Cx43 dans la thérapie du cancer**

***Etude in silico***

En raison de leur implication aussi bien dans la suppression des tumeurs que leur progression, les connexines et en particulier Cx43, sont apparues comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement du cancer. En effet, le blocage de Cx43 et des gaps jonctions de Cx43 peut être une stratégie pertinente dans la thérapie du cancer, puisque le gain de la communication jonctionnelle et la réexpression de Cx43 dans les stades avancés du cancer stimulent l'extravasation et les métastases (**Grek et al., 2015 ; Ryszawy et al., 2014 ; Villares et al., 2011**)

Les peptides conçus pour bloquer les hémicanaux et les gap jonctions sont disponibles, et ont été testés dans différentes pathologies. Ces traitements se sont révélés très prometteurs pour réduire l'inflammation et assurer la neuroprotection dans le cas de lésions de la rétine (**Huang et al., 2018 ; Guo et al., 2016**), l'amélioration de la cicatrisation de la cornée (**Chen et al., 2009**), la réduction de l'activité hémicanal excessive dans le cas de l'ischémie/reperfusion dans le cœur et le cerveau (**Cotter et al., 2019; Freitas-Andrade et al., 2019 ; Schulz et al., 2015 ; Iyyathurai et al., 2013 ; Hawat et al., 2010**), l'atténuation de l'hypersensibilité à la douleur (**Tonkin et al., 2018**), la cicatrisation du derme chez les diabétiques (**Montgomery et al., 2018; Grek et al., 2015 ; Pollok et al., 2011; Wright et al., 2009**).

Concernant les cancers, un traitement avec le peptide ACT1, s'est avéré efficace pour augmenter la communication cellulaire entraînant une perturbation de la prolifération et une induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein, mais pas dans les cellules normales. Ce traitement entraîne aussi un effet Bystander lorsque le traitement avec le peptide ACT1 est combiné au tamoxifène ou au lapatinib (**Grek et al., 2015**). **Lamouille et al. (2017)** ont également développé un peptide, le JM2 pour entrer en compétition avec Cx43 pour l'interaction avec les microtubules et améliorer la sensibilité des cellules du glioblastome à un traitement chimiothérapie.

Il serait intéressant d'utiliser une autre approche thérapeutique, appelée repositionnement des médicaments, pour identifier des molécules déjà connues et utilisées pour cibler la Cx43. Cette approche a l'avantage d'être moins coûteuse et plus rapide (**Naveja et al., 2016**). Elle est actuellement considérée comme une alternative pour trouver de nouvelles utilisations de médicaments anciens/existants/ disponibles, pour traiter d'autres maladies en dehors des indications préétablies (**Senger et al., 2020**)

La notion de repositionnement exclut toute modification structurelle du médicament. Au lieu de cela, le repositionnement utilise dans une nouvelle indication, soit les propriétés biologiques pour lesquelles le médicament a déjà été approuvé (éventuellement selon une formulation

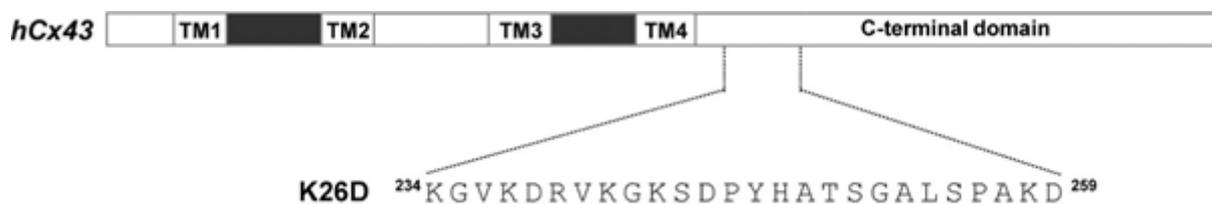
différente, à une nouvelle dose ou via une nouvelle voie d'administration), soit les propriétés secondaires d'un médicament qui sont donc ses effets indésirables (**Jourdan et al., 2020**)

Le repositionnement des médicaments utilise couramment les outils bio-informatiques du docking moléculaire (**Vijesh et al., 2011**). Cet outil est devenu de plus en plus important dans la recherche pharmaceutique (**Meng et al., 2011**).

Le deuxième volet de cette thèse s'inscrit dans ce contexte. Il s'agit d'une étude *in silico*, visant à rechercher parmi les médicaments approuvés par la Food Drug Administration (FDA), des molécules susceptibles de cibler la Cx43 dans le cadre de la lutte contre le cancer.

### 1- Recherche du récepteur et des ligands

Le récepteur correspond à la structure du domaine Cx43 C-terminal lié à la tubuline (ID PDB : 2LL2) disponible au niveau du site de la banque de données sur les protéines ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Il s'agit du peptide K26D, un peptide de 26 acides aminés s'étendant de K234 à D259 de l'extrémité C terminale de Cx43, et capable d'interagir avec tubuline/microtubules, comme démontré par **Saidi Brikci-Nigassa et al.** (2012) par des expériences de RMN (*figure 25*)



**Figure 25 : Représentation schématique de la Cx43 humaine et du peptide K26D dérivé du domaine de liaison Cx43 à la tubuline (Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012)**

Concernant les ligands, nous avons utilisé la base de données DrugBank, section des petites molécules (<https://www.drugbank.ca/about>) pour obtenir tous les médicaments approuvés par la FDA (**Wishart et al., 2018**). Des structures non uniques ont été supprimées au cours du processus et 1615 composés ont été sélectionnés.

### 2- Screening virtuel

Nous avons utilisé l'outil Pyrx pour le dépistage virtuel (**Dallakyan et Olson, 2015 ; Trott et Olson, 2010**). Les fichiers pdbqt d'entrée pour Autodock Vina et les étapes de minimisation ont été générés par l'outil Pyrx. Enfin, pour cribler les composés choisis par rapport à la cible, nous avons utilisé le programme AutoDock Vina. Pour chaque molécule, un total des huit meilleures poses a été retenu de la course d'amarrage. Les interactions 2D ont été réalisées dans Biovia Discovery Studio.

### 3- Simulation de dynamique moléculaire

Pour d'autres évaluations, les médicaments les plus intéressants ont été choisis pour la simulation de la dynamique moléculaire. Les simulations DM ont été réalisées à l'aide du logiciel GROMACS 5.1.5 (**Best et al., 2012**). Le champ de force CHARMM 36 a été utilisé pour les complexes. Nous avons utilisé le serveur SWISSPARAM pour la préparation des coordonnées et de la topologie des ligands. L'étude a appliqué des quantités appropriées d'ions

chlorure et de sodium à toutes les boîtes de simulation pour neutraliser le système. La condition aux limites périodiques (PBC) a été appliquée le long de chaque axe de boîte de simulation, et le modèle d'eau SP3 a également été utilisé pour la solvataion du système (**Nosé, 1984**) dans chaque système de simulation. Les simulations DM ont été effectuées via une interaction électrostatique à courte portée ainsi qu'une distance de coupure de 1,2 nm pour l'interaction de van der Waals. L'interaction électrostatique à longue portée a été calculée par l'algorithme Particle Mesh Ewald (PME). L'algorithme de descente la plus raide a rempli la minimisation d'énergie de tous les systèmes, puis l'ensemble NVT pour 500 ps a équilibré tous les systèmes. Ensuite, l'ensemble NPT a progressivement dirigé l'équilibrage de chaque système et la température de l'algorithme Nose-Hoover (**Hoover, 1985 ; Nosé, 1984**) a été conservée à une température de 310 K. Lors de l'équilibrage du NPT, le barostat de Parrinello-Rahman (**Parrinello et Rahman, 1981**) a maintenu les pressions à 1 bar. La simulation DM (dynamique moléculaire) a été réalisée pour les complexes en 100 ns.

### 1- Docking moléculaire

L'analyse de l'amarrage a fourni plusieurs configurations qui ont été notées pour déterminer les modes de liaison favorables. Les composés retenus sont représentés dans le **tableau 4**

**Tableau 4 : Composés retenus après analyse de l'amarrage moléculaire**

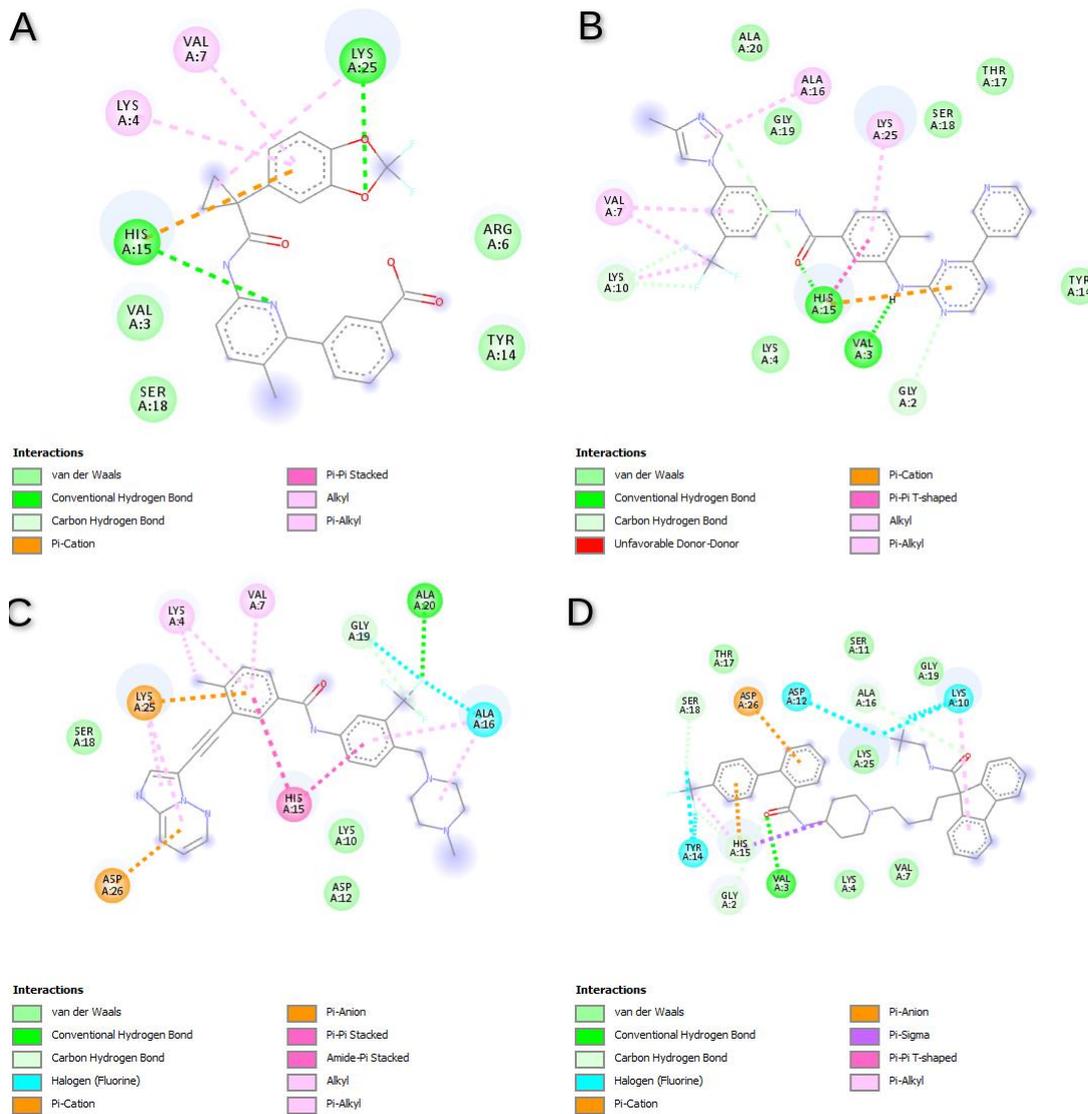
Ligands	Code zinc	$\Delta G$ (kcal/ml)	Poids moléculaire (g/mol)
Lumacaftor	64033452	-8,8	452,4
Nilotinib	6716957	-8,7	529,5
Ponatinib	36701290	-8,5	532,6
Lomitapide	27990463	-8,2	693,7

$\Delta G$  : Energie libre de Gibbs

Les codes varient pour la même molécule d'une base de données à une autre. Le code zinc correspond au code unique de la molécule sélectionnée dans le site utilisé (<https://zinc.docking.org>)

Les interactions entre les acides aminés du peptide Cx43 et les composés retenus ont ensuite été déterminées à l'aide du visualiseur Discovery studio

Les résultats ont montré que les molécules avec des énergies de liaison fortes, se lient habituellement aux résidus Val7, His15, Ala16 and Lys25 (**figure 26**)



**Figure 26 : Interactions des composés sélectionnés avec le domaine C-terminal de Cx43**

La **figure 26** révèle également que tous les composés présentent des interactions hydrophobes élevées avec les acides aminés du domaine Cx43 C-terminal, qui contribuent probablement aux scores d'énergie élevés observés. Ceci est en partie en relation avec les cycles aromatiques dans la structure des composés étudiés.

