

Université de Montréal

**LE RÔLE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LE
MÉTABOLISME DE LA CONNEXINE43 ET LEUR IMPACT SUR LA
COMMUNICATION INTERCELLULAIRE**

par
Mélissa-Anne Meilleur

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté d'études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M.Sc.)
en Pathologie et biologie cellulaire

Mars 2007

© Mélissa-Anne Meilleur, 2006.



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**LE RÔLE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LE
MÉTABOLISME DE LA CONNEXINE 43 ET LEUR IMPACT SUR LA
COMMUNICATION INTERCELLULAIRE**

présenté par :

Mélissa-Anne Meilleur

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Moïse Bendayan..... Président rapporteur
Dr Maria Leiza Vitale Directeur de recherche
Dr Marc Pelletier..... Codirecteur
Dr Victor Gisiger Membre du Jury

RÉSUMÉ

Les cellules folliculostellaires (FS) de l'hypophyse antérieure (HA) forment un réseau de communication dans cette glande. Grâce à cette communication intercellulaire, elles peuvent moduler la sécrétion hormonale intrahypophysaire. Ce sont des cellules capables de produire et de répondre à plusieurs molécules bioactives dont les cytokines. À l'aide des cellules modèles TtT/GF, nous avons observé que les cytokines proinflammatoires IFN- γ , IL-1 β et TNF- α induisent une diminution significative de la communication intercellulaire médiée par les jonctions communicantes entre les cellules FS. De plus, l'IL-1 β et le TNF- α induisent, en parallèle à la diminution de la CIJG, une déphosphorylation de la Cx43 en Ser368. Particulièrement, le TNF- α induit la déphosphorylation de la Cx43 déjà assemblée en jonctions communicantes. Nos résultats montrent que la PP2A et la PKC, entre autres, seraient impliquées dans la voie de signalisation menant aux changements de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et aux changements dans le niveau de communication intercellulaire entre les cellules FS médiés par le TNF- α . Les effets de l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α sont rapides et transitoires, soulignant la capacité des cellules FS de répondre rapidement aux signaux intrahypophysaires afin de moduler la sécrétion hormonale et la production de molécules bioactives via un réseau de communication.

MOTS CLEFS : cellules folliculostellaires, connexine43 phosphorylée, jonctions communicantes, protéine kinase, protéine phosphatase.

SUMMARY

The folliculostellate (FS) cells of the anterior pituitary (AP) form a communication network within the gland. This communication network enables the FS cells to modulate hormonal secretion within the AP. The FS cells can produce and respond to many bioactive molecules including cytokines. Using the cell line TtT/GF as a model for FS cells, we show here that the proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α are capable of significantly reducing gap junction-mediated intercellular communication (GJIC) between the TtT/GF cells. Furthermore, the reduction of GJIC by IL-1 β and TNF- α is linked to a dephosphorylation of the Ser368 residue of Cx43. Interestingly, TNF- α mainly induces the dephosphorylation of gap junction-assembled Cx43. Our results indicate that PP2A and PKC, among other molecules, may be involved in the signaling pathway leading to changes in the phosphorylation state of Cx43 and GJIC when FS cells are exposed to TNF- α . The effects of IFN- γ , IL-1 β and TNF- α are rapid and transient, highlighting the ability of FS cells to respond rapidly to proinflammatory signals and therefore to modulate hormonal secretion and production of bioactive molecules thanks to GJIC.

KEY WORDS : folliculostellate cells, phosphorylated connexin43, gap junctions, protein kinase, protein phosphatase.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des schémas	x
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Dédicace	xvii
Remerciements	xviii
1. Introduction	1
1.1. L'hypophyse, une glande maîtresse	1
1.1.1. Anatomie et vascularisation	1
1.1.2. Influence de l'hypothalamus	4
1.1.3. Diversité cellulaire	6
1.2. Les cellules FS	8
1.2.1. Les cellules FS et la communication intercellulaire	9
1.3. Les jonctions communicantes	11
1.3.1. Synthèse et dégradation des jonctions communicantes	12
1.3.2. Les connexons	15
1.3.3. Les connexines	17

1.3.4. La Connexine43	19
1.3.5. Phosphorylation de la Cx43	21
1.4. Les cytokines	25
1.4.1. L'interféron- γ	25
1.4.2. L'interleukine-1 β	27
1.4.3. Le facteur de nécrose tumorale- α	29
1.5. Hypothèse de travail	31
2. Matériels et méthodes.....	33
2.1. Anticorps	33
2.2. Cytokines et autres produits	34
2.3. Culture cellulaire	35
2.4. Préparation d'homogénats de cellules TtT/GF.....	37
2.5. Fractionnement subcellulaire	37
2.5.1. Fractions Triton-insolubles et Triton-solubles.....	37
2.6. Dosage des protéines	38
2.7. Électrophorèse et Western blot.....	39
2.7.1. Préparation d'échantillons pour le Western blot.....	39
2.7.2. Électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE.....	39
2.7.3. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	39
2.7.4. Western blot	40
2.7.5. Révélation des protéines par chimiluminescence.....	40
2.7.6. Lavage des membranes.....	41
2.7.7. Quantification des bandes immunoréactives	41
2.8. Immunofluorescence et microscopie confocale	42
2.8.1. Préparation des cellules	42

2.8.2. Fixation et perméabilisation.....	42
2.8.3. Blocage et incubation avec les anticorps.....	42
2.8.4. Montage des lamelles et observation.....	43
2.9. Communication intercellulaire : diffusion de colorants	43
2.9.1. Préparation des cellules	43
2.9.2. Marquage	43
2.9.3. Fixation, montage et observation	44
3. Résultats.....	45
3.1. Modulation de l'état de phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368	45
3.1.1. Présence de la Cx43 et la PCx43 dans les cellules TtT/GF non-traitées	45
3.1.2. Implication de la PKC	46
3.1.3. Implication de la PKA	49
3.1.4. Implication de ERK1/2.....	51
3.2. Corrélation entre l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et la CIJC	54
3.2.1. Effets sur la CIJC médiés par la PKC	54
3.2.2. Effets sur la CIJC médiés par la PKA	59
3.3. Impact de l'IFN- γ sur la PCx43 et la CIJC	64
3.3.1. Effets de l'IFN- γ sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368.....	64
3.3.2. Effets de l'IFN- γ sur la localisation intracellulaire de la PCx43.....	65
3.3.3. Effets de l'IFN- γ sur la CIJC	67

3.4. Impact de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et la CIJC	70
3.4.1. Effets de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en S368.....	70
3.4.2. Implication des PK dans l'effet de l'IL-1 β sur les cellules TtT/GF.....	71
3.4.3. Effets de l'IL-1 β sur la localisation intracellulaire de la PCx43.....	73
3.4.4. Effets de l'IL-1 β sur la CIJC.....	77
3.5. Impact du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et la CIJC	80
3.5.1. Effets du l'TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en S368	80
3.5.2. Effets du TNF- α sur la localisation intracellulaire de la PCx43	81
3.5.3. Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF	83
3.5.4. Implication des PK dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF	85
3.5.5. Études sur l'interaction potentielle entre la Cx43 et la PKC ou la PP2A après traitement avec le TNF- α	87
3.5.6. Effets du TNF- α sur la CIJC.....	94
4. Discussion	100
4.1. Modulation basale de la CIJC et de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368	101
4.1.1. La PKC est impliquée dans le maintien de la perméabilité des JC et de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368	101

4.1.2. La PKA est impliquée dans le maintien de la perméabilité des JC et de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368	103
4.1.3. Les ERK1/2 pourraient jouer un rôle dans le maintien de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368.....	104
4.2. Impact à court terme du TNF- α sur la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF	105
4.2.1. Le TNF- α induit une diminution rapide et transitoire de la CIJC	105
4.2.2. La diminution de la CIJC suite à un traitement avec le TNF- α corrèle avec la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368	106
4.2.3. Participation des PP et des PK dans l'effet du TNF- α sur la CIJC et sur la phosphorylation de la Cx43 en Ser368	107
4.3. Impact à court terme de l'IL-1 β sur la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF	111
4.3.1. L'IL-1 β induit une diminution rapide et transitoire de la CIJC	111
4.3.2. La diminution de la CIJC et l'état de phosphorylation de la Cx43.....	112
4.4. Impact à court terme de l'IFN- γ	115
4.4.1. L'IFN- γ induit une diminution de la CIJC.....	115
4.4.2. La diminution de la CIJC par l'IFN- γ ne dépend pas des changements de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368	116
5. Conclusion	117
6. Références.....	119

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 : L'hypophyse humaine.	2
Schéma 2 : Anatomie de l'hypophyse.	3
Schéma 3 : Vascularisation de l'hypophyse.	4
Schéma 4 : Représentation de jonctions communicantes.	12
Schéma 5 : Étapes de la synthèse et dégradation des JC.	13
Schéma 6 : Assemblage de cxons.	16
Schéma 7 : Structure des Cx.	18
Schéma 8 : Sites de phosphorylation de la Cx43.	22
Schéma 9 : Voie de signalisation JAK-STAT lors d'une stimulation avec l'IFN- γ	27
Schéma 10 : Voies de signalisation induites par l'IL-1 β	28
Schéma 11 : Voies de signalisation induites par le TNF- α	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Famille de la Cx.	16
Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés.	33
Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés.	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Western blots d'homogénats de cellules TtT/GF révélés avec différents anticorps contre la Cx43.	33
Figure 2 : Localisation des protéines S-100 et GFAP dans les cellules TtT/GF.	36
Figure 3 : Western Blot de cellules TtT/GF contrôles.	45
Figure 4 : Cinétique de l'effet de l'inhibition de l'activation de la PKC sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	47
Figure 5 : Cinétique de l'effet de la stimulation de la PKC sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	48
Figure 6 : Cinétique de l'effet de l'inhibition de l'activité de la PKA sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	50
Figure 7 : Cinétique de l'effet de la stimulation de la PKA sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	51
Figure 8 : Cinétique de l'effet de l'inhibition de la voie MAPK sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	52
Figure 9 : Effets de l'inhibition de la PKC sur la CIJG.	55
Figure 10 : Effets de la stimulation de la PKC sur la CIJG.	57
Figure 11 : Effets de l'inhibition de la PKA sur la CIJG.	60
Figure 12 : Effets de la stimulation de la PKA sur la CIJG.	62
Figure 13 : Cinétique de l'effet de l'IFN- γ sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	64
Figure 14 : Localisation intracellulaire de la PCx43 et de la NPCx43 suite à un traitement avec l'IFN- γ	66

Figure 15 : Effets de l'IFN- γ sur la CIJG.	68
Figure 16 : Cinétique de l'effet de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	70
Figure 17 : Participation de la PKC, PKA et MAPK dans les effets de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	72
Figure 18 : Localisation intracellulaire de la PCx43 et de la NPCx43 suite à un traitement avec l'IL-1 β	75
Figure 19 : Effets de l'IL-1 β sur la CIJG.	78
Figure 20 : Cinétique de l'effet du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	80
Figure 21 : Localisation intracellulaire de la PCx43 et de la NPCx43 suite à un traitement avec le TNF- α	82
Figure 22 : Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF.	84
Figure 23 : Participation de la PKC, PKA et MAPK dans les effets du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43.	86
Figure 24 : Taux de PCx43, PKC et PP2A dans la fraction Triton-insoluble des cellules TtT/GF traitées avec le TNF- α	88
Figure 25 : Taux de PCx43, PKC et PP2A dans la fraction Triton-soluble des cellules TtT/GF traitées avec le TNF- α	90
Figure 26 : Études en microscopie confocale de la colocalisation de la Cx43 et la PKC ou PP2A.	93
Figure 27 : Effets du TNF- α sur la CIJG.	96
Figure 28 : Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur la CIJG.	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH : corticotropine

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

bFGF : *bovine fetal growth factor*

CIJC : communication intercellulaire médiée par les jonctions communicantes

CK : cytosquelette

Cx : connexine

Cx43 : Connexine43

Cxon : connexon

CycA : cyclosporine A

DAG : diacyl glycérol

DMEM : *Dulbecco's modified Eagle medium*

EDTA : *ethylenediaminetetraacetic acid*

EGFR1 : récepteur du facteur de croissance épidermique

EGTA : *ethylene glycol-bis-tetraacetic acid*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

FBS : sérum fœtal bovin

FK : forskoline

FS : folliculostellaire

FS : folliculo-stellaire

FSH : hormone folliculo-stimulante

GFAP : protéine fibrillaire gliale acide

GH : hormone de croissance

HA : hypophyse antérieure

HC : hémi-canal

IFN- γ : interféron- γ

IL-1 β : interleukine-1 β

IL-6 : interleukine-6

IP₃ : inositol triphosphate

JC : jonction communicante

LH : hormone lutéinisante

LIF : *leukemia inhibitory factor*

LIPE : lipase sensible aux hormones

LY : lucifer-yellow, sel de lithium

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MEK1 et 2 : kinase de MAP 1 et 2

MEKK : kinase de MEK

MIF : *migration-inhibitory factor*

NC : non-cytosquelette

NK : *natural killer*

NPCx43 : Connexine43 non-phosphorylée en sérine 368

OA : acide okadaïque

PBS : *phosphate buffered saline*

PCx43 : Connexine43 phosphorylée en sérine 368

PK : protéine kinase

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PMA : Phorbol-1-Myristol-3-Acétate

PMSF : phényl-méthyl-sufonyl-fluoride

PP : protéine phosphatase

PP1 : protéine phosphatase 1

PP2 : protéine phosphatase 2

PPI : solution d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases

PRL : prolactine

RD : rhodamine-dextran

RE : réticulum endoplasmique

SCARB1 : *scavenger receptor class B member 1*

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEM : écart type de la moyenne

Ser364 : sérine 364

Ser368 : sérine 368

TBS : *tris buffered saline*

TCA : acide trichloroacétique

TNF- α : facteur de nécrose tumorale- α

TSH : tyrotropine

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

ZO-1 : zonula-occludens 1

β -LPH : β -lipotropine

À ma famille et mon mari pour
leur support moral, leur
encouragement et leur amour.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie ma directrice **Dr Maria Leiza Vitale** pour sa patience, sa disponibilité et sa générosité. Elle m'a donné l'opportunité de poursuivre mes études sous l'aile d'une directrice dévouée.

Je remercie aussi mon co-directeur **Dr Marc Pelletier** pour ses conseils et sa bonne humeur. Il a su m'aider à m'épanouir comme chercheuse.

Sans la collaboration de mes confrères, j'aurais été perdue. Je voudrais donc remercier l'équipe avec qui j'ai eu le bonheur de partager ces deux dernières années :

Sara Solinet ma coéquipière de laboratoire, pour son aide indispensable. Elle a su me guider et me conseiller. Nos multiples conversations et moments rigolos m'ont relevé le moral durant les jours de pluie.

Casimir Akpovi pour ses discussions philosophiques qui m'ont ouvert l'esprit à la beauté de la vie.

Li Chen pour son aide au laboratoire et les petites sucreries qui ont su calmer mon appétit.

Je voudrais aussi remercier ma famille : ma mère **Viviane Rouhault**, mon père **Pierre Meilleur**, ma belle-maman **Guylaine Labbé**, ainsi que mes beaux parents **Thomas et Thresilla Mousseau** pour leur soutien et leur amour, sans lesquelles je n'aurais su persévérer.

Finalement, je tiens à remercier de tout mon coeur mon mari **James Mousseau** pour son amour et son encouragement. Il est pour moi une lumière dans la noirceur sans qui je perdrais mon chemin.

1. INTRODUCTION

1.1. L'HYPOPHYSE, UNE GLANDE MAÎTRESSE

Il existe dans tous les organismes pluricellulaires un mécanisme permettant aux divers systèmes, organes, tissus et cellules une certaine communication. Sans cette communication, l'organisme ne pourrait se développer, se reproduire, ou même fonctionner normalement. Afin de satisfaire ce besoin, les organismes pluricellulaires ont développé le système endocrinien et le système nerveux. L'interaction de ces deux systèmes est coordonnée par l'hypothalamus, un centre de contrôle important du système nerveux autonome (1).

Chez tous les vertébrés, on retrouve l'hypophyse, une glande ne mesurant que 1,5cm de diamètre chez l'humain, associée à l'hypothalamus via des prolongements nerveux et des vaisseaux sanguins. L'hypophyse est située dans la selle turcique de l'os sphénoïde, une dépression de la base crânienne (schéma 1). Elle est souvent décrite comme étant la glande maîtresse puisqu'elle exerce un contrôle hormonal sur l'activité de plusieurs autres glandes endocriniennes comme, par exemple, la glande thyroïde (1, 2).

1.1.1. Anatomie et vascularisation

L'hypophyse peut être divisée en deux parties majeures : l'adénohypophyse et la neurohypophyse (schéma 2). L'adénohypophyse est la partie glandulaire de l'hypophyse. Elle est dérivée de l'ectoderme de la cavité orale primitive. L'adénohypophyse comprend trois parties : la pars distalis, la pars tuberalis et la pars intermedia. La pars distalis et la pars tuberalis forment l'hypophyse antérieure (HA). La pars intermedia provient d'une partie de la

poche de Rathke qui est attachée au neuroectoderme. Le rôle de l'adénohypophyse est de synthétiser et libérer diverses hormones et ce, en réponse aux signaux provenant de l'hypothalamus et de la circulation systémique. Les hormones produites par l'hypophyse sont des hormones trophiques, c'est-à-dire, des hormones qui régularisent l'activité d'autres glandes ou tissus (1, 2).