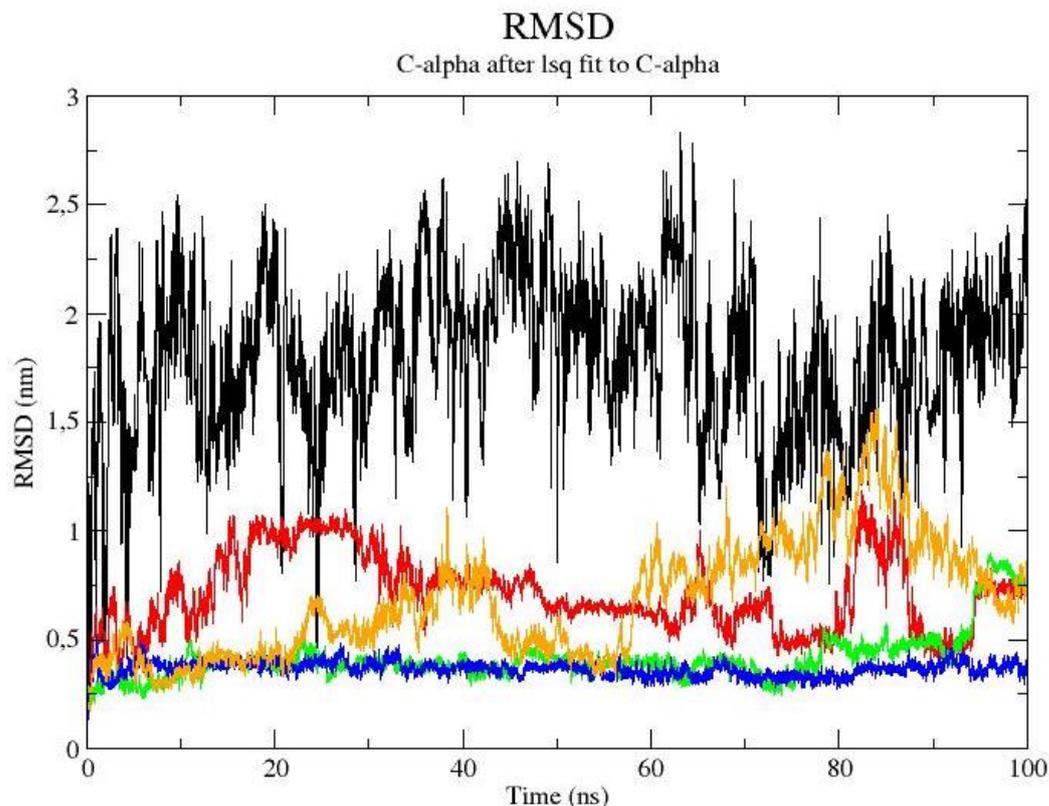
Les interactions se produisant entre les acides aminés du récepteur peptidique et les composés retenus ont été ensuite déterminées à l'aide du visualiseur Discovery studio

## 2- Simulations de dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire (DM) sont des méthodes *in silico* permettant d'obtenir des données dynamiques à une résolution spatiale atomique (Kumar et al., 2020 ;

**Benson et Daggett, 2012**). C'est pourquoi, les composés retenus ont été soumis à ces simulations pendant 100 ns pour analyser la stabilité des complexes.

La RMSD (Root Mean Square Deviation) plot est habituellement utilisée pour comprendre la stabilité du complexe (**figure 27**). Elle représente la déviation des coordonnées atomiques du carbone alpha. De très grandes valeurs indiquent que les structures sont différentes.

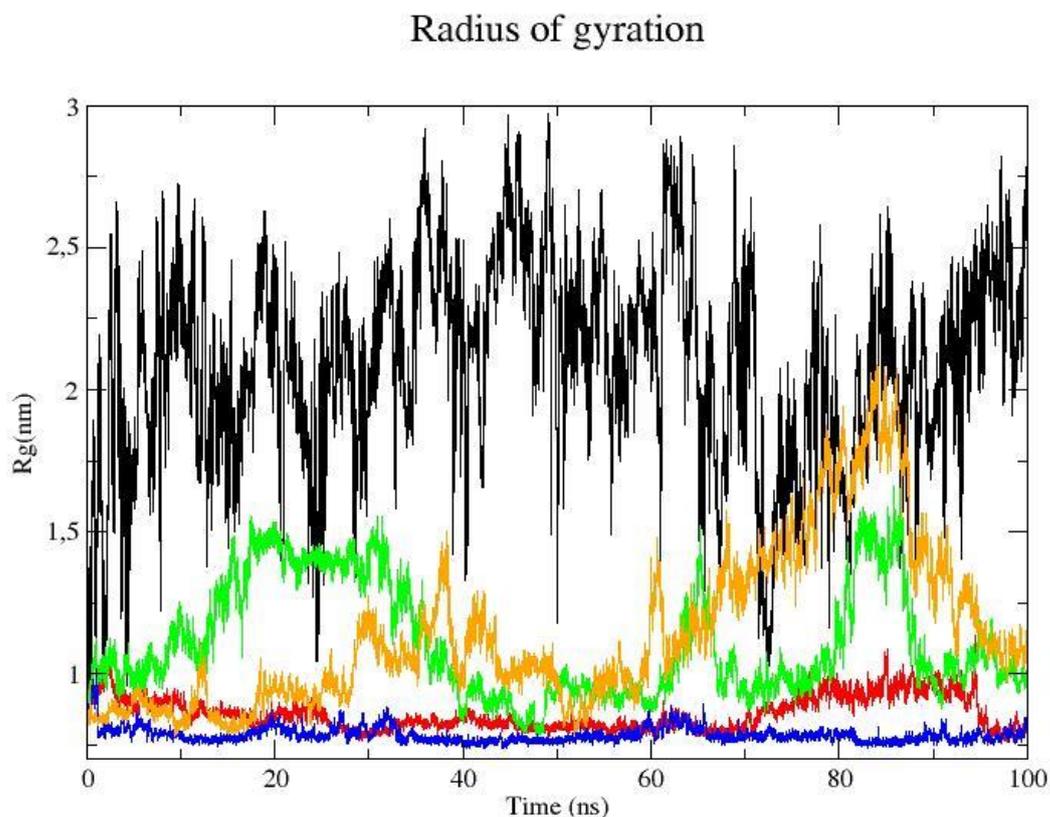


**Figure 27: Graphiques RMSD**

*Pour le domaine Cx43 C-terminal (noir), le domaine Cx43 C-terminal-Lomitapide (rouge), le domaine Cx43 C-terminal-Ponatinib (vert), le domaine Cx43 C-terminal- Nilotinib (bleu) et le domaine Cx43 C-terminal -Lumacaftor (orange)*

Le peptide en complexe avec le Nilotinib (bleu) a montré la RMSD la plus stable, autour de 0,4 nm, au cours des 100 ns de simulation. Le complexe Ponatinib est également stable autour de 0,4 nm mais une légère augmentation a été observée après une simulation de 70 ns tandis que les valeurs RMSD pour les complexes Lumacaftor et Lomitapide ont montré une forte fluctuation, ce qui indique que ces complexes subissent des changements de conformation (**Figure 27**).

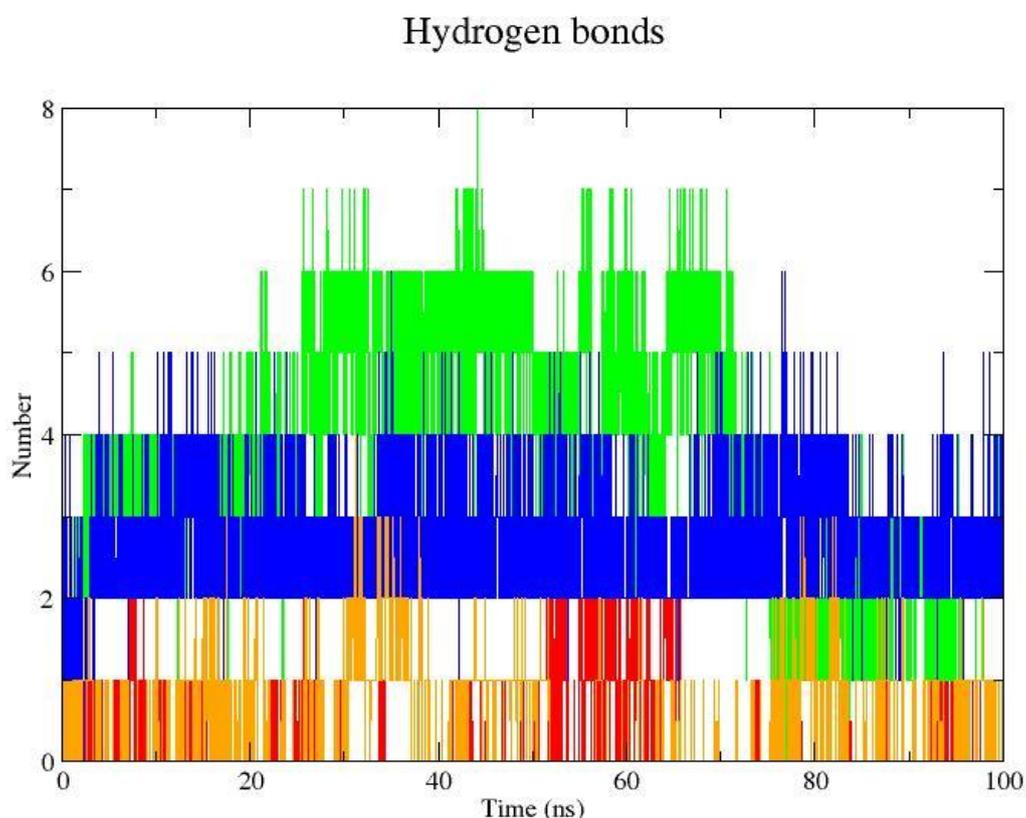
Le rayon de giration ( $R_g$ ) est calculé pour déterminer la compacité du système au cours du temps. Des valeurs faibles indiquent une plus grande stabilité tandis que des valeurs  $R_g$  élevées expliquent une faible compacité. Comme il apparaît sur la **figure 28**, les complexes Lomitapide et Lumacaftor présentent des valeurs  $R_g$  élevées indiquant une faible stabilité. Le complexe Ponatinib montre une stabilité plus élevée jusqu'à 65 ns, et des valeurs plus élevées sont observées jusqu'à 100 ns révélant moins de stabilité. D'autre part, le complexe Nilotinib a donné des valeurs de  $R_g$  (environ 0,75 nm) indiquant la plus grande compacité du système et donc une stabilité accrue.



**Figure 28: Graphiques  $R_g$**

*Pour le domaine Cx43 C-terminal (noir), le domaine Cx43 C-terminal-Lomitapide (vert), le domaine Cx43 C-terminal-Ponatinib (rouge), le domaine Cx43 C-terminal- Nilotinib (bleu) et Cx43 domaine C-terminal-Lumacaftor*

La liaison hydrogène joue un rôle essentiel dans la détermination de la force de liaison entre les composés et le domaine Cx43 C-terminal. Durant tout le temps de la simulation, le Nilotinib (bleu) exhibe un nombre de liaisons hydrogène variant entre 2 et 4, tandis que le Ponatinib a montré un nombre plus élevé de liaisons hydrogène entre 25 et 65 ns qui a significativement diminué entre 65 et 100 ns (*figure 29*). Ceci est conforme aux changements observés dans la RMSD (*figure 27*). Les deux autres complexes ont montré des schémas de tracé similaires avec un faible nombre de liaisons hydrogène le long de la simulation, ce qui est également conforme aux tracés RMSD Rg (*figure 28*)



**Figure 29: Graphiques des liaisons hydrogènes**

*Pour le domaine Cx43 C-terminal-Lomitapide (rouge), le domaine Cx43 C-terminal-Ponatinib (vert), le domaine Cx43 C-terminal- Nilotinib (bleu) et le domaine Cx43 C-terminal-Lumacaftor (orange)*

Les connexines en particulier la connexine ubiquitaire Cx43 jouent un rôle important dans les processus de tumorigénèse et cancérogénèse. Il est donc naturel et intéressant de concevoir des médicaments ciblant ces protéines, dans le traitement des nombreux cancers impliquant les connexines.

Il est par ailleurs judicieux d'utiliser l'approche du repositionnement des médicaments à cette fin. Ce processus qui consiste à trouver, pour les médicaments existants, de nouvelles indications pharmacologiques et thérapeutiques, est devenu depuis les années 2000, une activité de l'industrie pharmaceutique à part entière (**Jourdan et al., 2020**). Plusieurs médicaments ont été repositionnés avec succès, le plus célèbre d'entre eux étant le Viagra. En 1998, Pfizer commercialisa le sildenafil, un vasodilatateur pulmonaire, pour la dysfonction érectile sous la marque Viagra (**Novac, 2003 ; Humbert et al., 2002**)

Le repositionnement des médicaments utilise de plus en plus les programmes bio-informatiques de docking et simulation moléculaires. Ces outils de plus en plus innovants et performants permettent de prédire des interactions qu'il serait coûteux et fastidieux de tester au laboratoire. Ils permettent en effet d'orienter la recherche et d'économiser un temps précieux (**Warren et al., 2006**).

Grace à cette approche expérimentale, nous avons identifié plus de 1600 molécules médicamenteuses, approuvées par la FDA et susceptibles de cibler Cx43 pour une éventuelle utilisation thérapeutique dans le cancer.

Nous n'en avons sélectionné que quatre en raison de leur forte énergie de liaison, leur disponibilité et leurs effets indésirables minimes. Les quatre molécules sélectionnées appartiennent à différentes classes de médicaments

Le Lumafactor, est utilisé dans le traitement de la mucoviscidose, chez les patients homozygotes pour la délétion Phe en position 508 du récepteur CFTR. Cet acide benzoïque est utilisé en association avec l'ivacaftor et agit en améliorant le transport des protéines CFTR vers la membrane cellulaire (**Connett, 2019; Talamo Guevera et McColley, 2017; Deeks, 2016**).

Le Lomitapide est un inhibiteur microsomal de la protéine de transfert des triglycérides utilisé chez les patients homozygotes atteints d'hypercholestérolémie familiale (**Cuchel et al., 2013**). Bien que largement utilisé pour traiter l'hypercholestérolémie, le Lomitapide a récemment montré une activité anti-SARS-CoV-2 sur les tests antiviraux CPE traditionnels (score = - 9,96 kcal/mol). De plus, le Lomitapide a également été prédit pour inhiber la protéine Spike avec un score d'amarrage de -9,26 kcal / mol, suggérant un potentiel multi-cibles (**Yin et al., 2020**).

Cette molécule appartient à la classe des composés organiques appelés fluorènes (**Cuchel et al., 2013**). Le Lomitapide fait également partie des classes des benzamides, fluorènes et pipéridines (**Yasu et al., 2018 ; Cuchel et al., 2013**). Quant au Ponatinib et au Nilotinib, ils appartiennent tous deux à la classe des inhibiteurs de tyrosine kinase, et tous deux sont utilisés dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (**Lunghi et al., 2021; Price et al., 2013 ; Haouala et al., 2011**) . Le Ponatinib est couramment indiqué pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC), dans chaque phase de la maladie résistante au Dasatinib et au Nilotinib (**Cortes et al., 2018 ; Massaro et al., 2018**). Plusieurs essais ont montré que ce médicament a une activité inhibitrice contre la kinase BCR-ABL1 et plusieurs mutations ABL1. Également connu sous le nom d'AP24534, ce benzamide peut cibler de nombreuses tyrosine kinases impliquées dans des cancers autres que la LMC et la LAL (leucémie aigue lymphoblastique), notamment le cancer du foie, le glioblastome, le carcinome de la thyroïde et les tumeurs stromales gastro-intestinales (**Tan et al., 2019**). Cependant, il est à noter que ce médicament est associé à des risques cardiovasculaires graves et dose-dépendants (**Cortes et al., 2018 ; Massaro et al., 2018**). Un essai clinique de phase I en 2006, a montré que le Nilotinib, également connu sous le nom d'AMN107, était relativement sûr et offrait des avantages thérapeutiques importants dans les cas de LMC qui se sont révélés résistants au traitement par Imatinib (Gleevec), un autre inhibiteur de tyrosine kinase utilisé comme premier traitement en ligne de la LMC (**Sacha et Saglio, 2018 ; Pagan et al., 2016 a et b; Haouala et al., 2011**). Chimiquement, il s'agit d'un dérivé d'aminopyrimidine, qui réduit le taux de transcription BCL-ABL ( $\leq 10\%$  en 3 mois) ainsi que le risque de transformation en stades avancés de LMC. Cependant, le Nilotinib doit être utilisé avec prudence chez les patients présentant des risques cardiovasculaires (**Sacha et Saglio, 2018**). À faibles doses, le Nilotinib pénètre la barrière hémato-encéphalique entraînant une réduction du stress oxydatif et une protection des neurones, il augmente également les niveaux de dopamine et améliore les résultats cognitifs et moteurs dans les modèles de la maladie de Parkinson et de la maladie d'Alzheimer (**Pagan et al., 2016 a et b**).

Le screening moléculaire ne constitue qu'une étape préliminaire dans le processus de repositionnement. En effet, les logiciels d'amarrage moléculaire sont utiles pour étudier l'interaction des principes actifs des médicaments, souvent de petites molécules (ligands) avec la cible biologique d'intérêt, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (**Warren et al., 2006**)

Des analyses de simulation de dynamique moléculaire sont ensuite nécessaires pour étudier la stabilité du complexe récepteur-ligand. Les résultats de la RMSD et la Rg, ainsi que l'étude

des liaisons hydrogène, suggèrent que le domaine Cx43 C-terminal en complexe avec le Lomitapide et le Lumacaftor est peu stable durant la simulation, tandis que le Ponatinib montre une stabilité plus élevée pendant les 65 premières ns de la simulation. Le complexe Nilotinib est clairement le meilleur composé, selon les valeurs RMSD et Rg pendant toute la simulation. Il est donc le meilleur candidat comme médicament potentiel ciblant Cx43.

### CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a été construite sur deux axes de recherche. Le premier est une étude *in vitro*, réalisée sur des cellules en culture, le deuxième est une étude *in silico*, réalisée par les outils bio-informatiques de l'amarrage et la simulation moléculaires.

Le premier axe constitue la partie principale de notre recherche, et vise à déterminer l'implication du C-ter de Cx43 dans la migration et la polarisation cellulaires.

L'extrémité C-terminale de Cx43 est critique pour la régulation du transport, l'adressage à la membrane plasmique et la formation des gap junctions. Cette régulation s'effectue principalement par la phosphorylation des résidus serine, threonine et tyrosine du C-ter. Ce dernier est également le siège d'interaction de la Cx43 avec les kinases ainsi que plusieurs de ses partenaires protéiques dont les protéines du cytosquelette. La Cx43 est la seule connexine capable d'interagir avec le cytosquelette de microtubules. Cette interaction serait selon la littérature impliquée dans la migration des cellules, notamment au cours de l'embryogénèse, ainsi que dans le cancer. D'autres voies de signalisation impliquant le C-ter de Cx43 impactent la migration cellulaire. Selon la littérature, cet impact n'est pas toujours associé et/ou influencé par la fonction de perméabilité et communication intercellulaire assurée par les connexines au sein des gap junctions.

Afin d'explorer le rôle de la phosphorylation de Cx43 et son interaction avec le réseau de microtubules, dans le processus de migration et polarisation cellulaires, nous avons sélectionné au niveau du C-ter 4 sites à muter. Il s'agit des résidus serines en position 262 et 368, la tyrosine en position 247 et l'arginine en position 239. Trois de ces sites sont phosphorylables et deux seraient impliqués dans l'interaction Cx43-tubuline/ microtubules. Nous avons ensuite réalisé des constructions plasmidiques contenant chacune un de ces sites mutés. Le choix de ces sites est basé sur des données de la littérature qui supposent que ces résidus seraient associés au processus de migration cellulaire régulé par la connexine 43.

D'autre part, et afin d'explorer l'importance de l'extrémité C-terminale dans la migration, nous avons réalisé des constructions plasmidiques codant pour le C-ter seul. Deux peptides de longueurs différentes ont été générés ainsi: le peptide s'étendant du résidu 234-364, et le peptide s'étendant du résidu 228-364.

Ces plasmides sont ensuite introduits dans des cellules en culture pour tester leurs effets sur la perméabilité cellulaire, l'organisation du cytosquelette de microtubule, et les paramètres de la

## CONCLUSION GENERALE

migration cellulaire. Trois types cellulaires ont été sélectionnés pour mener cette étude *in vitro*, les cellules HeLa dépourvues de connexines, les cellules NRK et MDCK exprimant la Cx43. Les résultats ont montré que globalement la sur-expression des différents isoformes, aussi bien les formes longues et mutées de la connexine, que les formes courtes, ne désorganisent pas le réseau de microtubules. En revanche la perméabilité cellulaire est altérée dans les cellules NRK, lorsque les peptides correspondant au C-ter de Cx43 sont sur-exprimées, malgré la présence de la connexine endogène.

Par ailleurs, la localisation des deux peptides correspondant au C-ter de Cx43, varie. En effet, la forme courte se retrouve dans le noyau alors que la forme longue est adressée à la membrane plasmique.

Concernant la migration et la polarisation cellulaires, les résultats ont montré des effets variables selon la sur-expression des différents isoformes de Cx43, longs, mutés et courts, mais aussi selon le type cellulaire testé, et le paramètre analysé.

Il s'avère de manière générale, que la sur-expression de Cx43 et ses différents variants, altèrent la polarisation cellulaire au cours de la migration, quelque soit le type cellulaire testé.

En ce qui concerne la vitesse de migration, la sur-expression de la Cx43 sauvage, mutée ou tronquée dans les cellules NRK accélère le déplacement des cellules à l'exception de la mutation au niveau de S368. La conversion de ce site phosphorylable en alanine, bien que n'affectant pas la perméabilité cellulaire, réduit significativement la migration des cellules. P paradoxalement, les C-ter qui bloquent les gap junctions augmentent la vitesse des cellules. L'effet inverse est obtenu pour les cellules MDCK, puisque la sur-expression de Cx43 et ses isoformes réduit significativement la vitesse des cellules. Ces disparités pourraient être dues aux autres connexines qui sont exprimés dans ces deux types cellulaires, et qui interfèrent avec la Cx43 pour réguler la migration cellulaire.

Il est donc clair que Cx43 module les paramètres de la migration de différentes manières, impliquant certainement différentes voies de signalisation, dont la phosphorylation et l'interaction avec la tubuline/microtubules. Cette régulation pourrait être indépendante de la perméabilité intercellulaire via les gap junctions.