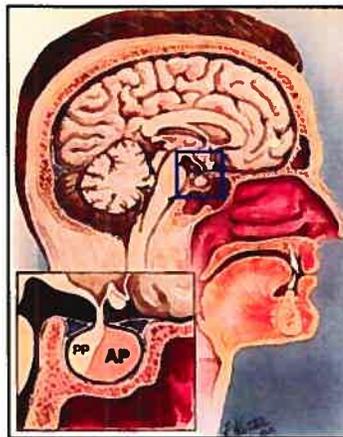


Schéma 1

Schéma 1. L'hypophyse humaine. L'hypophyse est située à la base de l'hypothalamus dans la selle turcique de l'os sphénoïde. (www.indiana.edu, modifié)

La pars nervosa fait partie de la neurohypophyse qui comprend aussi l'infundibulum (la tige qui attache l'hypophyse à l'hypothalamus) et l'éminence médiane (schéma 2). Le lobe postérieur comprend la pars nervosa. La pars nervosa se développe à partir du neuroectoderme du cerveau primitif. Plus spécifiquement, elle est dérivée du diencéphale. La pars nervosa possède des axones dont les corps cellulaires sont situés dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus (schéma 2). Les terminaisons des fibres nerveuses sont situées près des capillaires de la pars nervosa et leur portion

terminale contient généralement des granules de sécrétion nommés corps de Herring. Souvent associés aux processus axonaux, on retrouve les pituicytes, des cellules qui ressemblent aux astrocytes du système nerveux central.

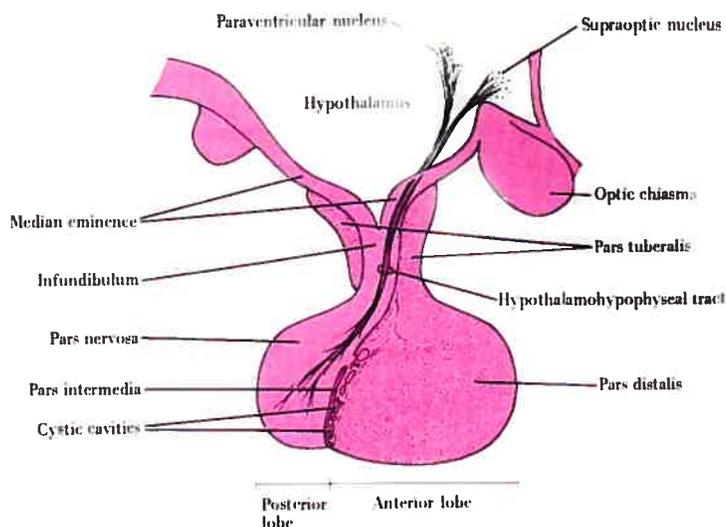


Schéma 2

Schéma 2. Anatomie de l'hypophyse. (Tiré de (1)).

Afin de lui permettre d'exercer son rôle dans le contrôle de divers autres tissus et glandes, l'hypophyse a un système de vascularisation complexe et développé (schéma 3). Tout d'abord, on y retrouve deux groupes principaux de vaisseaux : les artères hypophysaires supérieures et les artères hypophysaires inférieures. Les artères hypophysaires supérieures amènent un apport sanguin à l'émminence médiane et à l'adénohypophyse. Les artères hypophysaires inférieures amènent un apport sanguin à la neurohypophyse (1).

Les artères hypophysaires supérieures forment un réseau de vaisseaux capillaires dans l'émminence médiane et l'infundibulum. Par la suite, ces capillaires sont drainés par les vaisseaux porte qui descendent le long de

l'infundibulum (3) (schéma 3). Ces vaisseaux porte forment un deuxième réseau capillaire dans l'adénohypophyse. Ce réseau complexe de vaisseaux sanguins permet aux divers signaux d'être acheminés vers la pars distalis de l'adénohypophyse où se trouvent les cellules responsables de la sécrétion hormonale.

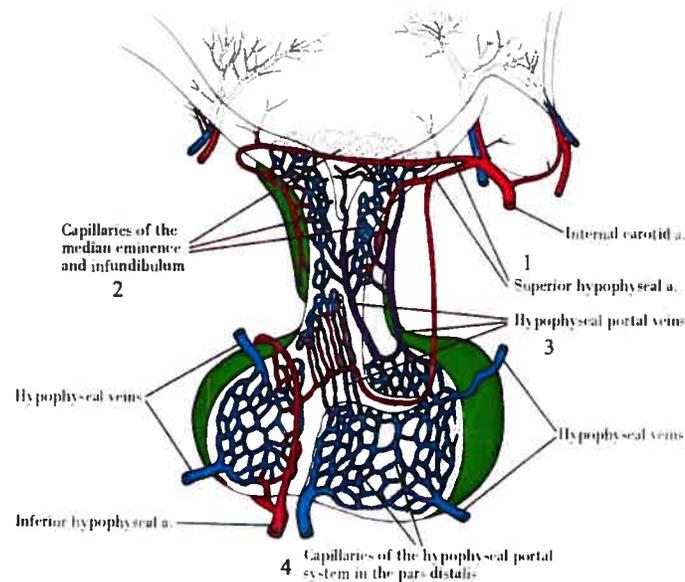


Schéma 3

Schéma 3. Vascularisation de l'hypophyse. Séquence de la circulation sanguine : 1- apport sanguin via les artères, 2- acheminement vers les capillaires de l'éminence médiane et de l'infundibulum, 3- drainage via les veines porte, 4- acheminement du sang vers la pars distalis via les capillaires. (Tiré de (1))

1.1.2. Influence de l'hypothalamus

Tel que mentionné dans la section 1.1.1., la neurohypophyse se développe à partir du neuroectoderme de la région du futur diencéphale. Un diverticule, l'infundibulum, apparaît dans le plancher du troisième ventricule et agrandit

ventralement en direction de la poche de Rathke. La partie distale de l'infundibulum se différencie pour donner la neurohypophyse. Des groupes de neurones de l'hypothalamus envoient des axones vers la *pars nervosa* et l'EM (4). Ces neurones hypothalamiques produisent et sécrètent diverses neurohormones qui sont transportées le long des axones et emmagasinées dans des vésicules de sécrétion des terminaisons nerveuses de l'EM et de la *pars nervosa*. Les neurohormones libérées dans l'EM passent dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire. Ces neurohormones, les hormones hypophysiotropes (*releasing factors*) et les facteurs inhibiteurs, modulent la sécrétion hormonale de l'adénohypophyse (4).

L'hypothalamus exerce ainsi un contrôle neurohumoral sur l'adénohypophyse via les facteurs stimulateurs ou inhibiteurs produits par les neurones hypothalamiques. Les hormones hypophysiotropes stimulent la synthèse et la sécrétion des hormones hypophysaires (4, 5). Les facteurs inhibiteurs ont des effets opposés. La synthèse et la libération des hormones hypophysiotropes et des facteurs inhibiteurs sont sous le contrôle rétroactif des hormones hypophysaires. De plus, étant donné que l'EM se retrouve en dehors de la barrière hémato-encéphalique, la sécrétion des hormones régulatrices hypothalamiques est sous l'influence de facteurs de la circulation systémique (4).

Les neurones qui synthétisent les hormones hypophysiotropes et les facteurs inhibiteurs sont localisés dans divers noyaux de l'hypothalamus (4). Généralement, chaque neurohormone est sécrétée par un type cellulaire spécifique et agit sur un type cellulaire déterminé dans l'adénohypophyse. Par exemple, l'hormone hypophysiotrope GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) est impliquée dans le contrôle hypothalamique des cellules gonadotrophiques qui

synthétisent et libèrent les hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) (5). La dopamine (DA) hypothalamique est sécrétée dans les capillaires de l'EM et transportée via la circulation porte jusqu'aux cellules lactotrophes où elle inhibe la synthèse et la libération de la prolactine (5). Par contre, certaines neurohormones agissent sur plus d'un type cellulaire de l'hypophyse. La somatostatine (SST), qui est produite dans la région antérieure de l'hypothalamus, agit sur les cellules somatotropes où elle inhibe la synthèse et la sécrétion de l'hormone de croissance (4, 5). Elle agit aussi sur les cellules lactotrophes pour inhiber la sécrétion de la prolactine (5).

1.1.3. Diversité cellulaire

L'hypophyse est composée de divers types de cellules endocrines qui synthétisent et libèrent différentes hormones. Les cellules somatotropes sont les plus abondantes dans l'adénohypophyse. Il s'agit de cellules de taille moyenne et de forme ovale qui synthétisent l'hormone de croissance (GH). Les lactotropes, aussi appelées cellules mammotropes, se situent dans le lobe antérieur près du lobe postérieur. On retrouve deux populations distinctes de lactotropes : une population de cellules de petite taille et de forme angulaire, une autre population dont les cellules sont de grande taille et de forme ovale. Elles produisent toutes la prolactine (PRL). Les cellules corticotropes sont des cellules de taille moyenne et de forme ovale produisant la corticotropine (ACTH), la β -lipotropine (β -LPH) et l'endorphine. Les cellules thyrotropes sont de taille moyenne et ont une forme angulaire avec des prolongements cytoplasmiques. Leur rôle est de produire la thyrotropine (TSH). Finalement, parsemées dans tout le lobe antérieur, se

trouvent les cellules gonadotropes qui produisent l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (3).

Les populations cellulaires décrites ci-dessus contiennent toutes des granules de sécrétion où sont emmagasinées les hormones. Il existe aussi un type de cellules particulier à l'hypophyse antérieure : les cellules folliculostellaires (FS). Il s'agit de cellules non-endocrines qui exercent tout de même un contrôle important sur la sécrétion hormonale.

1.2. LES CELLULES FS

Les cellules FS furent décrites pour la première fois par Rinehart et Farquhar il y a 50 ans (6, 7). Ce sont des cellules de forme étoilée qui, lorsque regroupées, forment des follicules, d'où le terme « folliculostellaire » (6, 7). Ces cellules possèdent un noyau central de forme ovoïde, plusieurs ribosomes libres (8), des lysosomes (9-11), un complexe de Golgi, peu de mitochondries (12) et plusieurs longs prolongements cytoplasmiques qui s'étendent entre les cellules endocrines (13). Ces prolongements permettent aux cellules FS d'entrer en contact entre-elles et avec les cellules endocrines. Les cellules FS ne constituent que 5 à 10% de la population cellulaire totale de l'hypophyse antérieure (HA) (3). On les retrouve généralement en groupements de 2 à 10 cellules (13). Contrairement à celles-ci, les cellules FS ne possèdent pas de granules de sécrétion. Les cellules FS produisent des molécules bioactives, entre autres, le bFGF (14), le VEGF (15) et l'IL-6 (16) pouvant moduler la réponse des cellules endocrines à divers stimuli. De plus, les cellules FS, dont l'origine reste encore nébuleuse, expriment un marqueur de cellule neuronale, la GFAP (17) et un marqueur de cellules du système immunitaire, la protéine S-100 (18).

Depuis leur découverte, plusieurs chercheurs ont tenté d'expliquer le rôle précis des cellules FS. Tout d'abord, ils ont suggéré que ces cellules seraient des cellules souches (19). Puis, il a été suggéré que les cellules FS pourraient être des cellules souches spécifiques à l'hypophyse (20), des cellules phagocytaires (21) ou des joueurs clefs dans le transport de Ca^{2+} (22). Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent fortement que les cellules FS jouent un rôle dans le contrôle de la réponse hormonale hypophysaire. Bien que ces cellules soient non-fonctionnelles du point de vue endocrinien, elles ont la capacité de

produire et de sécréter des molécules bioactives telles que le bEGF (14), le VEGF (15, 23), la follistatine (15), le LIF (24), le MIF (25) et l'IL-6 (16) qui, à leur tour, modulent la sécrétion hormonale. Par exemple, l'IL-6 stimule la sécrétion de PRL, GH et de LH (26). De plus, puisque les cellules FS sont le seul type cellulaire de l'HA pouvant produire le VEGF (27) et que le VEGF est un facteur d'angiogenèse et de perméabilité de vaisseaux sanguins (28), il est possible que les cellules FS soient impliquées dans la régulation de l'angiogenèse. Cette hypothèse est d'autant plus probable puisque les cellules FS se retrouvent souvent à proximité des vaisseaux sanguins de l'hypophyse (29).

1.2.1. Les cellules FS et la communication intercellulaire

L'hypophyse, étant la glande endocrine maîtresse chez les vertébrés, se doit d'être dotée d'un système de communication interne. En 2001, le groupe de Fauquier a démontré que le réseau de cellules FS de l'HA forme un circuit fonctionnel à travers lequel l'information peut être acheminée sur plusieurs millimètres (30). De plus, cette communication se ferait grâce aux jonctions lacunaires, ou jonctions communicantes (JC), et impliquerait les cellules FS (31). Cependant, il existe un grand débat concernant les JC dans l'HA : ces jonctions se retrouvent-elles uniquement entre les cellules FS, entre les cellules endocrines, ou peuvent-elles aussi exister entre ces deux types cellulaires? D'une part, plusieurs chercheurs ont démontré que les JC n'existent qu'entre les cellules FS (8, 31, 32). L'apparition des JC dans l'HA coïncide avec l'expression de la protéine S-100, indiquant le lien étroit entre les cellules FS et les JC (33). De plus, des expériences de double marquage avec des anticorps contre la Connexine43 (Cx43), une protéine des JC, et contre la S-100 ont démontré que pratiquement tous les sites

positifs pour la Cx43 étaient aussi positifs pour la S100. Donc, la Cx43 se retrouve dans les cellules FS (34).

D'autre part, il existe une communication fonctionnelle entre les cellules FS et les cellules endocrines puisque les cellules FS ont la capacité d'inhiber la production de PRL, GH et LH (35). Au début de la microscopie électronique, Fletcher et col. ont démontré que les JC dans l'hypophyse n'existent qu'entre les cellules munies de granules de sécrétion (36). Cependant, des expériences faites sur des cultures primaires de cellules hypophysaires de rats démontrent que les JC existent non seulement entre les FS, mais aussi entre les cellules FS et les cellules endocrines (37). Chose certaine, le réseau de JC favorise la communication intercellulaire et donc la synchronisation d'activité à travers de l'HA, permettant ainsi le contrôle des cellules endocrines par les cellules FS, et vice-versa (37, 38).

1.3. LES JONCTIONS COMMUNICANTES

Au microscope électronique, les JC représentent un rapprochement très étroit (2nm) entre deux cellules adjacentes (8, 39). Ce sont des jonctions très fréquentes chez les organismes pluricellulaires. Leur structure est très particulière : les jonctions communicantes sont formées d'une plaque de petits canaux (schéma 4). Les études de cryo-fracture ont montré que chaque plaque est formée de 100 à plus de 1000 canaux (40-42). Chaque canal est composé de deux hémi-canaux (HC) qu'on nomme connexon (Cxon). On retrouve un connexon dans la membrane plasmique de chacune des cellules apposées. Les connexons de cellules apposées se joignent dans l'espace extracellulaire qui sépare les cellules voisines. Bien que les hémi-canaux soient scellés ensemble, un espace reste toujours entre les membranes plasmiques des cellules, d'où le nom anglais «gap junction». Chaque hémi-canal, ou connexon, est composé de 6 protéines transmembranaires nommées connexines (43-48) (schéma 4). L'assemblage des connexons en canaux entraîne la formation de pores hydrophiles à travers les membranes plasmiques de cellules adjacentes, permettant ainsi l'échange de petites molécules (49).

Les cellules connectées via des jonctions communicantes dépendent l'une de l'autre pour l'échange de petites molécules cytoplasmiques. Ces jonctions permettent donc la communication intercellulaire directe en permettant le passage de molécules de petite taille (< 1 kDA) tels que les métabolites, les molécules régulatrices (ATP, NAD, IP₃, cAMP,...) et les ions inorganiques (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, ...) (37, 50-53). Les jonctions communicantes peuvent être fermées de façon réversible en réponse à des signaux intracellulaires (54) ou à un changement de voltage (52). L'étude des jonctions communicantes est importante puisque ces

canaux jouent un rôle important dans le développement embryonnaire, le contrôle de la croissance et la fonction des tissus (55).

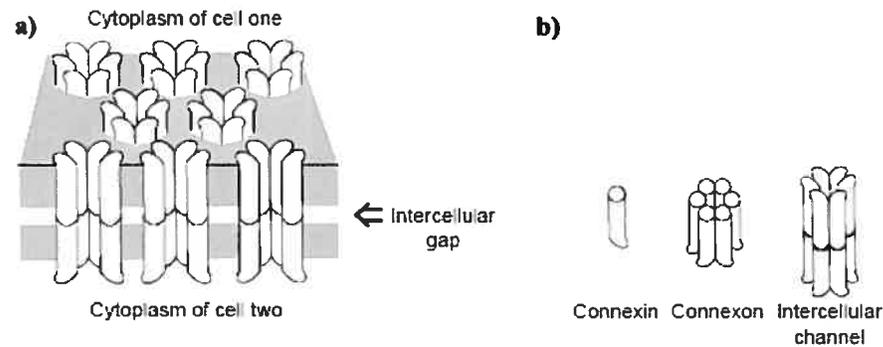


Schéma 4

Schéma 4. Représentation de jonctions communicantes. a) Plaquette jonctionnelle contenant plusieurs canaux. b) Décomposition d'un canal. (Modifié de (56)).

1.3.1. Synthèse et dégradation des jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont des structures très dynamiques. Des nouveaux canaux sont continuellement ajoutés aux extrémités de la plaque jonctionnelle et les vieux canaux sont retirés du centre de la plaque (57, 58). L'acheminement d'un nouveau canal à la jonction communicante se fait en 10 à 20 minutes, et l'assemblage d'une jonction de $1 \mu\text{m}^2$ contenant 10000 canaux peut se faire en aussi peu de temps que 2 heures (58). Bien que certaines étapes de l'assemblage et de la dégradation de ces jonctions soient élucidées, ces mécanismes demeurent, en grande partie, peu caractérisés.