Il est cependant nécessaire de prendre ces résultats avec précaution, car d'une part, les tests de migration se sont révélés très laborieux sur les cellules HeLa et peu concluants, étant donné qu'il a été impossible de tester tous les variants et que le taux de transfection n'était pas très satisfaisant. D'autre part, les cellules MDCK et NRK expriment la Cx43 endogène dans différentes proportions et dans différentes combinaisons avec les autres connexines, notamment au niveau des gap junctions.

## CONCLUSION GENERALE

Pour des études ultérieures, il serait nécessaire de procéder à des transfections stables. Il serait également plus approprié de tester les effets des différents isoformes sur des modèles cellulaires n'exprimant pas la Cx43 et mieux adaptés aux tests de migration (meilleure adhésion) comme les fibroblastes NHI3T3. Il serait judicieux d'étudier les effets des substitutions Ser-Glu qui imitent la phosphorylation de la sérine et comparer les résultats à ceux que nous avons obtenus dans cette étude. Il serait également pertinent de tester les doubles mutations et même l'ensemble des mutations simultanément, car il est évident que la régulation de la migration via la Cx43 implique plusieurs voies de signalisation.

Par ailleurs, et étant donné qu'aucun peptide Cx43 C-terminal n'a été rapporté par la littérature, comme pouvant être adressée à la membrane plasmique, il est important de s'y intéresser de près. En effet, il serait intéressant d'identifier les sites phosphorylés au cours de son transport à la membrane, et d'étudier les changements de conformation lors de ces événements de phosphorylation, aussi bien au sein du connexon et/ou gap jonction, que lorsqu'il est seul. Ceci pourrait aider à comprendre les effets compétitifs du Cx34Ct-228 observés dans le présent travail et sa capacité à s'adresser à la membrane plasmique.

Le deuxième axe de cette recherche s'est intéressé à l'utilisation de Cx43 comme cible thérapeutique dans les cancers impliquant cette protéine. En effet, le rétablissement de la communication via les gap jonctions ainsi qu'une sur-expression de Cx43 seraient associées à la progression de nombreux cancers.

Pour cette partie de l'étude nous avons tenté un repositionnement de médicaments approuvés par la FDA, en utilisant les outils de l'amarrage et de la simulation moléculaires. Le docking a permis de ressortir plus de 1600 molécules capables d'interagir avec Cx43, avec des affinités de liaison variables. Nous en avons sélectionné quatre, appartenant à différentes classes thérapeutiques, puis nous les avons soumises à des tests de simulation de la dynamique moléculaire afin de déterminer les interactions les plus stables. Les résultats de ces analyses ont permis de sélectionner le Nilotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé dans le traitement des LMC, comme étant le meilleur candidat pour le ciblage de Cx43. Le Nilotinib pourrait donc être repositionné dans le traitement d'autres cancers impliquant Cx43.

Il est clair que les connexines en particulier la connexine 43, jouent un rôle crucial dans la vie cellulaire, aussi bien dans les conditions physiologiques normales que dans les conditions pathologiques. Leur étude est donc pertinente dans le cadre de nombreuses pathologies en dehors du cancer, ainsi que leur utilisation comme cible thérapeutique.

## CONCLUSION GENERALE

Il serait intéressant de tester par les techniques d'amarrage et simulation de la dynamique cellulaires, l'interaction du Nilotinib avec d'autres connexines impliquées dans le cancer, autre que la Cx43, afin de pouvoir le repositionner dans une plus large gamme de cancers.

Toutefois, le repositionnement des médicaments est une approche simple et rapide mais pas suffisante, elle doit donc être complétée par des études *in vitro*. Il est nécessaire de confirmer cette interaction, dans des cellules cancéreuses, par des techniques de biologie moléculaire d'une part, et d'autre part confirmer les effets potentiellement inhibiteurs sur la progression des cancers impliquant Cx43.

Il est intéressant également d'explorer les effets de cette interaction sur la migration des cellules en culture exprimant Cx43, et des cellules cancéreuses impliquant cette même protéine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW (2016).** Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nature Reviews Cancer* ; 16 : 775–788.
2. **Akiyama M, Ishida N, Ogawa T, Yogo K, Takeya T (2005).** Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. *Biochem Biophys Res Commun.*; 335 (4):1264-71.
3. **Alstrom JS, Stroemlund LW, Nielsen MS, MacAulay N (2015).** Protein kinase C-dependent regulation of connexin43 gap junctions and hemichannels. *Biochem Soc Trans.*; 43(3): 519-23.
4. **Andelova K, Benova TE, Bacova BS, Sykora M, Prado NJ, Diez ER, Hlivak P, Tribulova N(2020).** Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. *Int J Mol Sci*; 22(1):260.
5. **Asantewaa G, Harris IS (2021).** Glutathione and its precursors in cancer. *Curr Opin Biotechnol* ; 68:292-299.
6. **Behrens J, Kameritsch P, Wallner S, Pohl U, Pogoda K (2010).** The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner. *European Journal of Cell Biology*, 89, 828-838
7. **Benson NC, Daggett V (2012).** A comparison of multiscale methods for the analysis of molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*; 116: 8722–8731.
8. **Berthoud VM, Beyer EC (2009).** Oxidative stress, lens gap junctions and cataracts. *Antioxid Redox Signal*, 11(2), 339-353
9. **Berthoud VM, Ledbetter ML, Hertzberg EL, Sáez JC (1992).** Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Cell Biol*; 57(1):40-50.
10. **Berthoud VM, Montegna EA, Atal N, Aithal NH, Brink PR, Beyer EC (2001).** Heteromeric connexons formed by the lens connexins, connexin43 and connexin56. *Eur J Cell Biol.*; 80(1): 11-9.
11. **Best R, Zhu X, Shim J, Lopes PEM, Mittal J, Feig M, MacKerell AD (2012).** Optimization of the additive charmm all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\Phi$ ,  $\Psi$  and side-chain X (1) and X (2) dihedral angles. *J Chem Theor Comput*; 8: 3257-3273.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

12. **Boassa D, Solan JL, Papas A, Thornton P, Lampe PD, Sosinsky GE (2010).** Trafficking and Recycling of the Connexin43 Gap Junction Protein during Mitosis. *Traffic*; 11(11): 1381-1486
13. **Bonacquisti EE, Nguyen J. (2019).** Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions. *Cancer Lett.* ;442:439-444.
14. **Boyden LM, Craiglow BG, Zhou J, Hu R, Loring EC, Morel KD, Lauren CT, Lifton RP, Bilguvar K, Paller AS, Choate KA (2015).** Dominant De Novo Mutations in GJA1 Cause Erythrokeratoderma Variabilis et Progressiva, without Features of Oculodigital Dysplasia. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 6 : 1540-1547
15. **Carette D, Gilleron J, Decrouy X, Fiorini C, Diry M, Segretain D, Pointis G (2009).** Connexin 33 impairs gap junction functionality by accelerating connexin 43 gap junction plaque endocytosis.;10 (9):1272-85.
16. **Chen P., Potts J, Gourdie R, Davis R (2009).** A Synthetic Peptide ACT 1 Enhances Corneal Wound Healing. *IOVS* ; 50 (13)
17. **Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC (2009).** Involvement of the Cytoplasmic C-Terminal Domain of Connexin43 in Neuronal Migration. *J Neurosci.*; 29(7): 2009–2021
18. **Connett GJ (2019).** Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy. *Drug Des Devel Ther*; 13: 2405-2412.
19. **Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, Le Coutre PD, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Lustgarten S, Rivera VM, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes TP, Shah NP, Kantarjian HM (2018).** Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood*; 132: 393-404.
20. **Cotter ML, Boitano S, Lampe PD, Solan JL, Vagner J, Ek-Vitorin JF, Burt JM (2019).**The lipidated connexin mimetic peptide SRPTEKT-Hdc is a potent inhibitor of Cx43 channels with specificity for the pS368 phospho-isoform. *Am J Physiol Cell Physiol*; 317: 825–842.
21. **Crespin S, Bechberger J, Mesnil, Naus CC, Sin WC (2010).** The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J Cell Biochem*; 110: 589-597.
22. **Cuchel M, Meagher EA, Du Toit Theron H, Blom DJ, Marais AD, Hegele RA, Averna MR, Sirtori CR, Shah PK, Gaudet D, Stefanutti C, Vigna GB, Du Plessis**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AM, Propert KJ, Sasiela WJ, Bloedon LT, Rader DJ (2013).** Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet*; 381: 40-46.
- 23. Dai P, Nakagami, T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T (2007).** Cx43 mediates TGF- $\beta$  signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol. Biol. Cell* , 18, 2264–2273.
- 24. Dallakyan S, Olson AJ (2015).** Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Humana Press*; 1263: 243-250.
- 25. Dang X, Doble BW, Kardami E (2003).** The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem.*; 242(1-2):35-38.
- 26. Dang X, Jeyaraman M, Kardami E (2006).** Regulation of connexin-43 mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 289, 201-207
- 27. Das Sarma J, Das S, Koval M (2005).** Regulation of connexin43 oligomerization is saturable *Cell Commun Adhes*; 12(5-6):237-47.
- 28. Deeks ED (2016).** Lumacaftor/Ivacaftor: A Review in Cystic Fibrosis. *Drugs*; 76: 1191-1220.
- 29. Defamie N, Mesnil M (2012).** The modulation of gap-junctional intercellular communication by lipid rafts *Biochim Biophys Acta* .;1818(8):1866-9.
- 30. Delmar M, Makita N (2012).** Cardiac connexins, mutations and arrhythmias *Curr Opin Cardiol* .;27 (3):236-41.
- 31. Doble BW, Dang X, Ping P , Fandrich RR, Nickel BE, Jin Y, Cattini PA, Kardami E (2004).** Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *J Cell Sci.* , 26, 507-514.
- 32. Dubina MV, Iatckii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA (2002).** Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene*; 21: 4992-4996.
- 33. Eckert R, Dunina-Barkovskaya A, Hülser D F (1993).** Biophysical characterization of gap-junction channels in HeLa cells. *Pflügers Archiv Biophysical* ; 424 : pages 335–342.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

34. **Ek-Vitorín JF , Pontifex TK , Burt JM (2018)**. Cx43 Channel Gating and Permeation: Multiple Phosphorylation-Dependent Roles of the Carboxyl Terminus *Int J Mol Sci* ;19(6):1659.
35. **Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein R A, Hülser D F, Willecke K (1995)**. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* ; 129 (3): 805–817.
36. **Elias LAB, Turmain M, Parnavelas JG, Kriegstein AR (2010)**. Connexin 43 Mediates the Tangential to Radial Migratory Switch in Ventrally Derived Cortical Interneurons. *J Neurosci.* 19; 30 (20): 7072–7077
37. **Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR (2007)**. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*; 448 : 901–907.
38. **Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000)**. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* ; 300 : 1005-1016.
39. **Epifantseva I, Shaw RM (2018)**. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembrane* ; 1860 (1) : 40-47.
40. **Fernandez-Cobo M, Stewart D, Drujan D, De Maio A (2001)**. Promoter activity of the rat connexin 43 gene in NRK cells *Journal of cellular Biochemistry* : 81(3) : 379-569.
41. **Fort AG, Murray JW, Dandachi N, Davidson MW, Dermietzel R, Wolkoff AW, Spray DC (2011)**. In vitro motility of liver connexin vesicles along microtubules utilizes kinesin motors. *J Biol Chem.*; 286 (26):22875-85.
42. **Francis R, Xu X, Park H, Wei CJ, Chang S, Chatterjee B, Lo C (2011)**. Connexin43 Modulates Cell Polarity and Directional Cell Migration by Regulating Microtubule Dynamics *PLoS One.*; 6(10): e26379
43. **Freitas-Andrade M, Wang N, Bechberger J F, De Bock M, Lampe P D, Leybaert L, Naus CC (2019)**. Targeting MAPK phosphorylation of Connexin43 provides neuroprotection in stroke. *J Exp Med* ; 216 (4) : 916–935
44. **Fu Y, Sun X, Gu Z, Zhuang Z (2020)**. Connexin 43 Modulates the Cellular Resistance to Paclitaxel via Targeting  $\beta$ -Tubulin in Triple-Negative Breast Cancer. *Onco Targets Ther*; 13: 5323.
45. **Ghosh S, Kumar A, Prashad Tripathi R, Chandna S (2014)**. Connexin-43 regulates p38-mediated cell migration and invasion induced selectively in tumour cells by low

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- doses of  $\gamma$ -radiation in an ERK-1/2-independent manner. *Carcinogenesis*, vol.35, no.2, 383–395
- 46. Giepman BNG, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (2001).** Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Current Biology*, 11 : 1364-1368
- 47. Gilleron J, Carette D, Chevallier D, Segretain D, Pointis G (2012).** Molecular connexin partner remodeling orchestrates connexin traffic : From physiology to physiopathology. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1-17
- 48. Goldberg GS, Bechberger JF and Naus CCG (1995).** A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by dye transfer. *BioTechniques* 18:490–497.
- 49. Goodenough DA, Paul DL (2009).** Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;1(1): a002576.
- 50. Grek CL, Rhatt JM, Bruce JS, Abt M A, Ghatnekar G S, Yeh ES (2015).** Targeting connexin 43 with  $\alpha$ -connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast cancer: clinical implication for ACT1. *BMC Cancer*; 15: 296.
- 51. Guevera MT, McColley SA (2017).** The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Opin Drug Safety* ; 16 (11) : 1305–1311.
- 52. Guo CX, Mat Nor MN, Danesh-Meyer HV, Vessey KA, Fletcher EL, O'Carroll SJ, Acosta ML, Green CR (2016).** Connexin43 Mimetic Peptide Improves Retinal Function and Reduces Inflammation in a Light-Damaged Albino Rat Model. *IOVS* ; 57(10).
- 53. Hadjichristou C, Christophidou-Anastasiadou V, Bakopoulou A, Tanteles GA, Loizidou MA, Kyriacou K, Hadjisavvas A, Michalakis K, Pissiotis A, Koidis P (2017).** Oculo-Dento-Digital Dysplasia (ODDD) Due to a GJA1 Mutation : Report of a Case with Emphasis on Dental Manifestations. *Int J Prosthodont* .; 30 (3):280–285.
- 54. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA (2011).** Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*; 117: 75-87.
- 55. Harada Y, Takahashi H, Trusheim H, Roth B, Mizuta K, Hirata-Saito A, Ogane T, Odagiri T, Tashiro M, Yamamoto N (2019).** Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds. *Influenza and Other Respiratory Viruses* ; 14 (2) : 204-209

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

56. **Hawat G, Benderdour M, Rousseau G, Baroudi G (2010).** Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury. *European Journal of Physiology* ; 460 ; 583–592
57. **Hervé JC (2012).** The communicating junctions, composition, structure and characteristics. *Biochim Biophys Acta*; 1818: 1803-1806
58. **Holmfeldt P, Brännström K, Stenmark S, Gullberg M (2003).** Deciphering the Cellular Functions of the Op18/Stathmin Family of Microtubule-Regulators by Plasma Membrane-targeted Localization. *Molecular Biology of the Cell*; 14 (9).
59. **Hoover WG (1985).** Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev*; 31: 1695-1697.
60. **Huang D, Chen YS, Green RG, Rupenthal ID (2018).** Hyaluronic acid coated albumin nanoparticles for targeted peptide delivery in the treatment of retinal ischaemia. *Biomaterials*; 168, 10-23
61. **Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2002).** Hypertension artérielle pulmonaire primitive. *Réanimation* ; 11(2) : 95-104.
62. **Iyyathurai J, D'hondt C, Wang N, De Bock M, Himpens B, Retamal MA, Stehberg J, Leybaert L, Bultynck G (2013).** Peptides and peptide-derived molecules targeting the intracellular domains of Cx43: Gap junctions versus hemichannels. *Neuropharmacology*, 75, 491-505.
63. **Jeyaraman MM, Srisakuldee W, Nickel BE, Kardami E (2012).** Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* ; 1818 (8) ; 2009-2013.
64. **Jhonson RG, Reynhout JK, TenBroek EM, Quade BJ, Yasumura T, Davidson KG, Sheridan JD, Rash JE (2012).** Gap junction assembly : roles for the formation plaque and regulation by the C-terminus of connexin43. *Molecular Biology of the Cell*, 23 : 71-86
65. **Johnson RG, Meyer RA, Li XR, Preus DM, Tan L, Grunenwald H, Paulson AF, Laird DW, Sheridan JD (2002).** Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Exp Cell Res.*; 275(1):67-80
66. **Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Burrer C , de Mora IA, Delmar M, Taffet SM (2007).** Evidence for the presence of a Free C-terminal fragment of Cx43 in cultured cells. *Cell Communication and Adhesion*, 14: 75–84
67. **Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P (2020).** Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* ; 72(9) :1145–115.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

68. **Kameritsh P, Pogoda K, Pohl U (2012)**. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1818, 1993-2001
69. **Kanczuga-Koda L, Koda M, Sulkowski S, Wincewicz A, Zalewski B, Sulkowska M (2010)**. Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer - a shift from membranous CX32 and CX43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. *In Vivo*; 24: 101-107.
70. **Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S, Spray DC (2007)**. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol.*; 94 (1-2):245-264.
71. **Kotini M, Mayor R (2015)**. Connexins in migration during development and cancer. *Dev Biol*; 401: 143-151.
72. **Kumar A, Choudhir G, Shukla SK, Sharma M, Tyagi P, Bhushan A, Rathore M (2020)**. Identification of phytochemical inhibitors against main protease of COVID-19 using molecular modeling approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: 1–11.
73. **Laird DW (2006)**. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*; 394: 527-543.
74. **Laird DW (2014)**. Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett*, 588(8), 1339-1348
75. **Laird DW, Lampe PD (2018)**. Therapeutic strategies targeting connexins. *Nat Rev Drug Discov.*; 17(12): 905–921.
76. **Lamiche C, Clarhaut J, Strale PO, Crespin S, Pedretti N, Bernard FX, Naus CC, Chen VC, Foster LJ, Defamie N, Mesnil M, Debais F, Cronier L (2012)**. The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis* ; 29: 111–122
77. **Lamouille S, Smyth J W, O'Rourke L, Kanabur P, Guo S, Jourdan J, Sheng Z, Gourdie RG (2017)**. Targeting glioblastoma cancer stem cells with a novel Connexin43 mimetic peptide. *Tumor Biology*; 77(13).
78. **Lampe PD, Lau AF (2004)**. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* ; 36 (7) : 1171-1186
79. **Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF (2000)**. Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase C Regulates Gap Junctional Communication *J Cell Biol* ; 149 (7): 1503–1512.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 80. Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan B J, Laird D W (2010).** The tumor-suppressive function of Connexin43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1. *Cancer Res*; 70: 4222-4232.
- 81. Lauf U, Giepmans BNG, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM (2002).** Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Cell Biology*, vol.19, 10447-10451
- 82. Leithe E, Mesnil M, Aasen T (2018).** The connexin 43 C-terminus : A tail of many tales *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*; 1860 (1) : 48-64.
- 83. Lilly E, Sellito C, Milstone LM, White TW (2016).** Connexin channels in congenital skin disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 50:4-12.
- 84. Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF (2001).**v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol*; 154 (4): 815–828.
- 85. Liu X, Sun L, Torii M, Rakic P (2012).** Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 22; 109(21): 8280–8285
- 86. Lucey B P, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009).** Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* .;133 (9):1463-7.
- 87. Lunghi M, Patriarca A, Greco M, Taherinasab A, Della Starza I, Cavalli M, Gaidano G, Foà R, Chiaretti S (2021).** Ponatinib for the treatment of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*; 62: 755-757.
- 88. Maqbool R, Rashid R, Ismail R, Niaz S, Chowdri NA, Hussain MU (2015).** The carboxy-terminal domain of connexin 43 (CT-Cx43) modulates the expression of p53 by altering miR-125b expression in low-grade human breast cancers. *Cell Oncol (Dordr)*; 38: 443-451.
- 89. Marquez-Rosado L, Solan JL, Dunn CA, Norris RP, Lampe PD (2012).** Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818 : 1985-1992
- 90. Massaro F, Molica M, Breccia M (2018).** Ponatinib: a review of efficacy and safety. *Curr Cancer Drug Targets*; 18: 847-856.
- 91. Matsuuchi L, Naus CC (2013).** Gap junction proteins on the move: Connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochem Biophys Acta*; 1828: 94-108.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 92. Meng X., Zhang H., Mezei M., Cui M (2011).** Ammarage moléculaire: une approche puissante pour la découverte de médicaments basée sur la structure. *HHS*; 7, 2, :146-157.
- 93. Mesnil M (2004).** Gap junctions and cancer: implications and perspectives. *Med Sci*; 20: 197-206.
- 94. Molica F, Meens MJ, Morel S, Kwak BR (2014).** Mutations in cardiovascular connexin genes. *Bio Cell*, 106 (9), 269-293
- 95. Montgomery J, Ghatnekar G S, Grek CL, Moyer KE, Gourdie RG (2018).** Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.*; 19 (6), 1778.
- 96. Mylvaganam S, Ramani M, Krawczyk M, Carlen PL (2014).** Roles of gap junctions, connexins and pannexins in epilepsy. *Front Physiol*, 5 : 172
- 97. Naus CC, Laird DW (2010).** Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* ; 10 (6):435-41.
- 98. Naveja JJ, Dueñas-González A, Medina-Franco JL (2016).** Chapter 12 - Drug Repurposing for Epigenetic Targets Guided by Computational Methods. *Epi-Informatics Discovery and Development of Small Molecule Epigenetic Drugs and Probes* ; 327-357
- 99. Nosé S (1984).** A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J Chem Phys*; 81: 511-519.
- 100. Novac N (2013).** Défis et opportunités du repositionnement des médicaments. *Tendances des sciences pharmacologiques* ; 34(5) : 267-272.
- 101. Ogawa K, Pitchakarn P, Suzuki S, Chewonarin T, Tang MX, Takahashi S, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Shirai T (2012).** Silencing of connexin 43 suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Science* ; 103 (5) : 837-967
- 102. Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Nishimura T, Enomoto K. J (2007).** Pathological significance of intracytoplasmic connexin proteins: implication in tumor progression. *Membr Biol.*; 218(1-3):73-7.
- 103. Pagan F, Hebron M, Valadez EH, Torres-Yaghi Y, Huang X, Mills RR, Wilmarth BM, Howard H, Dunn C, Carlson A, Lawler A, Rogers SL, Falconer R A, Ahn J, Li Z, Moussa C (2016b).** Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies ; *Journal of Parkinson's Disease* ; 6, 3 : 503-517

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 104. Pagan FL, Hebron ML, Wilmarth B, Torres-Yaghi Y, Lawler A, Mundel EE, Yusuf N, Starr NJ, Anjum M, Arellano J, Howard HH, Shi W, Mulki S, Kurd-Misto T, Matar S, Liu X, Ahn J, Moussa C (2016a).** Nilotinib Effects on Safety, Tolerability, and Potential Biomarkers in Parkinson Disease: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*; 77: 309-317.
- 105. Parrinello M, Rahman A (1981).** Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J Appl Phys*; 52: 7182.
- 106. Paznekas W A, Karczeski B, Vermeer S, Lowry RB, Delatycki M, Laurence F, Koivisto PA, Van Maldergem L, Boyadjiev SA, Bodurtha JN, Jabs EW (2009).** GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the Oculodentodigital Dysplasia phenotype. *Human Mutation*, Vol. 30, No. 5, 724–733
- 107. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011).** SignalP 4.0 : discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat.Methods* ; 8 : 785-786.
- 108. Pointis G, Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Segretain D (2007).** Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem.*; 14 (21):2288-303
- 109. Pollok S, Pfeiffer AC, Lobmann R, Wright CS, Moll I, Martin PEM, Brandner JM (2011).** Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* ; 15(4) : 861-873
- 110. Prelich G (2012).** Gene Overexpression : Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics* ; 190, (3) : 841–854.
- 111. Price KE, Saleem N, Lee G, Steinberg M (2013).** Potential of ponatinib to treat chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Onco Targets Ther*; 6: 1111-1118.
- 112. Qiu X, Cheng JC, Zhao J, Chang HM, Leung PCK (2015).** Transforming growth factor- $\beta$  stimulates human ovarian cancer cell migration by up-regulating connexin43 expression via Smad2/3 signaling. *Cellular signalling*; 27(10), 1956-1962
- 113. Qiu X, Cheng JC, Klausen C, Chang HM, Fan Q, Leung PC (2016).** EGF-induced connexin43 negatively regulates cell proliferation in human ovarian cancer. *J Cell Physiol*; 231: 111-119.
- 114. Rhee DY, Zhao XQ, Francis RJB, Huang GY, Mably JD, Lo CW (2009).** Connexin 43 regulates epicardial cell polarity and migration in coronary vascular development. *Development*. 15; 136(18): 3185–3193