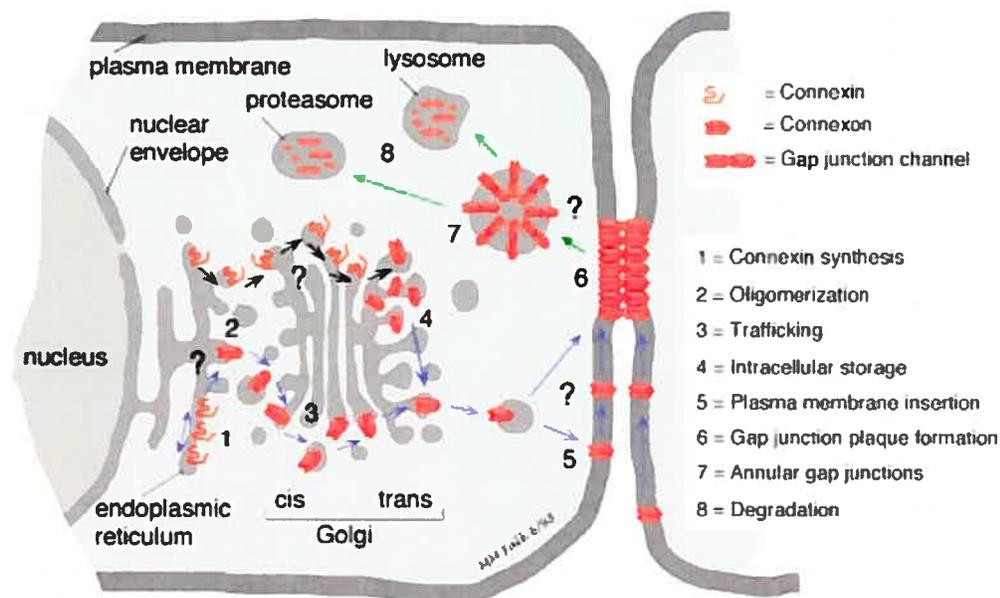


Schéma 5.

Schéma 5. Étapes de la synthèse et dégradation des JC (Tiré de (59)).

Tout débute par la synthèse de la Cx, qui est effectuée par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) rugueux (schéma 5, étape 1) (60, 61). Le polypeptide final atteint sa conformation fonctionnelle durant son intégration dans la membrane du RE. Aucun chaperon ne semble impliqué dans le repliement de la Cx (62). Les connexines sont oligomérisées dans le RE, donnant ainsi naissance aux connexons (47, 63) (schéma 5, étape 2). Il semble aussi possible que les connexons soient assemblés dans le trans-Golgi (43) et que le site d'assemblage dépende de l'isoforme de Cx (64). L'appareil de Golgi joue un rôle critique dans la synthèse des JC puisque sa perturbation peut empêcher le transport de la Cx43, son assemblage en connexons et son transport à la membrane plasmique (65-67). En effet, plusieurs équipes ont démontré que le transport de la Cx requiert des phénomènes de bourgeonnements et de fusions successifs du RE et de l'appareil de Golgi (60, 67-72) (schéma 5, étape 3). La

Cx43 peut être retenue dans l'appareil de Golgi sous forme de connexons, créant ainsi une réserve (43, 66, 67) (schéma 5, étape 4). Les mécanismes du transport et de l'insertion des connexons à la membrane plasmique (schéma 5, étape 5) restent encore à être élucidés. L'hypothèse courante est que les connexons s'insèrent dans la membrane plasmique à un endroit autre que la plaque jonctionnelle et qu'ils atteignent la jonction communicante par des mouvements latéraux (59, 73, 74) (schéma 5, étape 6).

Les Cx et par conséquent les JC, ont un turnover très élevée. Dans les tissus et les cultures cellulaires, la Cx43 a une demi-vie de 1,5 à 5 heures et ce même après son insertion dans la JC (75, 76). Puisque les canaux des JC ne peuvent pas être séparés en héli-canaux dans des conditions physiologiques (77, 78), ils sont internalisés sous forme de "jonctions annulaires" par des vésicules membranaires (79-81) (schéma 5, étape 7). L'internalisation des JC pourrait impliquer des vésicules de clathrine (79), des phagolysosomes (82) et des complexes multivésiculaires (81). La dégradation complète des JC implique les voies lysosomales et protéasomales (70, 82-86). Ces voies pourraient agir de façon parallèle, alternative ou séquentielle (87) (schéma 5, étape 8). La microscopie électronique a démontré que la dégradation des jonctions annulaires est assurée, dans certains types cellulaires, par les lysosomes (79). Les lysosomes pourraient donc représenter l'étape finale de la dégradation des JC (88).

Les protéasomes, quant à eux, semblent impliqués dans la régulation de l'internalisation des JC via la dégradation de la Cx43 (88). En général, la dégradation de protéines intégrales de la membrane plasmique et de protéines ayant un turnover rapide implique les protéasomes. L'inhibition des protéasomes induit l'accumulation et le prolongement de la demi-vie de la Cx43, indiquant

l'implication de la voie ubiquitine-protéasome dans la dégradation de la Cx43 (84). Spécifiquement, la Cx43 phosphorylée intégrée dans les JC est dégradée par les protéasomes (88).

1.3.2. Les connexons

Tel que mentionné dans la section 1.3., les canaux des JC sont composés de deux héli-canaux nommés connexons. On retrouve un connexon dans la membrane plasmique de chacune des cellules adjacentes et leur ancrage donne naissance à un canal de communication intercellulaire (schéma 4B). Les connexons sont formés de 6 protéines transmembranaires, les connexines (Cx) (section 1.3.3.). Puisque la majorité des cellules expriment diverses Cx, il est possible que ces protéines s'assemblent en homo- ou hétéro-oligomères (63, 89). De plus, l'agencement des Cx pourrait amener la formation de canaux homotypiques (la Cx d'un HC s'ancre à la même Cx de l'autre HC) ou hétérotypiques (l'ancrage des HC se fait entre différentes Cx) (schéma 6). Cependant, la formation de Cxons hétéromériques n'est pas aléatoire. Elle dépend du contexte d'expression des Cx, de leur localisation dans la cellule, et de leurs voies de ciblage (64). De plus, seules les Cx semblables appartenant au même sous-groupe (section 1.3.3. et tableau 1) peuvent s'assembler en Cxons (59, 90, 91). Toutefois, il n'est pas encore connu si toutes les Cx du même sous-groupe peuvent s'assembler entre-elles.

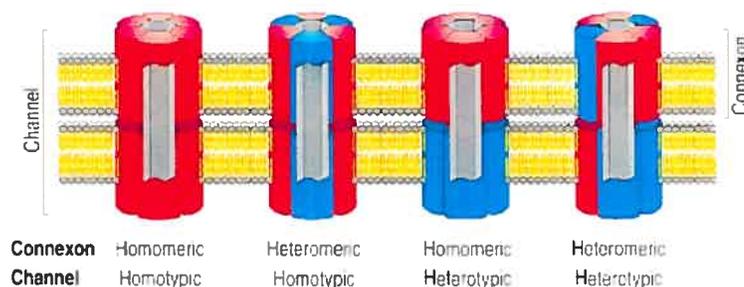


Schéma 6

Schéma 6. Assemblage de Cxons. Les Cxons homomériques sont constitués de la même Cx. Les Cxons hétéromériques sont constitués d'un mélange de différentes Cx de la même sous-famille. Les canaux homotypiques se forment par l'ancrage de la même Cx de chaque Cxon tandis que les canaux hétérotypiques se forment grâce à l'ancrage de Cx différentes. (Tiré de (92)).

Sous- Groupe	Nomenclature: lettre Grecque	Nomenclature: poids moléculaire	Exemple de site d'expression
α	$\alpha 1$	Cx43	Coeur
α	$\alpha 2$	Cx38	Embryon
α	$\alpha 3$	Cx46	Oeil
α	$\alpha 4$	Cx37	Poumon
α	$\alpha 5$	Cx40	Poumon
α	$\alpha 6$	Cx45	Coeur
α	$\alpha 7$	Cx33	Testicule
α	$\alpha 8$	Cx50	Oeil
α	$\alpha 9$	Cx60	Ovaire
α	$\alpha 10$	Cx46.6	Cochlée
β	$\beta 1$	Cx32	Foie
β	$\beta 2$	Cx26	Foie
β	$\beta 3$	Cx31	Peau
β	$\beta 4$	Cx31.1	Peau
β	$\beta 5$	Cx30.3	Peau
β	$\beta 6$	Cx30.4	Peau

Tableau 1 : Famille de la Cx.

Les Cxons existent aussi sous forme "libres" comme entités fonctionnelles indépendantes de la JC (73). On nomme ces Cxons libres « héli-canaux » (HC). L'expression des Cx et l'assemblage des HC confèrent à la cellule une

perméabilité semblable à celle de la JG (73, 93). Dans ce contexte, les HC servent de moyen de communication entre les milieux intra et extracellulaire et pourraient jouer divers rôles : régulation du volume cellulaire (74), inhibition des canaux de calcium (94), libération du glutamate (94), et contrôle de la survie cellulaire (95).

Tout comme pour les JC, la perméabilité des HC est sensible à plusieurs signaux. Entre autres, les HC sont contrôlés par la concentration de Ca^{2+} extracellulaire, l'état métabolique de la cellule, le potentiel membranaire, l'acidité intracellulaire et le type de Cx qui forme l'HC (74, 95-98). Cette panoplie de stimuli et d'effets sur les HC démontre leur rôle important. Les changements de taux des HC seraient impliqués dans le cancer et les troubles cardiaques (92). De plus, l'ouverture prolongée des HC contribue à la mort cellulaire (99, 100).

1.3.3. Les connexines

La famille des Cx comporte une vingtaine de protéines ayant un poids moléculaire entre 25 et 60 kDa. Ces protéines sont exprimées de façon différentielle dans différents tissus. La nomenclature la plus répandue pour les Cx est basée sur leur poids moléculaire en kDa (ex : Cx43, une Cx de 43 kDa). Puisque les Cx peuvent être regroupées en sous-groupes selon la ressemblance de leur séquence d'acides aminés, une nomenclature plus complète de ces protéines inclut leur sous-groupe. Une nomenclature complète inclut : l'animal dans lequel on retrouve la protéine, les lettres « Cx » pour connexine, le poids moléculaire de la protéine, son sous-groupe, les lettres « Gj » (pour « gap junction ») et l'ordre chronologique de la découverte de la Cx (101). Par exemple, mCx43Gj α 1 indique que la protéine dont on parle se retrouve chez la souris, son poids

moléculaire est de 43k Da, et elle a été la première Cx du groupe α à être découverte.

Contrairement à plusieurs autres protéines membranaires, les Cx sont des protéines très dynamiques. En culture cellulaire, ces protéines ont une demi-vie de seulement 1 à 3h (102, 103). Les Cx sont des protéines non-glycosylées ayant 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extra-cellulaires, 1 boucle intra-cellulaire et des domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques (104) (schéma 7). Les différences entre les Cx proviennent des variations dans la boucle intra-cellulaire et dans le domaine C-terminal (105).

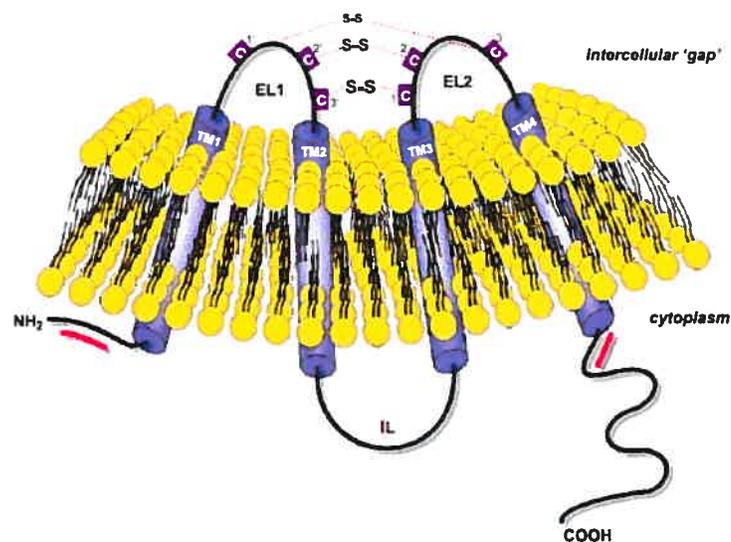


Schéma 7

Schéma 7. Structure des Cx. 4 domaines transmembranaires (TM), 2 boucles extra-cellulaires (EL) contenant des ponts disulfure, 1 boucle intra-cellulaire (IL), domaines N-terminal (NH₂) et C-terminal (COOH) intracellulaires (106).

L'importance des divers domaines de la protéine est démontrée par le fait qu'ils sont très conservés. Les domaines transmembranaires servent d'ancrage

dans la membrane plasmique. Le domaine transmembranaire TMI détermine comment la Cx est ciblée à la JC et son insertion à la membrane plasmique (107). Les deux boucles extracellulaires sont très conservées. Dans chacune des boucles se trouvent 3 résidus cystéine qui lient les boucles par des ponts disulfure. Ceci permet le repliement de la protéine et stabilise les boucles lors de l'ancrage des Cxons (65, 108). Le domaine N-terminal sert de signal de sélectivité et il est responsable de la régulation de l'assemblage de Cxons hétéromériques (47). Le domaine C-terminal est un signal d'assemblage : il est requis pour la reconnaissance des sous-unités (47).

Sous certaines conditions expérimentales, la présence de la Cx et des JC est associée à une activité apoptotique des cellules (109). *In vivo*, il est possible que la croissance cellulaire soit contrôlée par des petites molécules pour lesquelles les JC sont perméables (110). Plusieurs maladies sont issues de mutations dans les gènes codant pour les Cx dont la maladie de Charcot-Marie Tooth, la surdité neuro-sensorielle, des anomalies de la peau, et les cataractes (68, 111-113). De plus, les gènes des Cx sont des suppresseurs de tumeur de classe II. Leur déficience augmente la susceptibilité à la carcinogenèse spontanée et induite chimiquement (114, 115).

1.3.4. La connexine43

La Cx43 est la Cx la plus répandue. On la retrouve dans pratiquement tous les organes incluant le cœur, l'œil, le cerveau et l'hypophyse antérieure (116, 117). La présence de cette Cx est nécessaire dans plusieurs phénomènes physiologiques. Entre autres, la Cx43 joue un rôle critique dans l'embryogenèse. Une anomalie dans l'expression de la protéine entraîne des malformations

cardiaques et des anomalies dans la migration des cellules de la crête neurale (118). Il est aussi possible que la Cx43 et les JC formées par la Cx43 jouent un rôle dans la réponse immunitaire puisque les cellules NK (« natural killer ») et les lymphocytes T et B expriment en abondance la Cx43. Son rôle dans la réponse immunitaire n'est pas encore clair, mais certains chercheurs spéculent que la Cx43 est impliquée dans la régulation de l'activation et le recrutement des lymphocytes (119, 120). La Cx43 pourrait aussi jouer un rôle indépendant de la JC. Dans certains types cellulaires, la Cx43 peut inhiber la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Le contrôle sur la croissance cellulaire exercé par la Cx43 semble médié par son domaine C-terminal (121, 122).

Dans la cellule, la Cx43 a la capacité de se lier à diverses autres protéines. Par exemple, la Cx43 peut interagir avec la tubuline lors de son transport à la membrane cellulaire (66), avec l'actine via la débrine afin de garder la Cx43 à la JC (123), avec les radeaux lipidiques et la cavéoline lors de la dégradation (124) et avec la protéine ZO-1 qui semble être impliquée dans le turnover et le remodelage des JG (125).

Les HC formés par la Cx43 ont des propriétés de « gating » semblables à celles des JC formées par la Cx43. Par contre, ces HC ont une probabilité d'ouverture moindre que celle des jonctions (97). L'ouverture des HC à base de Cx43 est généralement induite par des conditions de stress et semble accélérer la mort cellulaire (93). Dans plusieurs lignées cellulaires issues de mammifères, l'ouverture des HC à base de Cx43 est bloquée par des activateurs de PKC, une protéine kinase qui phosphoryle le domaine C-terminal de la Cx43 (73, 126, 127).

1.3.5. Phosphorylation de la Connexine43

La Cx43 est phosphorylée de façon traductionnelle. Ceci donne naissance à au moins 2 espèces ayant souvent une migration retardée dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) lorsque comparées à la forme non-phosphorylée (NP) qui migre plus rapidement (71, 75, 102). L'état de phosphorylation de la Cx43 est étroitement lié à la communication cellulaire. Cependant, la phosphorylation de la Cx43 ne semble pas être requise pour la formation de Cxons fonctionnels (128, 129). La phosphorylation de la Cx43 jouerait plutôt un rôle dans le taux d'assemblage et le turnover des Cxons (71, 130). Spécifiquement, l'état de phosphorylation de la Cx43 influence son cheminement à la membrane plasmique, son assemblage en structures jonctionnelles, sa dégradation et le comportement unitaire des Cxons (130-132).

Lors de sa sortie de l'appareil de Golgi, la Cx43 est déjà phosphorylée (67, 133). La phosphorylation de la Cx43 peut aussi se produire dans d'autres compartiments intracellulaires (67). Cependant, afin d'avoir un effet sur la communication intercellulaire, la phosphorylation de la Cx43 doit avoir lieu à la membrane plasmique (67, 75). La majorité des sites phosphorylables sont des résidus sérine (Ser) (67, 75, 134). Il semblerait qu'une phosphorylation minimale de ces résidus soit nécessaire à la communication intercellulaire médiée par les jonctions communicantes (CIJC) puisque les cellules qui ne peuvent pas former de JC n'ont pas la capacité de phosphoryler la Cx43 (75). Par contre, plusieurs auteurs ont démontré que la phosphorylation de la Cx43 entraîne une diminution de la CIJC, qui est rétablie par la déphosphorylation de la protéine. Les effets d'un changement dans l'état de phosphorylation de la Cx43 semblent dépendre du type de cellules étudiées et des conditions expérimentales.