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 115. Richards TS, Dunn CA, Carter WG , Usui ML, Olerud JE, Lampe PD (2004).** Protein kinase C spatially and temporally regulates gap junctional communication during human wound repair via phosphorylation of connexin 43 on serine 368. *The Journal of Cell Biology*, vol 167, No 3, 555-562
- 116. Rodríguez-Sinovas A (2009).** Cx43 phosphorylation and cardioprotection. *Cardiovascular Research*; 83(4) ; 613–614
- 117. Ryszawy D, Sarna M, Rak M, Szpak K, Kędracka-Krok , Michalik M, Siedlar M, Zuba-Surma E, Burda K, Korohoda W, Madeja Z, Czyż J (2014).** Functional links between Snail-1 and Cx43 account for the recruitment of Cx43-positive cells into the invasive front of prostate cancer. *Carcinogenesis*; 35: 1920-1930.
- 118. Sacha T, Saglio G (2018).** Nilotinib in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Future Oncol*; 15: 953-965.
- 119. Sáez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL (1997).** Phosphorylation of Connexin43 and the Regulation of Neonatal Rat Cardiac Myocyte Gap Junctions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* ; 29(8), 2131-2145
- 120. Saidi Brikci-Nigassa A, Clement MJ, Ha-Duong T, Adjadj E, Ziani L, Pastre D, Curmi PA, Savarin P (2012).** Phosphorylation Controls the Interaction of the Connexin43 C-Terminal Domain with Tubulin and Microtubules. *Biochemistry*; 51: 4331-4342.
- 121. Salat-Canela C, Muñoz MJ, Sesé M, Ramón y Cajal S, Aasen T (2015).** Post-transcriptional regulation of connexins. *Biochem Soc Trans.*;43(3):465-70.
- 122. Salat-Canela C, Sesé M, Peula C, Ramón y Cajal S, Aasen T (2014).** Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell Commun Signal.*;12-31.
- 123. Sarrouilhe D, Dejean C (2015).** Gap junctions : A new therapeutic target in major depressive disorder ? *Rev Neurol (Paris)*, 171 (11), 762-767
- 124. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012).** NIH Image ti ImageJ : 25 years of image analysis. *Nat.Methods* ; 9 : 671-675.
- 125. Schulz R, Görge PM, Görbe A, Ferdinandy P, Lampe PD, Leybaert L (2015).** Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacology and Therapeutics*, 153 : 90-106
- 126. Senger MR, Evangelista TCS, Dantas RF, Santana MVS, Saramago LC, Neto G, Lauro RS, Ferreira SB, Silva-Junior FP (2020).** COVID-19: molecular targets, drug repurposing and new avenues for drug discovery *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 115.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 127. Sirnes S, Kjenseth A, Leithe E, Rideval E (2009).** Interplay between PKC and MAP Kinase pathway in connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication. *Biomolecular and Biophysical Research Communications*, 382, 41-45
- 128. Smyth J.W., Shaw R.M. (2013).** Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep.* 5:611–618
- 129. Smyth JW, Shaw RM (2012).** The gap junction life cycle. *Heart Rhythm.* 9(1), 151-153
- 130. Smyth JW, Zhang S, Sanchez JM, Lamouille S, Vogan JM, Hesketh GG, Hong TT, Tomaselli GF, Shaw RM (2014).** A 14-3-3 Mode-1 Binding Motif Initiates Gap Junction Internalization During Acute Cardiac Ischemia. *Traffic* ; 15(6) : 583-726.
- 131. Solan JL, Fry MD, TenBroek EM, Lampe PD (2003).** Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J Cell Sci.*;116(Pt 11):2203-11.
- 132. Solan JL, Lampe PD (2009a).** Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membrane Biol* , 217, 35–41
- 133. Solan JL, Lampe PD (2005).** Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* ; 1711(2) : 154-163.
- 134. Solan JL, Lampe PD (2008).** Connexin43 in LA-25 Cells with Active v-src Is Phosphorylated on Y247, Y265, S262, S279/282, and S368 via Multiple Signaling Pathways. *Cell Communication & Adhesion* ; 5 : 1-2.
- 135. Solan JL, Lampe PD (2009b).** Connexin43 phosphorylation: Structural changes and biological effects. *Biochem J*; 419: 261–272.
- 136. Solan JL, Lampe PD (2014).** Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.*; 588(8): 1423–1429.
- 137. Solan JL, Márquez-Rosado L, Lampe PD (2019).** Cx43 phosphorylation–mediated effects on ERK and Akt protect against ischemia reperfusion injury and alter the stability of the stress-inducible protein NDRG1. *Cell Biology* ; 294 (31), 11762-11771.
- 138. Sorgen PL, Trease AJ, Spagnol G, Delmar M, Nielsen MS (2018).** Protein–Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *Int J Mol Sci.*;19(5): 1428
- 139. Spagnol G, Kieken F, Kopanic JL, Li H, Zach S, Stauch KL, Grosely R, Sorgen PL (2016).** Structural Studies of the Nedd4 WW Domains and Their Selectivity for the Connexin43 (Cx43) Carboxyl Terminus. *J Biol Chem.*; 291(14): 7637-50.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

140. Sun Q, Wang D, Ai G, Tian L, Zhao L, Chen R., Wang K, Guo D, Yao Y, Liu W, Kong X, Chen X, Zhang Y (2018). Epac1 is involved in cell cycle progression in lung cancer through PKC and Cx43 regulation. *Folia Histochem Cytobiol*; 56: 21-26.
141. Sun Y, Zhao X, Yao Y, Qi X, Yuan Y, Hu Y (2012). Connexin 43 interacts with Bax to regulate apoptosis of pancreatic cancer through a gap junction-independent pathway. *Int J Oncol.*; 41(3):941-8.
142. Sutcliffe JES, Chin KY, Thrasivoulou C, Serena TE, O'Neil S, Hu R, White AM, Madden L, Richards T, Phillips AR, Becker DL (2015). Abnormal connexin expression in human chronic wounds. *British Journal of Dermatology* ; 173(5) : 1113-1347
143. Tabernero A, Gangoso E, Jaraíz-Rodríguez M, Medina JM (2016). The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. *Neuroscience*; 323: 183-194.
144. Talamo Guevara M, McColley SA (2017). The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Opin Drug Saf*; 16: 1305-1311.
145. Tan P, He L, Xing C, Mao J, Yu X, Zhu M, Diao L, Han L, Zhou Y, You MJ, Wang HY, Wang RF (2019). Myeloid loss of Beclin 1 promotes PD-L1hi precursor B cell lymphoma development. *J Clin Invest*; 129: 5261-5277.
146. Tate AW, Lung T, Radhakrishnan A, Lim SD, Lin X, Edlund M (2006). Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *The prostate* ; 66 (1) ; 1-114
147. Tonkin RS, Chamini CB, Brooke JP, Preet AK, Makker GS, Duffy SS, Lees JG, Tran C, Don AS, Fath T, Liu L, O'Carroll SJ, Nicholson LFB, Green CR, Gorrie C, Moalem-Taylor G (2018). Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice. *Experimental Neurology*; 300, 1-12.
148. Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem*; 31: 455-461.
149. Tsai HC, Lehman CW, Lin CC, Tsai SW, Chen CM (2019). Functional evaluation for adequacy of MDCK-lineage cells in influenza research. *BMC Res Notes*; 12(1) :101.
150. Ul-Hussain M, Dermietzel R, Zoidl G (2008b). Characterization of the internal IRES element of the zebrafish connexin55.5 reveals functional implication of the polypyrimidine tract binding protein. *BMC Mol. Biol.* 9:92:10.1186/1471-2199-9-92.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 151. Ul-Hussain M, Olk S, Schoenebeck B, Wasielewski B, Meier C, Prochnow N, May C, Galozzi S, Marcus K, Zoidl G, Dermietzel R (2014).** Internal ribosomal entry site (IRES) activity generates endogenous carboxyl-terminal domains of Cx43 and is responsive to hypoxic conditions. *J Biol Chem.*;289 (30):20979-20990.
- 152. Ul-Hussain M, Zoidl G, Klooster J, Kamermans M, Dermietzel R (2008a).** IRES-mediated translation of the carboxy-terminal domain of the horizontal cell specific connexin Cx55.5 in vivo and in vitro. *BMC Mol. Biol.* 9:52:1471-2199-9-52.
- 153. Verma RP, Hansch C (2006).** Chemical Toxicity on HeLa Cells *Curr Med Chem .;* 13(4): 423-48.
- 154. Vijesh A M., Isloor A M., Telkar S., Arulmoli T., Fun H-K (2013).** Études d'amarrage moléculaire de certains nouveaux dérivés d'imidazole pour leurs propriétés antimicrobiennes. *Journal arabe de chimie ;* 6(2) : 197-204.
- 155. Villares GJ, Zigler M, Bar-Eli M (2011).** The emerging role of the thrombin receptor (PAR-1) in melanoma metastasis--a possible therapeutic target. *Oncotarget;* 2: 8-17.
- 156. Wang Q, Najib HH, Dirie I, Lu Y, Zhang J, Cui L, Qin B, Wang Y, Zhu J, Xun Y, Zhu Y, Wu Y, Wang S (2018).** High Concentration of Calcium Promotes Mineralization in NRK-52E Cells Via Inhibiting the Expression of Matrix Gla Protein. *Urology ;* 119 : 161-167.
- 157. Warren LG, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, Lindvall M, Nevins N, Semus SF, Senger S, Tedesco G, Wall ID, Woolven JM, Peishoff CE, Head MS (2006).** A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Med Chem;* 5; 49: 5912-5931.
- 158. Wingard JC, Zhao HB (2015).** Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss. A common hereditary deafness. *Front Cell Neurosci,* 9 :202
- 159. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR (2018).** Assemblage DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res;* 46: 1074-1082.
- 160. Wright CS, Van Steensel MAM, Hodgins MB, Martin PEM (2009).** Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *Wound Repair and Regeneration,* 17, 240-249
- 161. Wu J, Wang LH (2019).** Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *Journal of Biomedical Science,* 26 (8)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 162. Xu HT, Li QC, Zhang YX, Zhao Y, Liu Y, Yang ZQ, Wang EH (2008).** Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol*; 46: 315-321.
- 163. Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW (2006).** Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* ; 133 (18): 3629–3639.
- 164. Yasu T, Momo K, Kobayashi S, Kuroda S, Tojo A (2018).** Simple determination of plasma ponatinib concentration using HPLC. *Biol Pharm Bull*; 41: 254-258.
- 165. Ye XY, Jiang QH, Hong T, Zhang ZY, Yang RJ, Huang JQ, Hu K, Peng YP (2015).** Altered expression of connexin43 and phosphorylation connexin43 in glioma tumors. *Int J Clin Exp Pathol*; 8: 4296-4306.
- 166. Ye XY, Jiang QH, Hong T, Zhang ZY, Yang RJ, Huang JQ, Hu K, Peng YP (2015).** Altered expression of connexin43 and phosphorylation connexin43 in glioma tumors. *Int J Clin Exp Pathol* , 8(5):4296-4306
- 167. Yin W, Mao C, Luan X, Shen DD, Shen Q, Su H, Wang X, Zhou F, Zhao W, Gao M, Chang S, Xie YC, Tian G, Jiang HW, Tao SC, Shen J, Jiang Y, Jiang H, Xu Y, Zhang S, Zhang Y, Xu H E (2020).** Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*; 368: 1499-1504.
- 168. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006).** Prediction of protein subcellular localization. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics* ; 64 : 643-651.
- 169. Zhang A, Hitomi M, Bar-Shain N, Dalimov Z, Ellis L, Velpula KK, Fraizer GC, Gourdie RG, Lathia JD (2015).** Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget*; 6: 11640-51.
- 170. Zhang SS and Shaw RM (2014).** Trafficking highways to the intercalated disc: New insights unlocking the specificity of connexin 43 localization. *Communication and Adhesion*, 21:1, 43-54
- 171. Zhong C, Chang H, Wu Y, Zhou L, Wang Y, Wang M, Wu P, Qi Z, Zou J (2018).** Up-regulated Cx43 phosphorylation at Ser368 prolongs QRS duration in myocarditis *J Cell Mol Med*;22(7):3537-3547.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Analyse des résultats de la quantification de la migration cellulaire par le test de Tukey