In vivo, la Cx43 peut être phosphorylée sur plusieurs résidus dont au moins 21 sérines (schéma 8). Jusqu'à présent, on connaît au moins 5 protéines kinases (PK) capables de phosphoryler la Cx43 (127). La phosphorylation de la Cx43 est un système de contrôle de la CIJC très complexe qui dépend du type cellulaire, des conditions expérimentales, des PK et des sites de phosphorylation impliqués.

Parmi les PK capables de phosphoryler la Cx43, on retrouve la MAPK, la PKA et la PKC. La MAPK phosphoryle la Cx43 de façon directe sur trois résidus (Ser255, Ser279, et Ser282) (135, 136). Lors de son activation via l'EGF, la MAPK peut phosphoryler la Cx43 et causer une diminution de la CIJC (137).

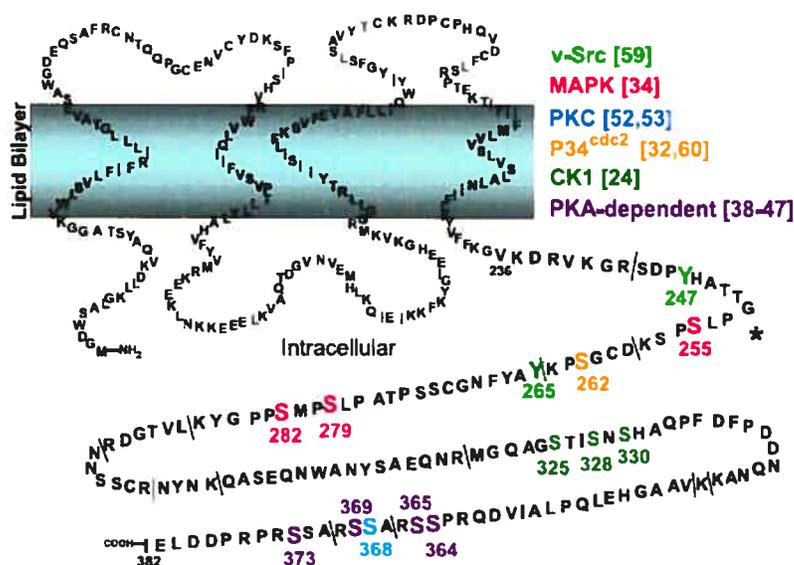


Schéma 8

Schéma 8. Sites de phosphorylation de la Cx43. Les PK sont indiquées dans le côté droit supérieur et codées par couleur avec les résidus qu'elles phosphorylent. (138).

La PKA est composée d'un domaine catalytique C et de deux sous-unités régulatrices R. Les sous-unités R gardent le domaine C inactif jusqu'à ce qu'elles lient l'AMP cyclique (AMPc). De plus, les sous-unités R permettent le ciblage de

la PKA vers son substrat ou vers un pool d'AMPC (139, 140). L'activation de la PKA via l'AMPC entraîne une augmentation de la phosphorylation de la Cx43 en Ser364 et une augmentation de la CIJC via l'acheminement des Cxons à la membrane plasmique (54, 141). La PKA pourrait aussi participer au maintien de la perméabilité basale des JC formées de Cx43 (142).

La famille de la PKC comprend 12 isoformes classées en 3 sous-familles selon leur sensibilité : au Ca²⁺ et au diacyl glycérol (DAG), au Ca²⁺ seulement ou à ni un ni l'autre (revue dans (143)). Chaque isoforme a des substrats particuliers et leur activité est généralement localisée à la membrane plasmique, dans les endosomes, dans l'appareil de Golgi ou dans le noyau cellulaire (revue dans (143)). La PKC phosphoryle directement la Cx43 en Ser368. Généralement, la phosphorylation du résidu Ser368 par la PKC mène à une diminution significative de la CIJC (132, 144, 145). Par contre, dans certains types cellulaires, la phosphorylation de la Cx43 par la PKC cause une augmentation ou aucun changement de la CIJC (146-148). La PKC pourrait même être impliquée dans le maintien de la perméabilité basale des JG (149). L'effet de la phosphorylation de la Cx43 médiée par la PKC sur la CIJC est donc dépendant du type cellulaire étudié (132) et des isoformes de PKC impliqués.

Puisque la Cx43 est une phosphoprotéine, il doit exister un mécanisme permettant sa déphosphorylation. En effet, la Cx43 est le substrat de plusieurs protéines phosphatases (PP) dont la PP1, la PP2A et la PP2B. Dans la cellule, l'unité catalytique de la PP1 se retrouve liée à diverses protéines régulatrices, permettant son ciblage ou la modulation de son activité envers différents substrats (revue dans (150) et (151)). La PP1 peut déphosphoryler la Cx43 possiblement via une interaction directe (152). Dans la cellule, l'inhibiteur-1 inhibe la PP1.

L'inhibiteur-1 est activé (phosphorylé) par la PKA et déphosphorylé par la PP2A et la PP2B (153).

Généralement, on retrouve la PP2A sous forme d'hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique, d'une protéine d'assemblage et d'une sous-unité régulatrice (154). La sous-unité régulatrice permet le ciblage de la PP2A à divers domaines cellulaires qui sont souvent les mêmes que pour la PP1 (154, 155). Tout comme la PP1, la PP2A peut déphosphoryler la Cx43. Cette interaction peut être directe, mais pourrait aussi se faire grâce à la formation d'un complexe PP1-PP2A avec la Cx43 (152). Il est aussi possible que l'effet de la PP2A sur la Cx43 soit dû à l'inhibition des voies de signalisation impliquant la MAPK (156) ou par la déphosphorylation et donc l'inactivation de la PKC (157, 158).

La PP2B, ou calcineurine, se compose de 3 sous-unités : la sous-unité catalytique, la sous-unité régulatrice et la calmoduline (159). Cette PP dépend du Ca^{2+} pour son activation et peut en revanche contrôler la relâche de Ca^{2+} par les cellules grâce à son interaction avec le récepteur d' IP_3 (159, 160). Bien que la PP2B semble pouvoir déphosphoryler la Cx43 (145), il n'est pas connu si cette PP interagit directement avec la Cx43 ou non. Cependant, certains chercheurs ont trouvé que la PP2B pourrait interagir avec la PKA et la PKC (161, 162).

1.4. LES CYTOKINES

Bien que les JC constituent un important moyen de communication intercellulaire, les cellules peuvent communiquer de plusieurs autres manières. Elles peuvent libérer ou capter des molécules de signalisation, comme les cytokines. Les cytokines sont de petites molécules de communication jouant un rôle important dans l'homéostasie et dans la communication intercellulaire. Ces molécules sont produites en réponse à divers signaux captés à la surface cellulaire. Dans le cas qui nous intéresse, les cytokines agissent sur l'hypophyse au niveau du contrôle de diverses fonctions endocrines (163). Plusieurs cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α sont exprimées dans l'hypophyse (164) ou elles peuvent y être acheminées via le système sanguin suite à une production distante (165).

1.4.1. L'interféron- γ

L'IFN- γ a été découvert il y a 40 ans dans les surnageants de préparations de lymphocytes (166). Il s'agit d'une cytokine de la famille des IFN de type II ou immunitaire. En effet, l'IFN- γ est connu pour son activité antivirale et immunomodulatrice (167). L'IFN- γ est produit par les cellules T et NK et il est biologiquement actif sous sa forme hétérodimérique (168).

Cette cytokine joue un rôle dans la réponse immunitaire, inflammatoire, antivirale et apoptotique (revue dans (169)). Son rôle le plus important est l'activation de phagocytes mononucléaires, permettant ainsi la production d'autres cytokines comme l'IL et le TNF (167). Les récepteurs de l'IFN- γ sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules possédant un noyau. L'étude de cette interaction a mené à la découverte de la voie de signalisation JAK-STAT utilisée

par plusieurs autres cytokines (170, 171). Suite à la liaison de l'IFN- γ à son récepteur, la protéine JAK est phosphorylée et activée, ce qui mène à la phosphorylation et l'activation de STAT1 α . STAT1 α se transloque au noyau sous forme d'homodimère menant ainsi à la transcription de gènes en réponse à la stimulation à l'IFN- γ (172, 173) (schéma 9).

L'IFN- γ semble affecter les cellules hypophysaires. Le groupe de Vankelecom a démontré qu'un traitement de cellules hypophysaires avec l'IFN- γ induit une diminution des taux de sécrétion d'ACTH, de GH et de PRL (174). Ce phénomène est observé seulement lorsque les cellules FS sont présentes (174). Ceci indique que l'IFN- γ pourrait possiblement agir au niveau de la communication intercellulaire entre les cellules FS ou entre les cellules FS et les cellules endocrines. Dans plusieurs autres types cellulaires, l'IFN- γ peut modifier la CIJC et même les niveaux de Cx43. Bien que certaines études démontrent un effet négatif de la cytokine sur la communication intercellulaire et le taux de Cx43 (175), d'autres études démontrent un effet positif sur la communication intercellulaire ainsi qu'une augmentation du taux de Cx43 (176). Il semble donc que l'effet de l'IFN- γ sur la CIJC et sur le taux de Cx43 présente dans la cellule pourrait dépendre du type cellulaire et du temps d'incubation avec la cytokine.

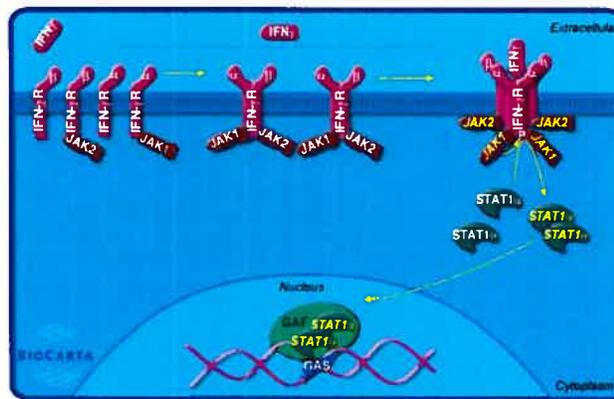


Schéma 9

Schéma 9. Voie de signalisation JAK-STAT lors d'une stimulation avec l'IFN- γ (<http://www.biocarta.com>).

1.4.2. L'interleukine-1 β

En 1960, le groupe d'Atkins décrit un « facteur activateur de lymphocytes » impliqué dans la fièvre (177). Il s'agissait de l'IL-1 β . L'IL-1 β est une cytokine proinflammatoire pouvant exercer des effets biologiques sur pratiquement toutes les cellules du corps. De plus, elle peut inhiber l'expression de ses propres récepteurs (revue dans (178)). L'IL-1 β est une cytokine particulière. Contrairement aux autres cytokines, sa séquence d'acides aminés ne contient pas de séquence de signalisation. Il en découle que son mécanisme de sécrétion n'est pas encore bien compris. De plus, les cellules sont capables de synthétiser un antagoniste de l'IL-1 β , nommé IL-Ra, qui a pour rôle de se lier au récepteur et d'inhiber la signalisation en empêchant l'IL-1 β de s'y lier (revue dans (179)).

Plusieurs types de cellules peuvent produire et sécréter l'IL-1 β . Parmi ces cellules, les macrophages, les monocytes, les fibroblastes, les cellules T et les cellules B produisent l'IL-1 β suite à une exposition à des facteurs microbiens, à

diverses cytokines ou à d'autres stimuli (revue dans (180)). Cette cytokine joue un rôle clef dans plusieurs maladies dégénératives comme la sclérose en plaque (181), la maladie d'Alzheimer (182) et le SIDA (183). De plus, l'IL-1 β a la capacité d'induire sa propre production et celle du TNF- α . En revanche, le TNF- α peut induire la production d'IL-1 β . Il existe aussi une redondance d'effets biologiques entre ces deux cytokines (revue dans (179)).

Outre sa fonction dans l'inflammation et la réponse immunitaire, l'IL-1 β exerce aussi des effets neurologiques, métaboliques et endocriniens. Elle peut aussi moduler la production d'hormones et de divers peptides hypophysaires (184) grâce à un effet direct sur l'hypophyse (185, 186). Encore une fois, cet effet sur la glande hypophyse est médié par les cellules FS. L'IL-1 β module la production de follistatine et d'IL-6 par les cellules FS, ce qui entraînerait une modification de la sécrétion d'ACTH et de FSH dans l'hypophyse (165, 187).

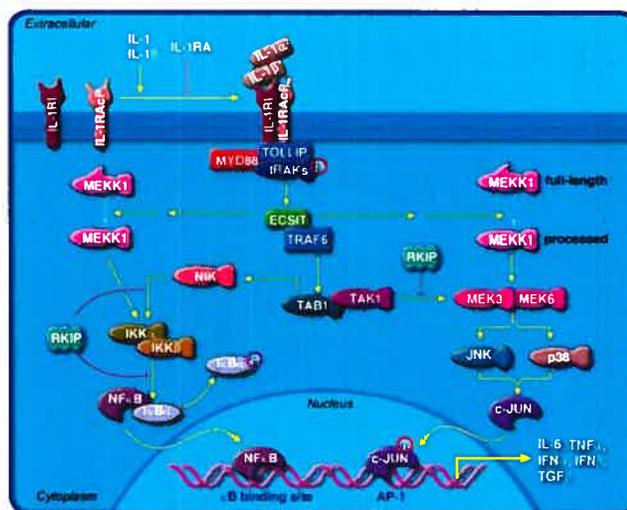


Schéma 10

Schéma 10. Voies de signalisation induites par l'IL-1 β

(<http://www.biocarta.com>)

Dans plusieurs types cellulaires, un traitement d'IL-1 β à long terme peut causer une diminution de la protéine Cx43 ainsi qu'une perte quasi-totale de la CIJC (188, 189). Cependant, nous avons trouvé que dans les cellules TtT/GF, une lignée cellulaire semblable aux cellules FS, une exposition d'une heure à l'IL-1 β induit une phosphorylation de la Cx43, une augmentation de son turnover et une augmentation de la communication intercellulaire (190).

1.4.3. Le facteur de nécrose tumorale- α

À l'origine, le TNF- α était défini comme étant un agent de nécrose tumorale *in vitro*, d'où son nom « Tumor Necrosis Factor » (191). Mais les chercheurs ont vite découvert qu'il s'agit d'une cytokine pléiotrope puisqu'elle a non seulement plusieurs cibles différentes mais elle exerce aussi une panoplie d'effets (revue dans (192)) (schéma 11). Le TNF- α peut être vu comme une cytokine proinflammatoire maîtresse puisqu'il s'agit de la première cytokine à se retrouver dans la circulation sanguine suite à une réponse inflammatoire (193).

Le TNF- α a plusieurs effets directs sur l'hypophyse, entre autres, la modulation de la production d'ACTH, de PRL, de GH et de TSH (165). Les récepteurs de TNF- α sont détectables dans l'HA et, fait très peu surprenant, les cellules FS sont très sensibles à cette cytokine (165, 194). Tout comme l'IL-1 β , le TNF- α peut induire la production d'IL-6 dans les cellules FS (194).



Schéma 11

Schéma 11. Voies de signalisation induites par le TNF- α

(<http://www.biocarta.com>)

Suite à des incubations à long terme (12 heures et plus), le TNF- α cause une diminution marquée de la CIJC dans plusieurs cellules (195, 196). Certains auteurs décrivent aussi une perte de la forme phosphorylée en Ser368 de la Cx43 (196), une diminution du taux de la protéine totale (197) et une translocation de la Cx43 vers le noyau périnucléaire (198). Cependant, l'effet semble dépendre du temps d'incubation, du type de cellules, et de la concentration de TNF- α utilisée.

1.5. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les cellules FS de l'HA sont des cellules sensibles à diverses molécules. Elles ont la capacité de moduler la sécrétion hormonale dans l'HA suite à une stimulation par des hormones et des cytokines. De plus, elles ont la capacité de communiquer entre elles et avec les cellules endocrines grâce à leur JC.

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que les cellules de la lignée TtT/GF, qui sont des cellules semblables aux cellules FS (199), sont sensibles au TNF- α et à l'IL-1 β (190). Après un traitement de plusieurs heures, ces cytokines induisent une augmentation du turnover de la Cx43 (190). Ce même traitement induit une augmentation de la communication cellulaire (190). Puisque les cytokines ont différents effets selon le temps d'exposition des cellules, l'objectif de ce projet est de voir si des traitements à court terme avec les cytokines pro-inflammatoires pourraient induire des modifications dans la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF. De plus, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans ce phénomène.

Généralement, les traitements de courte durée n'ont pas d'impact sur la synthèse et la dégradation des protéines. Nous nous sommes donc penchés sur l'état de phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43 suite à une exposition à court terme des cellules TtT/GF aux cytokines proinflammatoires. De plus, nous avons étudié l'effet de ces cytokines sur la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF. Afin de différencier entre la forme phosphorylée de la Cx43 en Ser368 (PCx43), la forme non-phosphorylée (NPCx43) et la forme totale (Cx43), nous avons utilisé des anticorps spécifiques reconnaissant la PCx43, la NPCx43 ou la Cx43 totale. Nous avons utilisé ces anticorps dans des expériences d'immunobuvardage et de microscopie à fluorescence, nous permettant ainsi de

voir la quantité de protéine présente et sa localisation dans la cellule suite à des traitements avec les cytokines. La communication intercellulaire était mesurée par la méthode de scrape-and-load. De plus, puisque nous sommes intéressés à la voie de signalisation impliquée dans la réponse aux cytokines, nous avons aussi traité les cellules avec des inhibiteurs ou activateurs de PKA, PKC et MAPK, ainsi qu'avec des inhibiteurs de PP1A, PP2A et PP2B seuls ou avec les cytokines. Finalement, nous avons utilisé la microscopie confocale afin de voir s'il y avait une interaction entre la Cx43 et la PP2A ou la PKC.

Nos résultats démontrent que l'IFN- γ induit une perte rapide et transitoire de la CIJC indépendante de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368. Cependant, l'IL-1 β et le TNF- α peuvent moduler l'état de phosphorylation de la Cx43. Des traitements à court terme avec ces cytokines entraînent une perte rapide et transitoire de la CIJC. Ceci serait dû en partie à une déphosphorylation de la Cx43. Nos résultats indiquent que la PKC et la PP2A pourraient être impliquées dans ces phénomènes.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. ANTICORPS

Anticorps	Animal	Fournisseur	Adresse
Anti-Connexine 43 (Cx43)	Lapin	Sigma	MO, États-Unis
Anti-Cx43 Phosphorylée (Ser368) (PCx43)	Lapin	Chemicon	ON, Canada
Anti-Cx43 non-phosphorylée (Ser368) (NPCx43)	Souris	Zymed	CA, États-Unis
Anti-Actine	Lapin	Sigma	MO, États-Unis
Anti-PP2A	Souris	BD Bioscience	ON, Canada
Anti-PKC- α	Souris	BD Bioscience	ON, Canada

Tableau 2. Anticorps primaires utilisés.

L'anticorps anti-Cx43 (anti-pan-Cx43) reconnaît les formes phosphorylées et la forme non-phosphorylée de la Cx43. Lorsque nous l'utilisons en Western blot, nous détectons plusieurs bandes qui correspondent à ces formes de la Cx43. L'anti-PCx43 reconnaît la forme de la Cx43 qui est phosphorylée en Ser368 (figure 1). La caractérisation de ces anticorps a déjà été publiée par notre laboratoire (190).

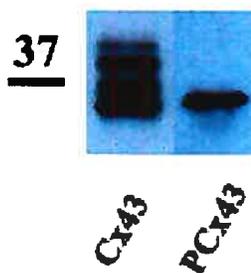


Figure 1

Figure 1. Western blots d'homogénats de cellules TtT/GF révélés avec différents anticorps contre la Cx43. Exemple typique de Western blots lors de l'utilisation d'anticorps dirigés contre la Cx43 et PCx43. L'utilisation de l'anticorps contre la Cx43 révèle plusieurs bandes tandis que l'utilisation de l'anticorps qui détecte la PCx43 montre une seule bande.

Anticorps Secondaire	Conjugué	Fournisseur	Adresse
Anti-Lapin	Peroxydase	Jackson	PA, États-Unis
	FITC	Sigma	MO, États-Unis
Anti-souris	Peroxydase	Jackson	PA, États-Unis
	TRITC	Jackson	PA, États-Unis

Tableau 3. Anticorps secondaires utilisés

2.2. CYTOKINES ET AUTRES PRODUITS

Pour les incubations avec les cytokines pro-inflammatoires, nous avons exposé les cellules à des concentrations finales de 20ng/mL de TNF- α (*Roche Diagnostics*, QC, Canada), 10ng/mL d'IL-1 β (*Sigma*, PA, États-Unis) ou 1ng/mL d'IFN- γ (*Sigma*, PA, États-Unis).

Nous avons utilisé la forskoline (FK), un stimulateur de l'adénylate cyclase (*Calbiochem*, CA, États-Unis) à une concentration finale de 15 μ M. Lors d'incubations avec le Phorbol-12-Myristate-13-Acétate (PMA), un stimulateur de la PKC (*Calbiochem*, CA, États-Unis), nous avons utilisé cette substance à une

concentration finale de 10ng/mL. Les inhibiteurs de protéines kinases provenaient tous de *Calbiochem* et nous les avons utilisés aux concentrations finales suivantes : 100nM de Kt5720 (inhibiteur de PKA), 25nM de Gö6983 (inhibiteur de PKC) et 20µM de U0126 (inhibiteur de MEK1/2). Nous avons utilisé l'acide okadaïque (OA) (*Calbiochem*, CA, États-Unis) à une concentration finale de 10nM afin d'inhiber la PP2A et à une concentration finale de 200nM afin d'inhiber la PP1 et la PP2A. La cyclosporine A, un inhibiteur de la PP2B (*Alexis Biochemicals*, CA, États-Unis), a été utilisée à une concentration finale de 1µM.

Le sel de lithium de lucifer-yellow (LY) utilisé pour les expériences de communication cellulaire provient d'*Invitrogen* (ON, Canada). La rhodamine-dextran (RD) provient de *Sigma* (MO, États-Unis).

Pour la culture cellulaire, nous nous sommes procurés la trypsine chez *Roche Diagnostics* (QC, Canada) et l'inhibiteur de trypsine chez *Sigma* (MO, États-Unis). Le sérum foetal bovin et le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) proviennent de *Gibco Invitrogen Cell Culture* (ON, Canada).

2.3. CULTURE CELLULAIRE

Dans notre laboratoire, nous utilisons la lignée cellulaire TtT/GF comme modèle de cellules folliculo-stellaires (FS) de l'HA. Il s'agit d'une lignée cellulaire immortalisée issue d'une tumeur thyrotropique de l'hypophyse, induite par radiothyroïdectomie (199). Tout comme les cellules FS de l'HA, les cellules de la lignée TtT/GF expriment la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) et la protéine S-100 (figure 2). Dans l'HA, ces protéines ne sont exprimées que par les cellules FS. De plus, les cellules TtT/GF et les cellules FS sont morphologiquement semblables : forme étoilée avec des prolongements

cytoplasmiques, présence de lysosomes, absence de granules de sécrétion, abondance de filaments intermédiaires dans le cytoplasme et formation de follicules (199). L'utilisation de la lignée cellulaire TtT/GF nous permet d'étudier une population de cellules FS pure. Elle nous permet aussi une plus grande abondance de cellules, ce qui est important pour l'étude de la communication intercellulaire. En effet, les cellules TtT/GF communiquent entre elles par des jonctions communicantes, tel que nous l'avons démontré (190).

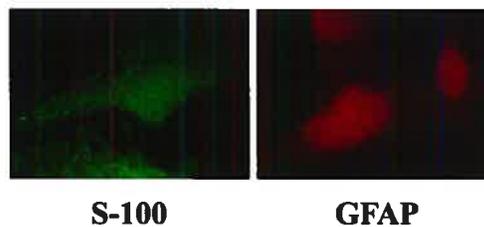


Figure 2

Figure 2. Localisation des protéines S-100 et GFAP dans les cellules TtT/GF (Micrographies prises par Sara Solinet, laboratoire du Dr. Vitale).

Les cellules TtT/GF nous ont été données par le Dr Ulrich Renner de l'Institut Max-Planck, en Allemagne. Ces cellules sont incubées dans un milieu de culture complet DMEM ayant un pH de 7,2 et contenant 10mM d'HEPES, 0,1M de bicarbonate de sodium (NaHCO_3), 0,2mg/mL de pénicilline, 0,05mg/mL de streptomycine et 5% de sérum fœtal bovin (5% FBS-DMEM). Les cellules sont incubées à une température de 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 .

À chaque semaine, nous avons repiqué les cellules par la méthode de trypsination. 1mL de trypsine 0,05% dans du DMEM sans sérum fut ajouté à

chaque boîte de cellules. Lorsque les cellules ont perdu leur adhérence, nous avons ajouté 1mL d'inhibiteur de trypsine 0,1% dans du DMEM sans sérum afin d'arrêter la trypsination. Par la suite, quelques gouttes de cellules ont été semées dans des boîtes de culture et les cellules ont été cultivées dans du milieu 5% FBS-DMEM. Après trois jours d'incubation, nous avons commencé les expériences.

2.4. PRÉPARATION D'HOMOGÉNATS DE CELLULES TtT/GF

Lorsque les cellules TtT/GF ont atteint une confluence de 80 à 90%, nous avons récupéré les cellules et nous les avons centrifugées à 1750 x g durant 10 minutes (Beckman GS-6R; *Beckman Canada*, Mississauga, ON, Canada) à une température de 4°C. Par la suite, 1mL de PBS (NaCl 8g/L, KCl 0,225g/L, Na₂HPO₄ 2,15g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L, pH=7,4) a été ajouté au culot et les cellules ont été resuspendues. Elles étaient ensuite centrifugées à 1750 x g durant 10 minutes (Beckman GS-6R; *Beckman Canada*, Mississauga, ON, Canada) à 4°C. Nous avons répété ce lavage. Après le second lavage, le culot a été resuspendu dans un tampon PBS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (PPI) (PBS + 10µM de bpV, 4mM de Na₃VO₄, 80mM de NaF, 20mM de Na₄P₂O₇, 2mM d'EGTA, 5µg/mL de leupeptine, 5µg/mL d'aprotinine et 2mM de PMSF). Nous avons ensuite soniqué les cellules durant 30 secondes (Fisher Sonic Dismembrator Model 300).

2.5. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

2.5.1. Fractions Triton-insolubles et Triton-solubles

Nous avons préparé les fractions solubles et insolubles dans le Triton à partir des homogénats de cellules totales. Les cellules ont été récupérées tel que

décrit en 2.4. Suite à la sonication, les cellules furent centrifugées à 1500 x g (Beckman GS-6R; *Beckman Canada*, ON, Canada) à 4°C durant 10 minutes afin de se débarrasser des noyaux et des débris cellulaires. Nous avons récupéré le surnageant (S1) et nous y avons ajouté du Triton X-100 à une concentration finale de 1%. La suspension était placée sous rotation à la température de la pièce durant 30 minutes. Par la suite, elle est centrifugée durant 15 minutes à 15000 x g (Beckman Microfuge E; *Beckman Canada*, ON, Canada) à 4°C. Le surnageant (S2) est considéré comme la fraction Triton-soluble. Le culot cellulaire (P1) est considéré comme la fraction Triton-insoluble. Elle est dissoute dans du tampon RIPA à un volume égal au culot. Dans la fraction insoluble, nous retrouvons des protéines typiques du cytosquelette : la chaîne légère de la myosine, l' α -tubuline ainsi que le GFAP. Par contre, ces protéines sont absentes de la fraction soluble (200).

2.6. DOSAGE DES PROTÉINES

La concentration de protéines dans les échantillons fut déterminée par la méthode de Bradford. 1 μ L d'échantillon (homogénat cellulaire ou fraction cellulaire) était dissout dans 20% de réactif (*BioRad*, ON, Canada) dans de l'eau distillée. Différentes quantités de BSA 1 μ g/ μ L ont été utilisées afin de faire une échelle d'étalonnage. Nous avons mesuré l'absorption de la lumière par les échantillons à une longueur d'onde de 595 nm. L'échelle d'étalonnage est établie grâce au logiciel Sigma Plot et cette échelle nous a permis de calculer la concentration protéique des échantillons.

2.7. ÉLECTROPHORÈSE ET WESTERN BLOT

2.7.1. Préparation d'échantillons pour le Western blot

Nous avons dilué les échantillons dans du tampon d'échantillon 2X (8M urée, 3% SDS, 5% mercaptoéthanol, 0.005% bleu de bromophénol, 70mM Tris HCl, pH=6,7) à une concentration finale de 2µg/µL. Les échantillons étaient chauffés à 100°C durant 3 minutes.

2.7.2. Électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE

Différentes quantités de protéines totales sont chargées, dépendant de l'échantillon en question : 10µg d'homogénat de cellules totales, 10µg de fraction Triton-insoluble et 20µg de fraction Triton-soluble. Afin de bien séparer les protéines de petit poids moléculaire (ex : Cx43, 43kDa), nous avons laissé migrer les échantillons dans un gel d'entassement 4% (70mM Tris-HCl pH=6,7, 0,4% SDS, 4mM EDTA pH=6,7, 5% glycérol, 4% acrylamide) puis dans un gel dénaturant de polyacrylamide 10% (0.2M Tris-0,1M Glycine, 0,4% SDS, 5% glycérol, 10 % acrylamide). Les gels sont soumis à un voltage initial de 70V durant 30 minutes puis à un voltage de 150V jusqu'à la disparition des bandes de 10 et de 15kDa de l'échelle moléculaire standard (*BioRad*, ON, Canada). L'électrophorèse s'est faite dans un tampon d'électrode 2X (0,2M Tris, 0,3M glycine, 0,2% SDS).

2.7.3. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Leur migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de pores de 45µM. Le transfert est effectué dans un tampon de transfert (25mM base Tris pH=8,3, 150mM glycine, 20% méthanol) à 4°C, sous

un ampérage de 290mA durant 1,5 heures. Par la suite, nous avons coloré les protéines grâce au rouge de Ponceau (0,2% rouge de Ponceau, 3% TCA) afin d'évaluer la qualité du transfert. Cette coloration est éliminée après un lavage au PBS.

2.7.4. Western blot

Le blocage des membranes s'est fait avec une solution de 5% de lait écrémé dans du PBS durant 1h à 37°C. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de 5% de lait écrémé durant 2h à 37°C pour les anticorps dirigés contre l'actine (1:500), la PCx43 (1:400), la PP2A (1:1000) et la PKC (1:500). L'incubation avec l'anticorps dirigé contre la Cx43 (1:20000) s'est fait durant 1,5 heures à la température de la pièce. Par la suite, nous avons lavé les membranes avec du PBS1X-Tween 0,05% durant 1h à 37°C. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1:2000 dans la solution 5% lait) durant 1h à la température de la pièce. Finalement, les membranes sont lavées avec du PBS1X-Tween 0,05% durant 45 minutes à la température de la pièce et ensuite avec du TBS (8g/L NaCl, 0,2g/L KCl, 3g/L Tris) durant 15 minutes à la température de la pièce.

2.7.5. Révélation des protéines par chimiluminescence

Suite à l'incubation des membranes avec les anticorps, les complexes antigène-anticorps sont révélés grâce aux solutions de chimiluminescence Lumi-Light Western Blotting Substrate de *Roche* (QC, Canada). La fluorescence émise par les protéines marquées est captée sur un film Classic Blue obtenu chez *La Cie Universelle de Rayon-X du Canada Ltée* (QC, Canada).

2.7.6. Lavage des membranes

Afin d'avoir une référence de la quantité de protéines chargées dans les puits d'électrophorèse, les membranes sont traitées dans le but d'enlever les anticorps et par la suite, elles sont incubées avec l'anticorps contre l'actine- β . Pour se faire, nous avons lavé les membranes deux fois durant 30 minutes avec une solution de 100mM de glycine dans de l'eau distillée (pH=2,5) à la température de la pièce. Ensuite, les membranes sont lavées avec du PBS1X-Tween 0,05% durant 45 minutes à la température de la pièce. Après les lavages, nous avons procédé au Western blot tel que décrit dans la section 2.7.4.

2.7.7. Quantification des bandes immunoréactives

Afin de permettre une comparaison de la quantité de protéines présentes dans les bandes immunoréactives des Western blots, nous avons scanné les films (UMAX Astra 1200S Scanner). Par la suite, nous avons utilisé le programme Scion Image (*Scion Corporation*, MD, É-U) afin de mesurer l'intensité des bandes. Les valeurs obtenues pour les bandes qui correspondent à la Cx43 et PCx43 sont divisées par les valeurs obtenues pour l'intensité de la bande qui correspond à l'actine- β pour la même membrane. Toutes les données obtenues et utilisées pour obtenir les graphiques ont été normalisées de cette façon. Le programme Sigma Plot 2001 est utilisé afin de calculer les moyennes des valeurs obtenues pour chaque expérience (nous avons fait au moins 3 répétitions pour chaque expérience). Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (écart type de la moyenne).

2.8. IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE CONFOCALE

2.8.1. Préparation des cellules

Les cellules TtT/GF sont mises en culture sur des lamelles de verre dans des boîtes de Pétri de 35mm contenant du milieu 5%FBS-DMEM. Nous avons incubé les cellules à une température de 37°C dans une atmosphère 5% CO₂-95% air. Le milieu était changé quotidiennement. Lorsque la confluence des cellules était optimale pour la microscopie (80%), nous avons ajouté les cytokines soit le TNF- α (20ng/mL), l'IL-1 β (10ng/mL), ou l'IFN- γ (1ng/mL) durant 15 minutes, 30 minutes ou 60 minutes ou les autres drogues durant 5, 15, 30 ou 60 minutes.

2.8.2. Fixation et perméabilisation

Après le traitement spécifique, les cellules sont lavées avec du PBS et immédiatement fixées avec du formaldéhyde 3,7% dans du PBS durant 20 minutes à la température de la pièce. Les cellules ont ensuite été lavées plusieurs fois avec du PBS et perméabilisées avec trois traitements à l'acétone : 5 minutes dans de l'acétone 50% dans l'eau distillée, 5 minutes dans de l'acétone 100% et 5 minutes dans de l'acétone 50% dans l'eau distillée. Finalement, les cellules sont à nouveau lavées avec du PBS.

2.8.3. Blocage et incubation avec les anticorps

Les cellules ont été incubées dans 3% de lait écrémé dans du PBS durant 1h à la température de la pièce afin de bloquer les interactions non-spécifiques. Par la suite, nous avons incubé les cellules avec l'anticorps primaire durant 1h à 37°C et nous les avons lavées avec du PBS. Les anticorps sont étaient dilués dans 1% de lait écrémé dans du PBS aux concentrations suivantes : NPCx43 (1:20),

PCx43 (1:30), Cx43 (1:1000), PP2A (1:50) et PKC (1:50). Les anticorps secondaires couplés au FITC ou au TRITC ont été dilués dans 1% de lait écrémé dans du PBS à une concentration de 1:200. Finalement, nous avons lavé les cellules avec du PBS.

2.8.4. Montage des lamelles et observation

Les lamelles ont été montées avec du DABCO 5% dans 50% glycérol-50% PBS. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence Zeiss Axiophot et les photos ont été prises à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP en utilisant le programme Northern Eclipse v.7.0.