### Annexe 1 : Comparaison des différents paramètres entre les différents isoformes dans les cellules NRK

- **Directionnalité (D)**

#### One-way ANOVA: DC; DCx43; DR239; DY247; DS262; DS368; DCt228; DCt234; DCt234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	8	4,2671	0,5334	24,57	0,000
Error	491	10,6572	0,0217		
Total	499	14,9243			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DCt228	62	0,7626	A B
DCt234	58	0,7229	A B C
DR239	54	0,6997	B C
DCt234m	52	0,6964	B C
DY247	64	0,6745	C
DCx43	58	0,6670	C
DS262	30	0,6621	B C
DS368	62	0,4605	D

Means that do not share a letter are significantly different.

#### One-way ANOVA: DC; DCt228; DCt234

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	0,1250	0,0625	4,22	0,016
Error	177	2,6234	0,0148		
Total	179	2,7484			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DCt228	62	0,7626	A B
DCt234	58	0,7229	B

Means that do not share a letter are significantly different.

#### One-way ANOVA: DC; DCx43; DS368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	3,3444	1,6722	61,35	0,000
Error	177	4,8243	0,0273		
Total	179	8,1688			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DCx43	58	0,6670	B
DS368	62	0,4605	C

#### One-way ANOVA: DC; DCx43

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Factor	1	0,4284	0,4284	22,63	0,000
Error	116	2,1956	0,0189		
Total	117	2,6240			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DCx43	58	0,6670	B

### One-way ANOVA: DC; DCx43; DR239; DY247; DS262; DS368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	3,5421	0,7084	26,87	0,000
Error	322	8,4893	0,0264		
Total	327	12,0314			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DR239	54	0,6997	B
DY247	64	0,6745	B
DCx43	58	0,6670	B
DS262	30	0,6621	B
DS368	62	0,4605	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: DC; DCx43; DCt228; DCt234; DCt234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	0,5556	0,1389	9,07	0,000
Error	285	4,3635	0,0153		
Total	289	4,9191			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DC	60	0,7876	A
DCt228	62	0,7626	A B
DCt234	58	0,7229	B C
DCt234m	52	0,6964	C
DCx43	58	0,6670	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: DCt234; DCt234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,0193	0,0193	1,32	0,253
Error	108	1,5778	0,0146		
Total	109	1,5970			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DCt234	58	0,7229	A
DCt234m	52	0,6964	A

Grouping Information Using Tukey Method

- **Centre de masse (CM)**

### One-way ANOVA: CMC; CMCx43; CMR239; CMY247; CMS262; CMS368; CMct228; ...

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Factor	8	48429	6054	0,47	0,880
Error	491	6378485	12991		
Total	499	6426914			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
CMC	60	196,2	A
CMS368	62	188,2	A
CMS262	30	184,4	A
CMCt234	58	173,1	A
CMR239	54	172,9	A
CMCt234m	52	172,0	A
CMY247	64	170,9	A
CMCx43	58	170,0	A
CMCt228	62	165,1	A

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance accumulée (DA)**

### **One-way ANOVA: DAC; DACx43; DAR239; DAY247; DAS262; DAS368; DACt228; ...**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	8	1161156	145145	31,81	0,000
Error	491	2240117	4562		
Total	499	3401273			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DACT234m	52	270,88	A
DACT234	58	232,24	A B
DACx43	58	216,76	B C
DAS262	30	204,64	B C
DAR239	54	188,87	C
DACT228	62	188,03	C
DAY247	64	181,97	C
DAC	60	124,43	D
DAS368	62	108,76	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### **One-way ANOVA: DAC; DACx43**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	251462	251462	27,56	0,000
Error	116	1058366	9124		
Total	117	1309829			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DACx43	58	216,76	A
DAC	60	124,43	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### **One-way ANOVA: DACx43; DAR239; DAY247; DAS262; DAS368**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	412431	103108	16,73	0,000
Error	263	1621162	6164		
Total	267	2033593			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DACx43	58	216,76	A
DAS262	30	204,64	A
DAR239	54	188,87	A
DAY247	64	181,97	A
DAS368	62	108,76	B

### One-way ANOVA: DACx43; DACT228; DACT234; DACT234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	201161	67054	10,33	0,000
Error	226	1466941	6491		
Total	229	1668102			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DACT234m	52	270,88	A
DACT234	58	232,24	A B
DACx43	58	216,76	B C
DACT228	62	188,03	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: DEC; DECx43; DER239; DEY247; DES262; DES368; DECT228; ...

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	8	726113	90764	39,62	0,000
Error	506	1159076	2291		
Total	514	1885189			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DECT234m	52	187,21	A
DECT234	58	167,13	A B
DECT228	62	142,65	B C
DECx43	58	139,63	B C D
DES262	30	133,32	C D
DER239	54	128,25	C D
DEY247	79	114,74	D E
DEC	60	97,38	E
DES368	62	51,44	F

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance euclidienne (DE)**

### One-way ANOVA: DECx43; DER239; DEY247; DES262; DES368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	299493	74873	27,60	0,000
Error	278	754112	2713		
Total	282	1053605			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DECx43	58	139,63	A
DES262	30	133,32	A B
DER239	54	128,25	A B
DEY247	79	114,74	B
DES368	62	51,44	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**One-way ANOVA: DECx43; DECT228; DECT234; DECT234m**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	83385	27795	9,10	0,000
Error	226	690556	3056		
Total	229	773940			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DECT234m	52	187,21	A
DECT234	58	167,13	A B
DECT228	62	142,65	B C
DECx43	58	139,63	C

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Vitesse (V)**

**One-way ANOVA: VC; VCx43; VR239; VY247; VS262; VS368; VCt228; VCt234; VCt234m**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	8	0,39866	0,04983	38,83	0,000
Error	506	0,64936	0,00128		
Total	514	1,04802			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
VCt234	58	0,14041	A
VCt234m	52	0,13496	A
VY247	79	0,13303	A
VCt228	62	0,12818	A B
VCx43	58	0,12177	A B
VR239	54	0,11333	B
VS262	30	0,10497	B C
VC	60	0,08578	C
VS368	62	0,05167	D

**One-way ANOVA: VCx43; VR239; VY247; VS262; VS368**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	0,25807	0,06452	37,83	0,000
Error	278	0,47415	0,00171		
Total	282	0,73222			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
VY247	79	0,13303	A
VCx43	58	0,12177	A B
VR239	54	0,11333	A B
VS262	30	0,10497	B
VS368	62	0,05167	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**One-way ANOVA: VCx43; VCt228; VCt234; VCt234m**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	0,01138	0,00379	2,98	0,032
Error	226	0,28718	0,00127		
Total	229	0,29856			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
VCt234	58	0,14041	A
VCt234m	52	0,13496	A B
VCt228	62	0,12818	A B
VCx43	58	0,12177	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Annexe 2 : Comparaison des différents paramètres entre les différents isoformes dans les cellules HeLa

- **Directionnalité (D)**

### One-way ANOVA: Dc; DGFP; Dcx43; Dy247; Dct228; Dct234

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	3,7919	0,7584	23,32	0,000
Error	326	10,6020	0,0325		
Total	331	14,3940			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dc	70	0,5950	A
DGFP	60	0,5189	A B
Dy247	22	0,4437	B C
Dct228	66	0,3690	C
Dct234	26	0,3535	C
Dcx43	88	0,3224	C

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Centre de masse (CM)**

### One-way ANOVA: CMc; CMGFP; CMcx43; CMY247; CMct228; CMct234

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	200203	40041	4,42	0,001
Error	326	2952487	9057		
Total	331	3152690			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
CMct228	66	203,87	A
CMcx43	88	197,62	A
CMc	70	188,67	A
CMct234	26	171,56	A B
CMY247	22	166,11	A B
CMGFP	60	134,43	B

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance accumulée (DA)**

### One-way ANOVA: Dac; DAGFP; DAcx43; DAY247; DAct228; DAct234

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	241724	48345	46,13	0,000
Error	326	341654	1048		
Total	331	583378			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DAGFP	60	151,00	A
DAct234	26	110,70	B
DAy247	22	96,39	B C
Dac	70	88,15	C
DAct228	66	87,31	C D
DAcx43	88	73,07	D

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance euclidienne (DE)**

**One-way ANOVA: Dec; DEGFP; DEcx43; DEy247; DEct228; DEct234**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	119567	23913	54,90	0,000
Error	326	142011	436		
Total	331	261578			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DEGFP	60	75,83	A
Dec	70	52,46	B
DEy247	22	43,02	B C
DEct234	26	36,40	C
DEct228	66	31,85	C
DEcx43	88	21,85	D

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Vitesse (V)**

**One-way ANOVA: Vc; VGFP; Vcx43; Vy247; Vct228; Vct234**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	0,145746	0,029149	33,07	0,000
Error	324	0,285573	0,000881		
Total	329	0,431319			

## Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
VGFP	60	0,10596	A
Vy247	22	0,10146	A B
Vc	70	0,09808	A B
Vct228	65	0,09247	A B
Vct234	25	0,08099	B
Vcx43	88	0,05173	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Annexe 3 : Comparaison des différents paramètres entre les différents isoformes dans les cellules MDCK**

- **Directionnalité (D)**

**One-way ANOVA: Dc; Dcx43; Dr239; Ds262; Ds368; Dct228; Dct234; Dct234m**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	7	4,4366	0,6338	21,03	0,000

Error	314	9,4637	0,0301
Total	321	13,9003	

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dc	21	0,8418	A
Ds262	30	0,5608	B
Dct234m	20	0,5094	B C
Dcx43	20	0,4676	B C D
Dct234	102	0,4245	C D
Dct228	58	0,4062	C D
Dr239	26	0,3807	C D
Ds368	45	0,3474	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dc; Dcx43; Dr239; Ds262; Ds368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	3,9838	0,9960	42,55	0,000
Error	137	3,2067	0,0234		
Total	141	7,1905			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dc	21	0,8418	A
Ds262	30	0,5608	B
Dcx43	20	0,4676	B C
Dr239	26	0,3807	C D
Ds368	45	0,3474	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dc; Dcx43; Dct228; Dct234; Dct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	3,3810	0,8452	26,29	0,000
Error	216	6,9455	0,0322		
Total	220	10,3265			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dc	21	0,8418	A
Dct234m	20	0,5094	B
Dcx43	20	0,4676	B
Dct234	102	0,4245	B
Dct228	58	0,4062	B

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Centre de masse (CM)**

### One-way ANOVA: CMc; CMcx43; CMr239; CMs262; CMs368; CMct228; CMct234; CMct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	7	242241	34606	3,05	0,004
Error	314	3564616	11352		
Total	321	3806857			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
CMct234m	20	211,0	A