2.9. COMMUNICATION INTERCELLULAIRE : DIFFUSION DE COLORANTS

2.9.1. Préparation des cellules

Les cellules ont été préparées tel que décrit au paragraphe 2.8.1, mais à plus grande confluence ($\approx 95\%$) afin de maximiser les interactions intercellulaires et de permettre aux cellules de former un tapis cellulaire adéquat pour l'expérience. Nous avons ensuite traité les cellules avec les cytokines ou autres substances.

2.9.2. Marquage

La technique de la diffusion du colorant fut développée par El-Fouly (201). Il s'agit de léser le tapis cellulaire et de rompre la membrane plasmique des cellules qui côtoient la blessure. Ceci permet aux colorants (le lucifer yellow (LY) et la rhodamine-dextran (RD)) présents dans le milieu d'entrer dans les cellules lésées. Lorsque le LY, une molécule de faible poids moléculaire, est

capté par une cellule endommagée, il passe dans les cellules adjacentes par l'intermédiaire des jonctions communicantes. En revanche, la RD est une grosse molécule de 70 kD qui, ne pouvant pas franchir les jonctions communicantes, reste dans les cellules endommagées, agissant ainsi comme un marqueur de cellules lésées. Le nombre de rangées de cellules marquées à la RD soustrait du nombre de cellules marquées au LY indique le nombre de cellules qui communiquent entre elles par les jonctions communicantes.

Suite au traitement (cytokines ou autres substances), les cellules furent lavées au PBS et le milieu de culture fut remplacé par un mélange de 1mL de LY 1mg/mL (*Invitrogen*, ON, Canada) et 0,5mL de RD 5mg/mL (*Sigma*, MO, États-Unis) dans du PBS 1X sans calcium ajouté. Trois blessures furent infligées dans le tapis cellulaire à l'aide d'une aiguille. Ensuite, les cellules furent incubées durant 3 minutes, à l'obscurité. Par la suite, la solution contenant les colorants fut remplacée par 1mL de milieu 5% FBS-DMEM et les cellules furent placées à l'obscurité durant 10 minutes.

2.9.3. Fixation, montage et observation

Les cellules furent lavées avec du PBS et fixées avec 3,7% formaldéhyde dans du PBS durant 20 minutes à l'obscurité et à la température de la pièce. Par la suite, les lamelles furent montées avec une solution de 5% DABCO dans 50% glycérol-50% PBS. Les cellules furent observées au microscope à fluorescence Zeiss Axiophot et les photos furent prises en utilisant le programme Northern Eclipse 7.0.

3. RÉSULTATS

3.1. MODULATION DE L'ÉTAT DE PHOSPHORYLATION BASALE DE LA Cx43 EN SER368

3.1.1. Présence de la Cx43 et la PCx43 dans les cellules TtT/GF non-traitées

Tel que mentionné dans la section 1.3.5., la Cx43 peut se trouver sous diverses formes phosphorylées. En particulier, le résidu Ser368 de la Cx43, qui est phosphorylé surtout par la PKC (127), est impliqué dans le contrôle de la CIJC dans plusieurs types de cellules. Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de la Cx43 dans notre modèle cellulaire, les cellules TtT/GF. Tel que montré dans la figure 3, les cellules TtT/GF expriment la Cx43.

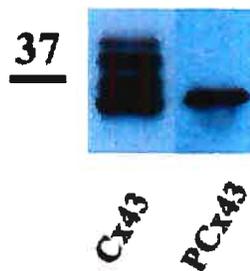


Figure 3.

Figure 3. Western Blot de cellules TtT/GF contrôles. Reprise de la fig 1. Les cellules expriment la Cx43 et la PCx43.

En utilisant l'anticorps qui reconnaît la forme non-phosphorylée et toutes les formes phosphorylées de la Cx43, nous avons observé 4 bandes immunoréactives dans les homogénats de cellules TtT/GF. Plusieurs auteurs affirment que la bande inférieure, ou bande 0, ne représente que la forme non-phosphorylée de la Cx43 et que les 3 autres bandes représentent des formes phosphorylées (71, 102). Nous avons utilisé un anticorps spécifique contre la

forme phosphorylée en Ser368 de la Cx43 (nommée PCx43 ci-après). Nos résultats montrent la présence de la PCx43 dans les cellules TtT/GF non-stimulées (fig 3 PCx43). Cette forme apparaît comme une seule bande immunoréactive. Ces résultats démontrent que dans des conditions basales, la Cx43 est fortement phosphorylée dans les cellules TtT/GF.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux protéines kinases (PK) impliquées dans la phosphorylation basale de la Cx43 dans notre système.

3.1.2. Implication de la PKC

Puisque plusieurs chercheurs ont démontré la participation de la PKC dans la phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43 (127, 138), nous avons commencé par étudier l'importance de cette PK dans l'état de phosphorylation basale de la Cx43 dans notre modèle. Nous avons traité les cellules avec un inhibiteur de PKC, Gö6983, à une concentration finale de 25nM durant 5, 15, 30 et 60 minutes. Nous avons par la suite fait des Western Blots afin d'évaluer l'expression de la Cx43 et de la PCx43 en réponse à l'inhibition de la PKC. La quantification de ces bandes indique que le résidu Ser368 de la Cx43 est déphosphorylé rapidement et de façon significative suite à une inhibition de la PKC (figs 4 a et b). Il s'agit bien d'une déphosphorylation et non pas d'une dégradation de la protéine puisque le taux de Cx43 reste constant (figs 4 c et d). De plus, il faut noter que les bandes immunoréactives qui migrent plus lentement et qui sont considérées des formes phosphorylées ne semblent pas diminuer d'intensité suite au traitement avec l'inhibiteur de PKC (fig 4 d). Nous obtenons donc des résultats plus fidèles avec l'utilisation de l'anticorps contre la PCx43 qu'en évaluant l'apparition/disparition des bandes dans le cas de l'anticorps panCx43. Nos résultats démontrent aussi

que le changement de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 peut se faire très rapidement.

En revanche, l'activation de la PKC par un traitement avec 10 ng/mL de PMA durant 5, 15, 30 et 60 minutes induit une phosphorylation significative de la Cx43 comparée aux cellules contrôles (fig 5 a). Encore une fois, ceci n'affecte pas le taux de Cx43 total de façon significative (figure 5 b). Nos résultats démontrent donc que la PKC est impliquée dans la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368 dans les cellules TtT/GF.

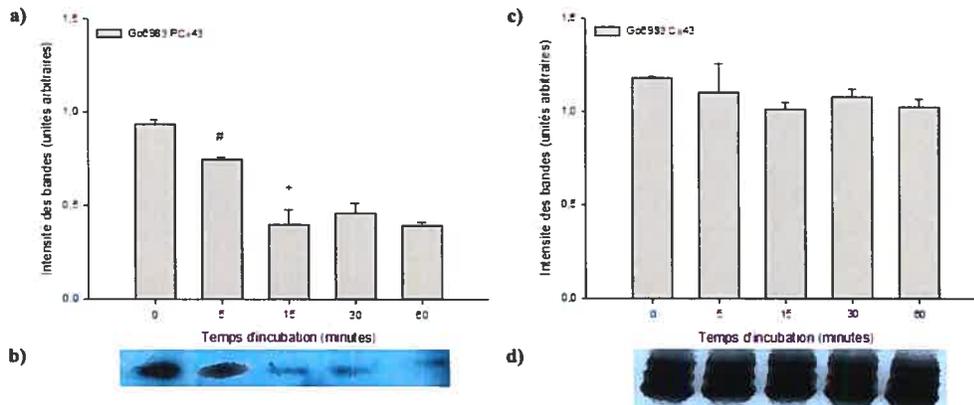


Figure 4

Figure 4. Cinétique de l'effet de l'inhibition de l'activation de la PKC sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules TtT/GF avec l'inhibiteur de PKC Gö6983 durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blots avec l'anti-PCx43 (a, b) et l'anti-Cx43 (c, d). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont les moyennes de quantifications. Pour l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de PCx43 diminue de façon significative

après 5 minutes d'incubation et il est maintenu bas jusqu'à 60 minutes d'incubation. (# = $P < 0,02$ pour 5 minutes par rapport au contrôle, + = $P < 0,05$ pour 15 minutes par rapport à 5 minutes, $n = 3$). b) Western Blot représentatif des cellules traitées : anticorps dirigé contre la PCx43. c) Taux de Cx43 suite au traitement. Le taux de Cx43 total ne change pas de façon significative suite aux traitements. ($n = 3$). d) Western Blot représentatif des cellules traitées avec Gö6983 : anticorps dirigé contre la Cx43.

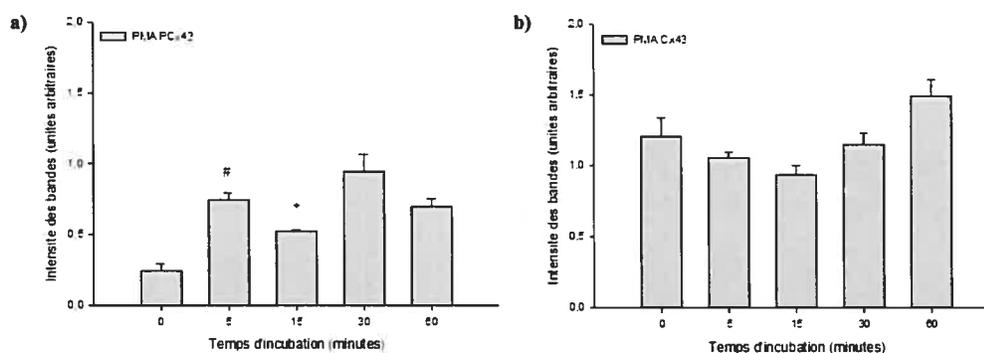


Figure 5

Figure 5. Cinétique de l'effet de la stimulation de la PKC sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules T1T/GF avec le stimulateur de PKC, le PMA, durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont les moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. La phosphorylation augmente de façon significative entre 0 et 5 minutes d'incubation (# = $P < 0,02$), diminue de façon significative entre 5 et 15 minutes d'incubation (+ = $P < 0,05$), augmente de

nouveau après 30 minutes d'incubation et diminue par la suite après 60 minutes de traitement. Cependant, les variations du taux de PCx43 après 30 et 60 minutes de traitement ne sont pas statistiquement significatives. (n = 3). b) Taux de Cx43 suite au traitement. Le taux de Cx43 totale ne change pas de façon significative suite au traitement. (n = 3).

3.1.3. Implication de la PKA

La PKA interagit avec la Cx43. Cependant, la sérine cible de cette PK serait le résidu 364 (54). On ne sait pas si la PKA agit directement ou indirectement sur la Cx43. Nous nous sommes donc demandés si, via un mécanisme indirect, la PKA pourrait être impliquée dans la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368. Tout comme pour la PKC, nous avons regardé l'effet de l'inhibition et de l'activation de la PKA sur le taux de PCx43 dans nos cellules. Comme le démontre la figure 6 a, l'inhibition de la PKA par un traitement avec la drogue Kt5720 à une concentration finale de 100nM durant 5, 15, 30 ou 60 minutes induit la déphosphorylation de la PCx43 (fig 6 a). Cependant, le taux total de Cx43 reste constant (fig 6 b).

Lorsque les cellules sont traitées avec 15 μ M de forskoline (FK), un stimulateur de la PKA, on voit une baisse transitoire du taux de la PCx43 après 5 et 15 minutes d'incubation (fig 7a), bien que cette diminution ne soit pas significative. La FK induit aussi une augmentation de la Cx43 totale après 60 minutes d'incubation, indiquant la possibilité qu'après une longue incubation, la synthèse de la protéine soit augmentée par une voie dépendante de la PKA (fig 7 b).

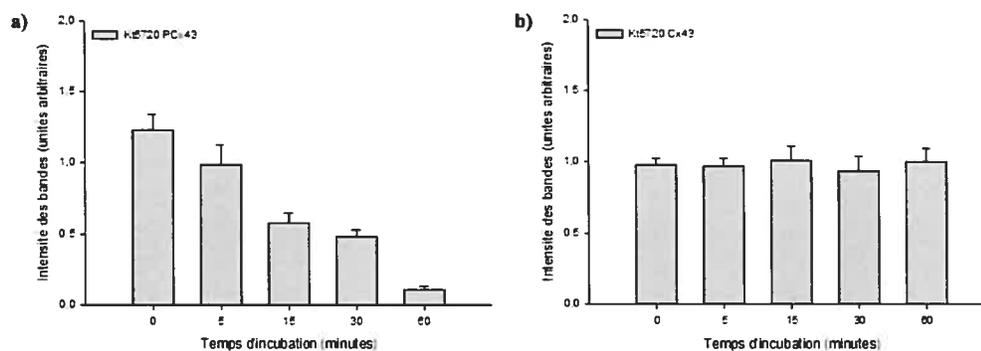


Figure 6

Figure 6. Cinétique de l'effet de l'inhibition de l'activité de la PKA sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules T1T/GF avec l'inhibiteur de PKA, le K15720, durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx3, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Bien qu'on ne voit aucun changement significatif entre les temps d'incubation consécutifs, la protéine est déphosphorylée en Ser368 tout au long du traitement ($n = 3$). En effet, la déphosphorylation entre le temps contrôle et 60 minutes d'incubation avec l'inhibiteur de PKA est significative ($P < 0,02$). b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 totale ne change pas de façon significative ($n = 3$).

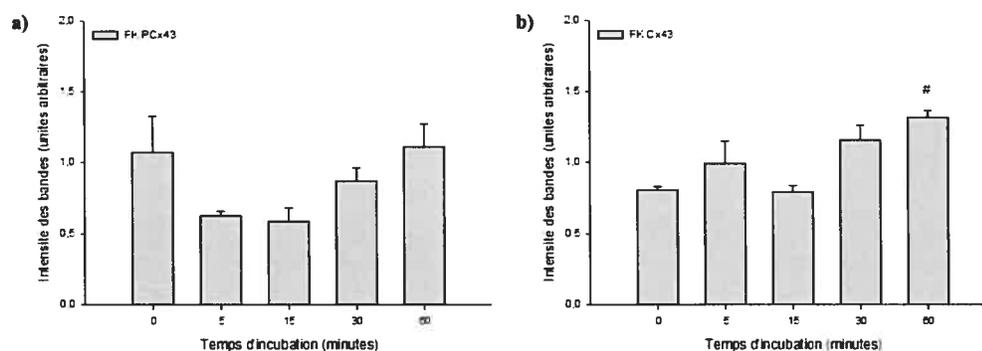


Figure 7

Figure 7. Cinétique de l'effet de la stimulation de la PKA sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules TtT/GF avec la forskoline, un stimulateur de la PKA, durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de PCx43 diminue suite à 5 et 15 minutes d'incubation avec la forskoline. Cependant, cette diminution n'est pas significative ($n = 3$). b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 totale augmente après 60 minutes de traitement. Cependant, cette augmentation n'est pas significative ($n = 3$).

3.1.4. Implication de ERK1/2

La PKC peut interagir avec les MEKK, des kinases qui se retrouvent en amont des MEK dans la voie de signalisation Ras/Rho (revue dans (202)). Nous avons donc étudié la possibilité que, d'une façon indirecte, la voie MAPK affecte l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368. Afin d'inhiber les MEK1/2, nous avons traité les cellules avec l'U0126 à une concentration finale de 20 μ M durant

15, 30 ou 60 minutes. D'après nos résultats, l'inhibition de MEK1 et MEK2 induit la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 30 minutes d'incubation. La protéine est par la suite rephosphorylée (fig 8 a, 60 minutes). Le taux de Cx43 total reste constant (fig 8 b).

Nous avons tenté d'activer la voie MAPK par un traitement avec l'EGF. Cependant, nos résultats ne démontrent aucun changement dans le taux de PCx43 suite au traitement (résultats non-montrés).

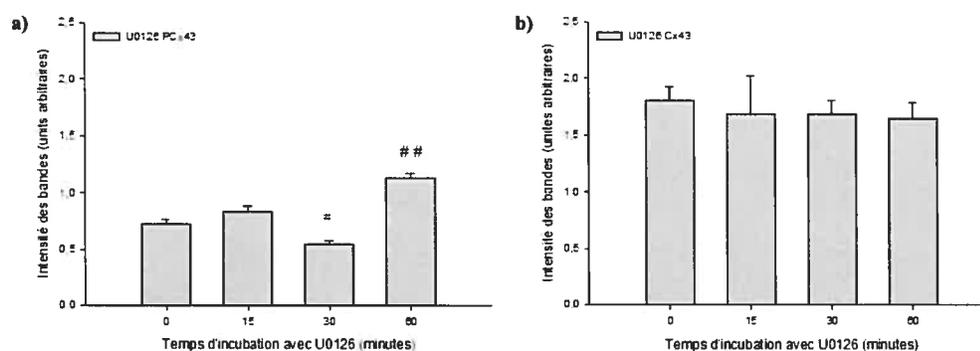


Figure 8

Figure 8. Cinétique de l'effet de l'inhibition de la voie MAPK sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules TtT/GF avec l'inhibiteur de MEK1/2, le U0126, durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) et anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de phosphorylation en Ser368 diminue de façon significative après 30 minutes d'incubation comparé au contrôle pour ensuite augmenter après 60 minutes

d'incubation. (# = $P < 0,02$ pour 30 minutes comparé à 15 minutes, ## = $P < 0,002$ pour 60 minutes comparé à 30 minutes. $n = 3$). b) Taux de Cx43 total suite aux traitements. Le taux de Cx43 total ne change pas de façon significative. ($n = 3$)

3.2. CORRÉLATION ENTRE L'ÉTAT DE PHOSPHORYLATION DE LA Cx43 EN SER368 ET LA CIJC

La phosphorylation de la Cx43 est étroitement liée à l'assemblage et au turnover des JC. Cependant, le lien entre la phosphorylation de la Cx43 et la CIJC peut dépendre du type de cellules étudié, des conditions expérimentales et des molécules ou des résidus phosphorylés impliqués. Nous avons donc entrepris des expériences afin d'étudier l'effet de la phosphorylation en Ser368 de la Cx43 sur la CIJC. En particulier, nous avons étudié l'impact de la PKC et de la PKA, puisque ces deux kinases ont la capacité de modifier l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368.