CMs368	45	197,6	A
CMct234	102	195,7	A
CMcx43	20	180,0	A
CMs262	30	177,1	A
CMr239	26	155,7	A
CMct228	58	136,2	A
CMc	21	125,1	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: CMc; CMcx43; CMr239; CMs262; CMs368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	84513	21128	1,59	0,181
Error	137	1825124	13322		
Total	141	1909637			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
CMs368	45	197,6	A
CMcx43	20	180,0	A
CMs262	30	177,1	A
CMr239	26	155,7	A
CMc	21	125,1	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: CMc; CMcx43; CMct228; CMct234; CMct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	208985	52246	5,19	0,001
Error	216	2175609	10072		
Total	220	2384595			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
CMct234m	20	211,0	A
CMct234	102	195,7	A
CMcx43	20	180,0	A B
CMct228	58	136,2	B
CMc	21	125,1	A B

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance accumulée (DA)**

### One-way ANOVA: Dac; DAcx43; DAr239; DAs262; DAs368; DAct228; DAct234; DAct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	7	555365	79338	16,49	0,000
Error	314	1510494	4810		
Total	321	2065860			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DAs368	45	232,82	A
DAct234m	20	203,24	A B
DAct234	102	187,97	B
DAr239	26	161,39	B C
DAs262	30	154,71	B C D
Dac	21	121,28	C D
DAcx43	20	114,52	C D
DAct228	58	110,53	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dac; DAcx43; DAr239; DAs262; DAs368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	297911	74478	9,88	0,000
Error	137	1032559	7537		
Total	141	1330470			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DAs368	45	232,82	A
DAr239	26	161,39	B
DAs262	30	154,71	B
Dac	21	121,28	B
DAcx43	20	114,52	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dac; DAcx43; DAct228; DAct234; DAct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	328559	82140	32,37	0,000
Error	216	548115	2538		
Total	220	876674			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
DAct234m	20	203,24	A
DAct234	102	187,97	A
Dac	21	121,28	B
DAcx43	20	114,52	B
DAct228	58	110,53	B

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Distance euclidienne (DE)**

### One-way ANOVA: Dec; DEcx43; DEr239; DEs262; DEs368; DEct228; DEct234; DEct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	7	117908	16844	8,69	0,000
Error	314	608647	1938		
Total	321	726555			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dec	21	102,02	A
DEct234m	20	101,83	A
DEs368	45	90,64	A B
DEs262	30	89,55	A B C
DEct234	102	75,27	A B C
DEr239	26	59,11	B C D
DEcx43	20	54,59	C D
DEct228	58	43,84	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dec; DEcx43; DEr239; DEs262; DEs368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	42059	10515	3,54	0,009
Error	137	407256	2973		
Total	141	449316			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dec	21	102,02	A
DEs368	45	90,64	A B
DEs262	30	89,55	A B
DEr239	26	59,11	A B
DEcx43	20	54,59	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Dec; DEcx43; DEct228; DEct234; DEct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	89064	22266	19,41	0,000
Error	216	247773	1147		
Total	220	336837			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Dec	21	102,02	A
DEct234m	20	101,83	A
DEct234	102	75,27	B
DEcx43	20	54,59	B C
DEct228	58	43,84	C

Means that do not share a letter are significantly different.

- **Vitesse (V)**

### One-way ANOVA: Vc; Vcx43; Vr239; Vs262; Vs368; Vct228; Vct234; Vct234m

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	7	0,090713	0,012959	19,96	0,000
Error	314	0,203859	0,000649		
Total	321	0,294571			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Vc	21	0,11551	A
Vct234m	20	0,09542	A B
Vs368	45	0,08870	B
Vct234	102	0,08673	B
Vs262	30	0,07934	B C
Vr239	26	0,07472	B C
Vcx43	20	0,05873	C D
Vct228	58	0,05320	D

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Vc; Vcx43; Vr239; Vs262; Vs368

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	0,037508	0,009377	12,46	0,000
Error	137	0,103089	0,000752		
Total	141	0,140597			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Vc	21	0,11551	A
Vs368	45	0,08870	B
Vs262	30	0,07934	B C
Vr239	26	0,07472	B C
Vcx43	20	0,05873	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Vc; Vcx43; Vct228; Vct234; Vct234m

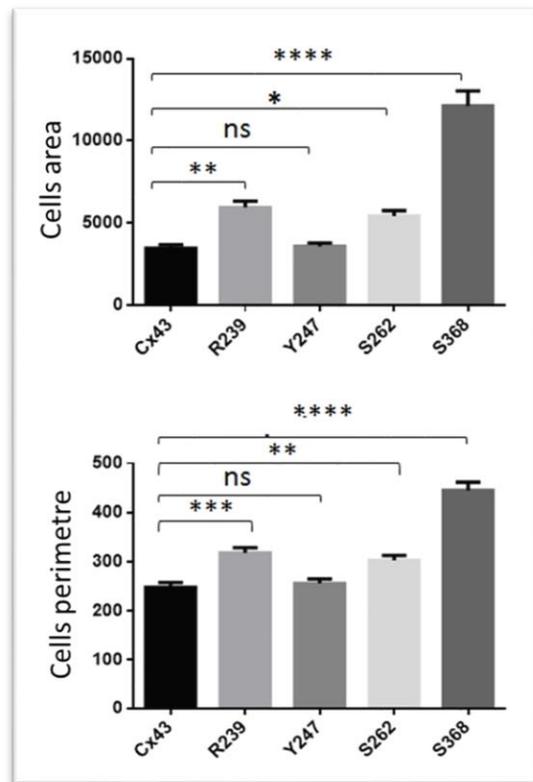
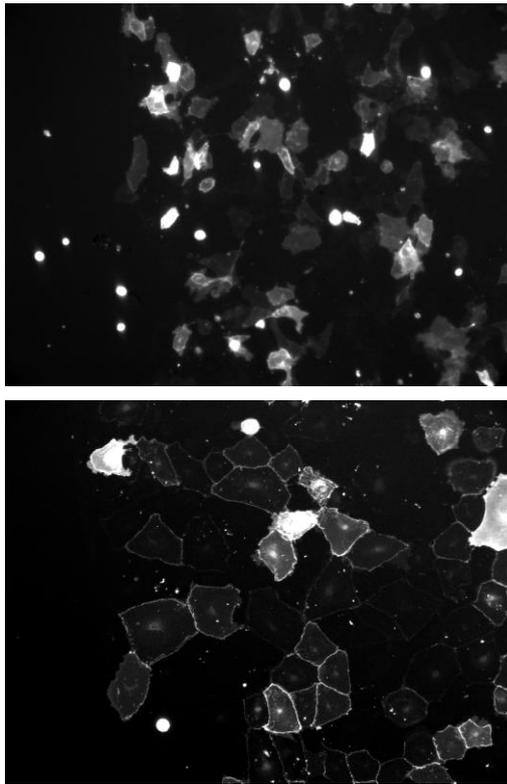
Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	0,086309	0,021577	35,88	0,000
Error	216	0,129910	0,000601		
Total	220	0,216219			

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Vc	21	0,11551	A
Vct234m	20	0,09542	A B
Vct234	102	0,08673	B
Vcx43	20	0,05873	C
Vct228	58	0,05320	C

Means that do not share a letter are significantly different.

## Annexe 4 : Effet de l'isoforme Cx43S368A sur la taille des cellules

**Impact de la mutation S368A sur la morphologie et la taille des cellules NRK.**

(A) Les cellules NRK transfectées par la construction Cx43S368A sont significativement plus grandes que les cellules NRK transfectées par le plasmide Cx43wt. (B) Quantification de la taille des cellules avec ROI manager (logiciel ImageJ) à partir d'images de microscopie vidéo. Pour chaque variant une trentaine de cellules transfectées ont été analysées et la moyenne de chaque paramètre comparée à celle du type sauvage une par une. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. La signification a été déterminée par ANOVA unidirectionnelle, le post-test de Dunnett. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns, non significatif

## Résumé

Cx43 est une protéine membranaire ubiquitaire de la famille des connexines, les protéines qui forment les gap junctions, structures assurant la communication intercellulaire. Au sein des canaux lacunaires et/ou indépendamment de cette fonction, les connexines et en particulier Cx43 régule plusieurs processus dont la migration cellulaire et la cancérogenèse.

Le but de cette recherche est d'étudier *in vitro*, l'impact de Cx43 et en particulier son extrémité C-terminale sur la migration et la polarisation cellulaire. Elle vise également par une étude *in silico*, à repositionner des médicaments dans le cadre de l'utilisation de cette protéine comme cible thérapeutique dans le traitement des cancers impliquant Cx43.

Les résultats révèlent un effet indéniable et très hétérogène de Cx43 sur la migration et la polarisation cellulaire. Les effets varient selon les types cellulaires testés, les variants Cx43 étudiés et les paramètres analysés. Cx43 impacte la migration via des événements de phosphorylation et éventuellement l'interaction de Cx43 avec la tubuline/microtubules

En ce qui concerne les résultats de l'amarrage et de la simulation moléculaires, il apparaît que parmi les molécules étudiées, le Nilotinib s'impose comme un candidat potentiel pour cibler le C-ter de Cx43 dans la thérapie du cancer.

Mots clés : Cx43, extrémité C-terminale, gap junctions, tubuline/microtubules, phosphorylation, migration, cancer, repositionnement des médicaments, docking moléculaire

## Summary

Cx43 is a ubiquitous membrane protein from the connexin family, the proteins that form gap junctions, structures ensuring intercellular communication. Within the lacunar channel and / or independently of this function, the connexins and in particular Cx43 regulate several processes including cell migration and cancerogenesis.

The aim of this research is to study *in vitro*, the impact of Cx43 and in particular its C-terminal extremity on cell migration and polarization. It also aims, through an *in silico* study, to reposition drugs in the context of the use of this protein as a therapeutic target in the treatment of cancers involving Cx43. The results reveal an undeniable and very heterogeneous effect of Cx43 on cell migration and polarization. The effects vary according to the cell types tested, the Cx43 variants studied and the parameters analyzed. Cx43 impacts migration via phosphorylation events and eventually the interaction of Cx43 with tubulin / microtubules Regarding the results of docking and molecular simulation, it appears that among the molecules studied, Nilotinib is emerging as a potential candidate to target Cx43 C-ter in cancer therapy.

Key words: Cx43, C-terminal extremity, gap junctions, tubulin / microtubules, phosphorylation, migration, cancer, drug repositioning, molecular docking

## ملخص 2

كنكسين 43 عبارة عن بروتين غشائي متواجد في معظم الخلايا، منتمي لعائلة الكنكسين، وهي بروتينات تشكل وصلات فجوة وهياكل تضمن الاتصال بين الخلايا. داخل قنوات الفجوة و / أو بشكل مستقل عن هذه الوظيفة ، تنظم الكنكسين وعلى وجه الخصوص كنيكسين 43 العديد من الوظائف بما في ذلك تهجرة الخلايا والتسرطن.

الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير كنيكسين 43 في المختبر وخاصة الذيل C- طرفي على هجرة الخلايا واستقطابها. كما تهدف ، من خلال دراسة بالسيليكو ، إلى إعادة وإستعمال الأدوية في سياق استخدام هذا البروتين كهدف علاجي في علاج السرطانات.

تكشف النتائج عن تأثير بارز وغير متجانس لـ كنيكسين 43 على هجرة الخلايا والاستقطاب. تختلف التأثيرات وفقاً لأنواع الخلايا التي تم اختبارها ومتغيرات كنيكسين 43 التي تمت دراستها والمعلومات التي تم تحليلها. يؤثر كنيكسين 43 على الهجرة عبر أحداث الفسفرة وربما تفاعلها مع التوبولين / الميكروتوبولين

فيما يتعلق بنتائج الالتحام والمحاكاة الجزيئية ، يبدو أنه من بين الجزيئات التي تمت دراستها ، يبرز النيلوتنيب كمرشح محتمل لاستهداف C ذيل كنيكسين 43 في علاج السرطان.

الكلمات الرئيسية: الكلمات الرئيسية: كوكسين 43 ، ذيل C ، وصلات الفجوة ، التبولين / الميكروتوبولين ، الفسفرة ، الهجرة ، السرطان ، إعادة وضع الأدوية ، الالتحام الجزيئي