3.2.1. Effets sur la CIJC médiés par la PKC

Les résultats des expériences de scrape-and-load démontrent que l'inhibition de la PKC induit une diminution significative de la CIJC après seulement 5 minutes d'incubation et ce jusqu'à 1 heure de traitement, comparé aux cellules traitées avec le DMSO (fig 9). De plus, nous pouvons noter une corrélation temporelle entre la déphosphorylation de la PCx43 et la diminution de la communication intercellulaire (fig 9 c et d).

Lorsque la PKC est stimulée avec le PMA, une augmentation initiale de la CIJC a lieu après 5 minutes d'incubation avec le PMA comparé aux cellules traitées au DMSO (fig 10). Cependant, bien que le taux de PCx43 reste au-delà du taux contrôle, la CIJC diminue durant 15, 30 et 60 minutes d'incubation avec le PMA (fig 10).

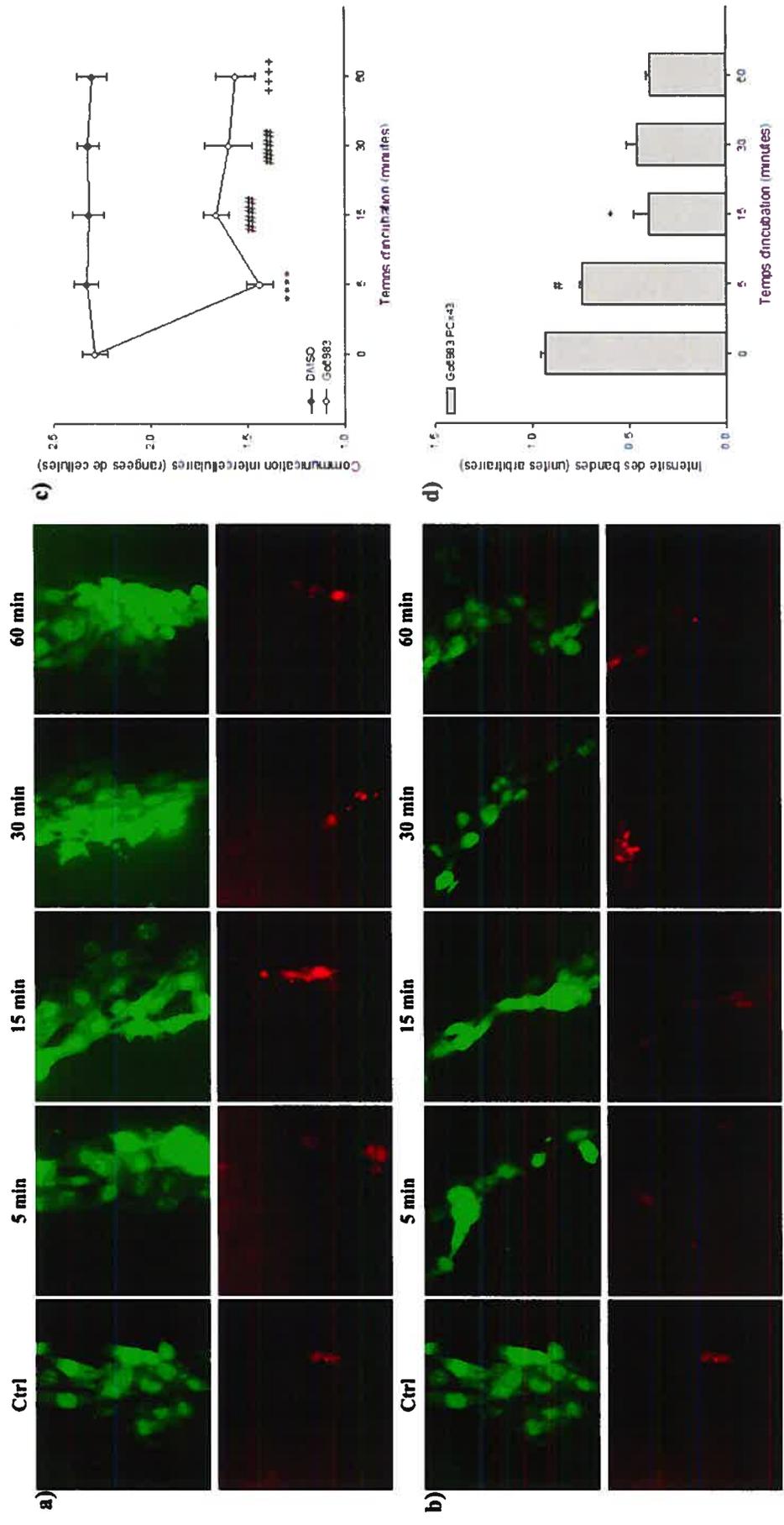


Figure 9

Figure 9. Effets de l'inhibition de la PKC sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage à la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMSO pendant 5, 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au LY demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec Gö6983 durant 5, 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow diminue après 5 minutes de traitement et reste bas durant tout le traitement. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape-and-load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow lors du traitement avec Gö6983 est significativement moindre que le nombre de rangées de cellules traitées avec le DMSO durant les mêmes temps d'incubation. (**** = $P < 0,00001$, ##### = $P < 0,00002$, +++++ = $P < 0,00005$ pour les cellules traitées avec le Gö6983 comparées aux cellules traitées avec le DMSO durant 5, 15, 30 et 60 minutes. $n = 9$). d) Répétition de la figure 4 a. Taux de PCx43 après un traitement avec Gö698. La déphosphorylation de la PCx43 par l'inhibition de la PKC est observée. (# = $P < 0,02$ pour 5 minutes comparé au contrôle, + = $P < 0,05$ pour 15 minutes comparé à 5 minutes).

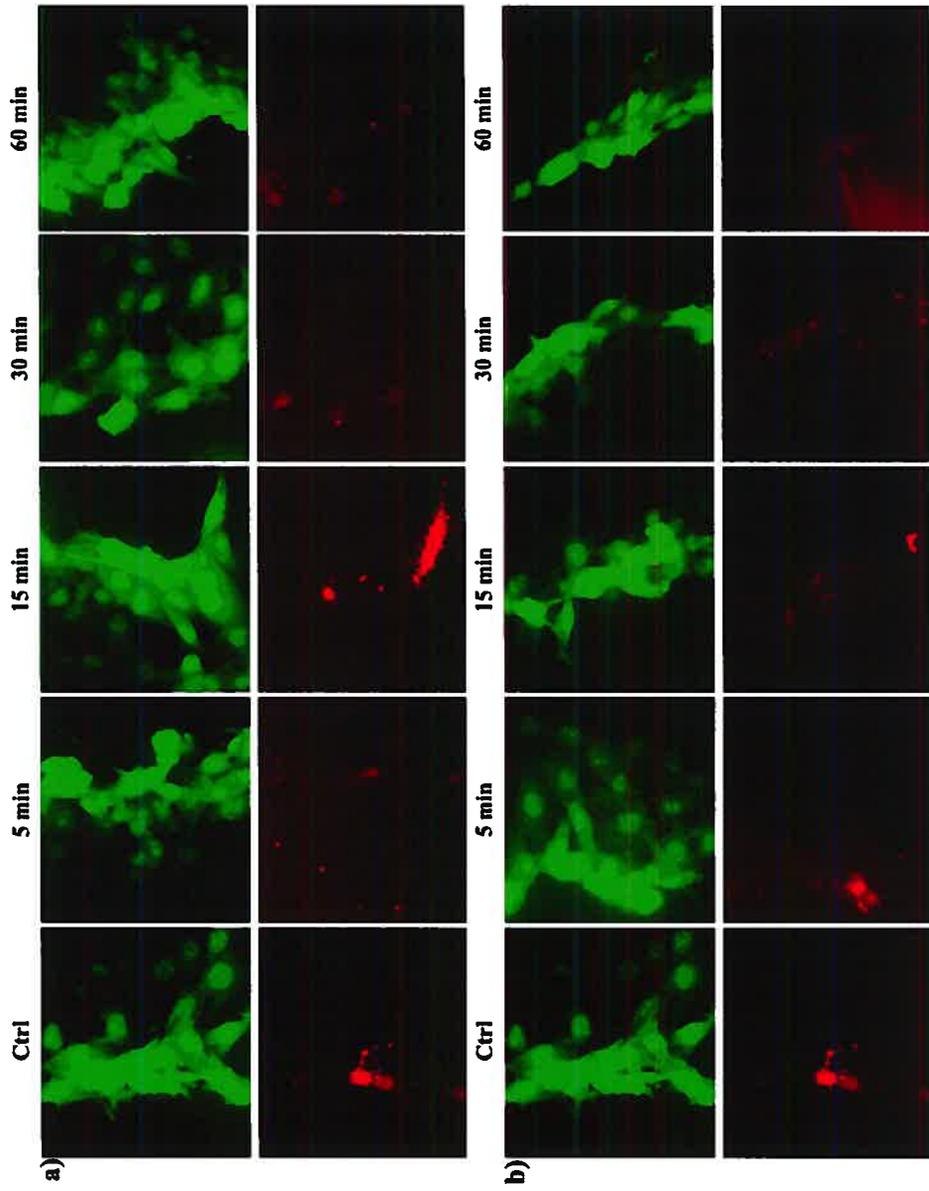


Figure 10

Figure 10. Effets de la stimulation de la PKC sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage à la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMSO pendant 5, 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec le PMA durant 5, 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow augmente initialement, puis diminue après 15, 30 et 60 minutes de traitement. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape and load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow après 5 minutes de traitement avec le PMA est significativement plus élevé que le nombre de rangées de cellules traitées avec le DMSO. Par la suite, le nombre de rangées de cellules marquées diminue lors du traitement avec le PMA comparé au traitement avec le DMSO. (# = $P < 0,02$, ## = $P < 0,002$, #### = $P < 0,00002$, ** = $P < 0,001$ pour les cellules traitées avec le PMA comparées aux cellules traitées avec le DMSO, $n = 9$). d) Répétition de la figure 5 a. Taux de PCx43 après un traitement avec le PMA. (# = $P < 0,02$ pour 5 minutes comparées au contrôle, + = $P < 0,05$ pour 15 minutes comparées à 5 minutes.)

3.2.2. Effets sur la CIJC médiés par la PKA

Nos résultats montrent qu'après 5 minutes d'incubation avec l'inhibiteur de PKA, il y a une diminution significative de la CIJC comparée aux cellules contrôles (fig 11). Par la suite, le niveau de communication intercellulaire est rétabli jusqu'à un niveau comparable au contrôle. Finalement, après 60 minutes, le niveau de communication intercellulaire baisse à nouveau. Le traitement à cours terme des cellules avec le stimulateur de la PKA, la forskoline, ne semble pas affecter la communication entre les cellules TtT/GF (fig 12).

La déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 5 et 60 minutes de traitement avec l'inhibiteur de PKA est accompagnée par une diminution de la communication intercellulaire. Cependant, la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 15 et 30 minutes de traitement se reflète par une augmentation et un maintien de la CIJC à un niveau comparable à celui des cellules traitées avec le DMSO (figs 11 c et d). Ces résultats semblent démontrer un effet indirect de la PKA sur la phosphorylation de la S368 de la Cx43 et, par conséquent, des effets différents sur la communication intercellulaire lorsque comparés avec les effets de la PKC.

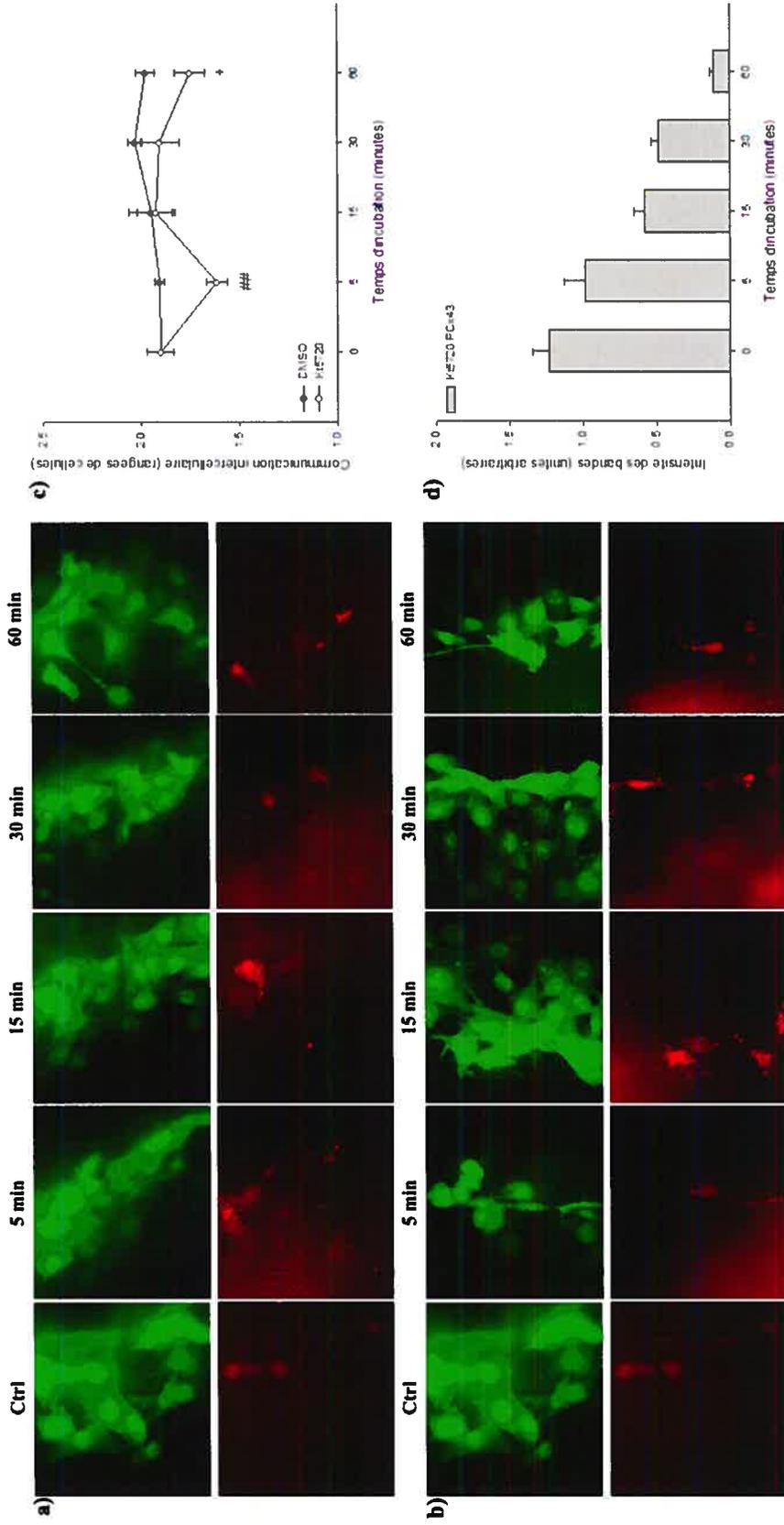


Figure 11

Figure 11. Effets de l'inhibition de la PKA sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes) Le marquage au LY est en vert et le marquage de la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMSO pendant 5, 15, 30, et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec le Kt5720 durant 5, 15, 30, et 60 minutes. La communication intercellulaire diminue après 5 minutes d'incubation. Par la suite, la communication intercellulaire est rétablie et ce jusqu'à 30 minutes d'incubation. Finalement, la communication diminue à nouveau suite à 60 minutes de traitement. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats de scrape and load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow après 5 minutes de traitement avec le Kt5720 est significativement plus bas que le nombre de rangées de cellules traitées avec le DMSO. Par la suite, le nombre de rangées de cellules marquées traitées avec le Kt5720 augmente. La CIJC diminue significativement après 60 minutes de traitement. (## = $P < 0,002$, pour les cellules traitées avec le Kt5720 comparées aux cellules traités avec le DMSO durant 5 minutes, * = $P < 0,05$ pour les cellules traitées avec le Kt5720 comparées aux cellules traités avec le DMSO durant 60 minutes. $n = 5$) d) Répétition de la figure 6 a. Taux de PCx43 après un traitement avec Kt5720. La déphosphorylation entre le temps contrôle et 60 minutes d'incubation avec l'inhibiteur de PKA est significative ($P < 0,02$).

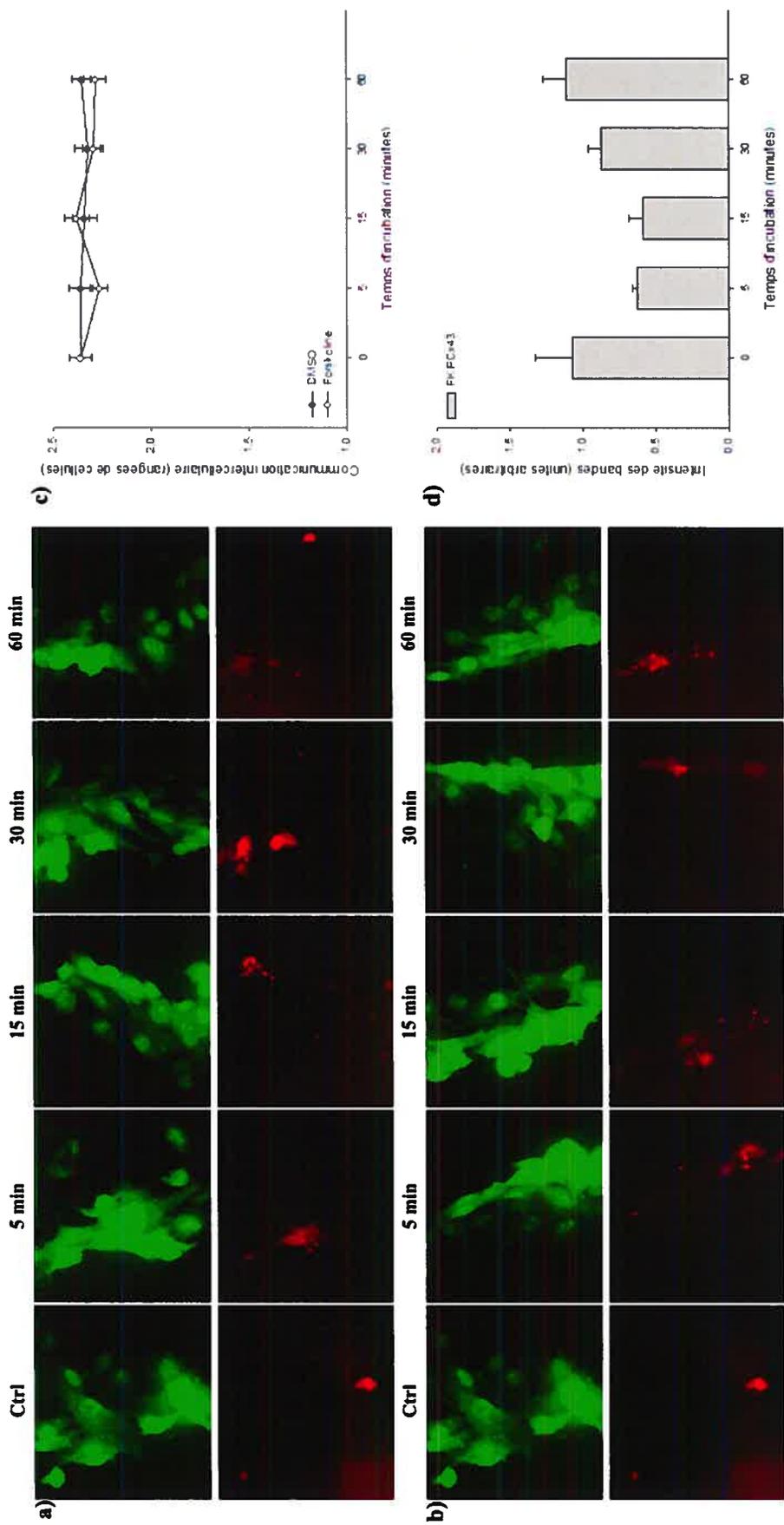


Figure 12

Figure 12. Effets de la stimulation de la PKA sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes) Le marquage au LY est en vert et le marquage de la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMSO pendant 5, 15, 30, et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec la forskoline durant 5, 15, 30, et 60 minutes. Le marquage au lucifer-yellow est en vert et le marquage à la rhodamine-dextran est en rouge. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow ne diffère pas comparé au traitement avec le DMSO. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats de scrape and load. Le niveau de communication intercellulaire des cellules traitées avec la forskoline est comparable à celui des cellules traitées avec le DMSO ($n = 9$). d) Répétition de la figure 7 a. Taux de PCx43 après un traitement avec la forskoline.

3.3. IMPACT DE L'IFN- γ SUR LA PCX43 ET LA CIJC

3.3.1. Effets de l'IFN- γ sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368

Nous avons débuté notre étude de l'impact des cytokines proinflammatoires sur les jonctions communicantes avec l'IFN- γ . Nous avons traité les cellules avec cette cytokine durant 15, 30 et 60 minutes. Nos résultats démontrent que l'IFN- γ n'influence pas la phosphorylation de la Cx43 en S368 ni le taux total de la protéine de façon significative (fig 13).

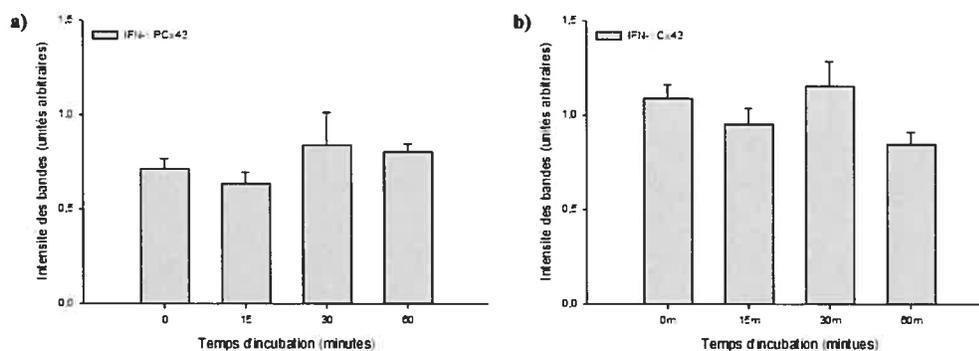


Figure 13

Figure 13. Cinétique de l'effet de l'IFN- γ sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules Tt/GF avec l'IFN- γ durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de protéine ne varie pas de façon significative. (n = 3) b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 totale ne change pas de façon significative. (n = 3)

3.3.2. Effets de l'IFN- γ sur la localisation intracellulaire de la PCx43

Afin de vérifier si l'IFN- γ pourrait causer une redistribution intracellulaire de la PCx43 sans affecter son expression, nous avons fait des expériences d'immunofluorescence dans lesquelles nous avons effectué un double marquage des cellules TtT/GF avec un anticorps contre la PCx43 et avec un anticorps contre la NPCx43 (Cx43 non-phosphorylée en Ser368). Les cellules TtT/GF étaient traitées avec l'IFN- γ à une concentration finale de 1ng/mL durant 15, 30 et 60 minutes. Dans les cellules contrôles, la PCx43 se retrouve à la membrane plasmique, aux contacts intercellulaires et un peu en région périnucléaire (fig 14 a). Un traitement à court terme avec l'IFN- γ n'induit aucune redistribution de la PCx43 (fig 14 a). Dans les cellules contrôles, la NPCx43 se retrouve surtout en région périnucléaire mais aussi à la membrane plasmique et aux contacts intercellulaires (14 b). Suite à un traitement avec l'IFN- γ , la distribution de la NPCx43 ne change pas (fig 14 b). Les microphotographies d'immunifluorescence démontrent certaines structures sphériques à l'intérieur de la cellule. Nous avons démontré dans une étude antérieure que quelques unes de ces structures correspondent à la présence de la Cx43 dans les lysosomes et l'appareil de Golgi (203).

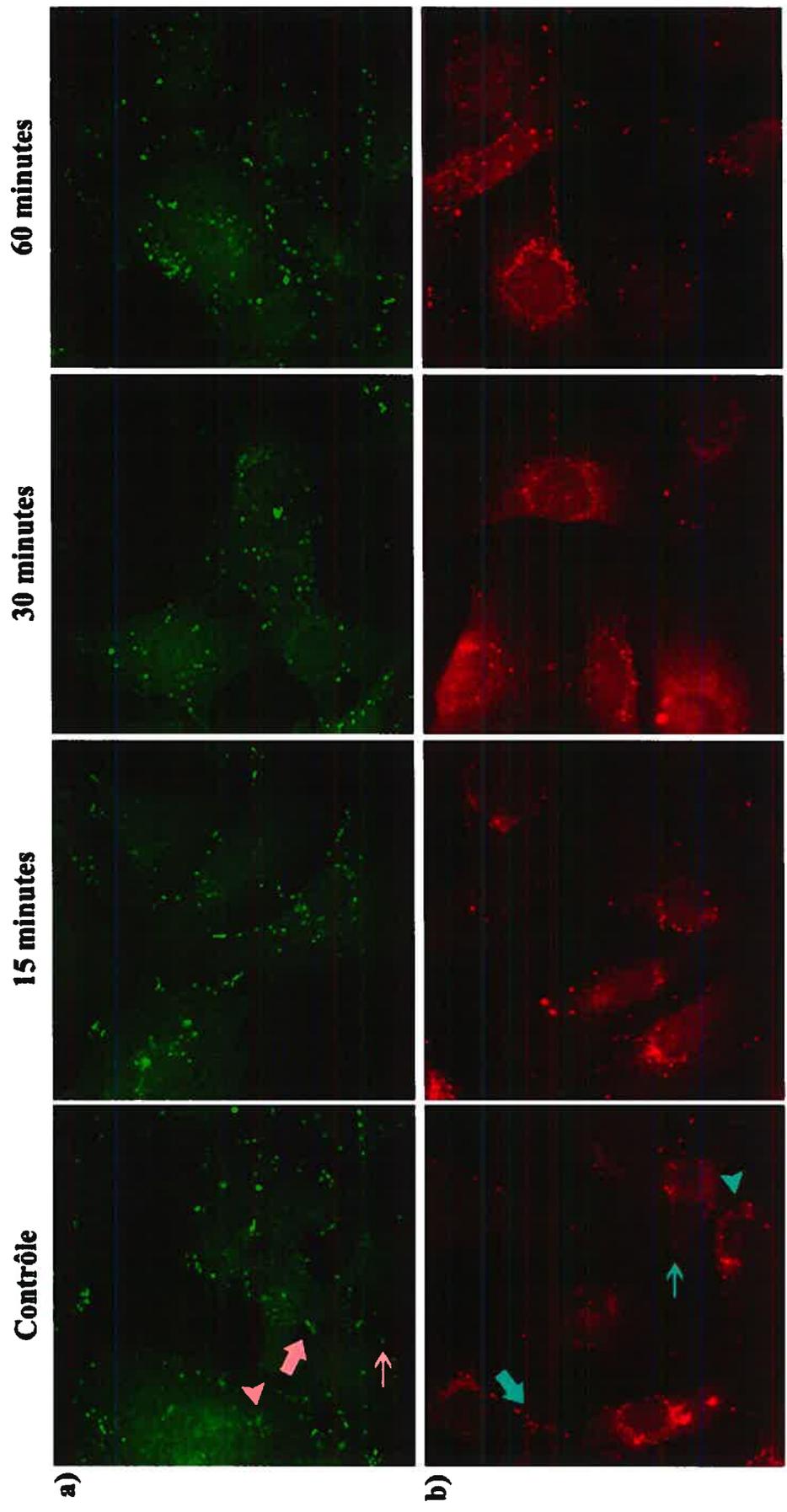


Figure 14

Figure 14. Localisation intracellulaire de la PCx43 et de la NPCx43 suite à un traitement avec l'IFN- γ Nous avons incubé les cellules avec l'IFN- γ pour 15, 30 et 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été traitées pour la microscopie de fluorescence avec des anticorps anti-PCx43 (a) ou anti-NPCx43 (b). a) Dans les cellules contrôles, le marquage de PCx43 se trouve à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact cellulaire (grosse flèche). Dans certaines cellules, un faible marquage périnucléaire est aussi visible (tête de flèche). Suite à un traitement avec l'IFN- γ , aucune translocation n'est observée. b) Marquage de la NPCx43. Dans les cellules contrôles, le marquage est périnucléaire (tête de flèche), à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact cellulaire (grosse flèche). Suite à un traitement avec l'IFN- γ , aucune redistribution n'est observée.

3.3.3. Effets de l'IFN- γ sur la CIJC

Bien que l'exposition à court terme des cellules TtT/GF à l'IFN- γ n'induit aucun changement ni dans la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 ni dans la localisation intracellulaire de la PCx43, le même traitement induit une chute significative dans la CIJC lorsque comparé aux cellules contrôles (fig 15). Cette chute est plus prononcée après 15 minutes d'incubation, mais il y a par la suite une récupération du niveau de CIJC (fig 15 c). Nos résultats montrent que la diminution rapide et transitoire de la CIJC lors d'un traitement à court terme avec l'IFN- γ n'est pas accompagnée d'un changement dans l'état de phosphorylation du résidu Ser38 de la Cx43 (fig 15 c et d). Cependant, il est possible que l'IFN- γ cause la phosphorylation ou la déphosphorylation d'un autre acide aminé afin d'induire un blocage ou une fermeture des jonctions communicantes.

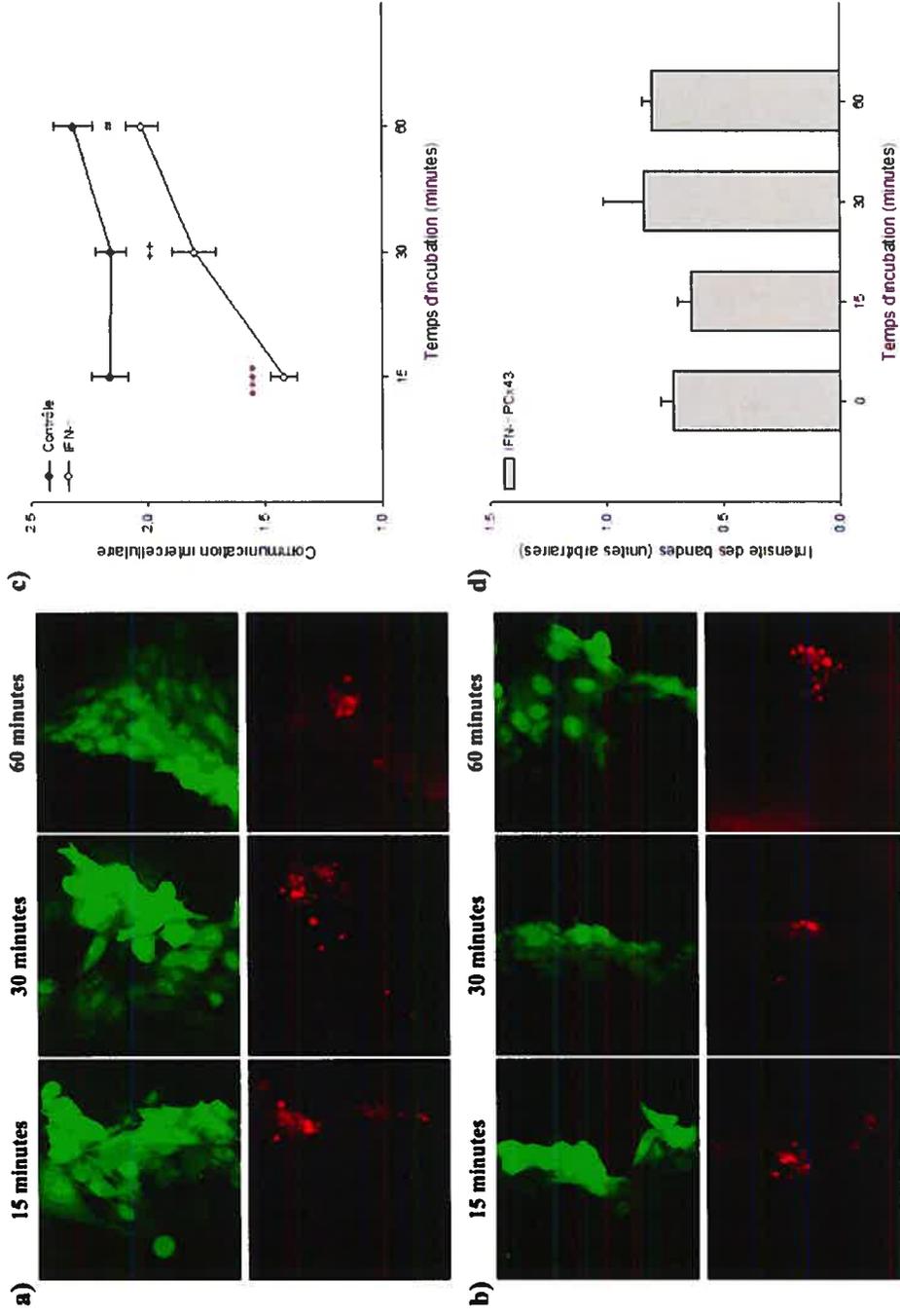


Figure 15

Figure 15. Effets de l'IFN- γ sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage à la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMEM pendant 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec l'IFN- γ durant 15, 30 et 60 minutes. La communication intercellulaire diminue après 15 minutes d'incubation. Par la suite, la communication intercellulaire est récupérée. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape and load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow après 15 minutes de traitement avec l'IFN- γ est significativement plus bas que le nombre de rangées de cellules traitées avec le DMEM. Par la suite, la CIJC entre les cellules traitées avec l'IFN- γ est récupérée, mais demeure toujours significativement plus basse que la CIJC entre les cellules traitées avec le DMEM. (**** = $P < 0,00001$, ++ = $P < 0,005$, ## = $P < 0,002$, pour les cellules traitées avec l'IFN- γ comparées aux cellules traitées avec le DMEM. ($n = 9$)). d) Répétition de la figure 13 a. Taux de PCx43 après un traitement avec l'IFN- γ .

3.4. IMPACT DE L'IL-1 β SUR L'ÉTAT DE PHOSPHORYLATION DE LA Cx43 EN SER368 ET LA CIJC

3.4.1. Effets de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en S368

Nous avons poursuivi nos études sur les cytokines proinflammatoires avec l'IL-1 β . Nous avons traité les cellules TtT/GF avec 10ng/mL d'IL-1 β durant 15, 30 ou 60 minutes. Les résultats de Western blots avec l'anticorps dirigé contre la PCx43 démontrent que le taux de phosphorylation en Ser368 diminue de façon significative après 30 minutes de traitement avec l'IL-1 β . Ensuite, après 60 minutes de traitement, la Cx43 semble être rephosphorylée à un niveau comparable au contrôle (fig 16 a). Le taux de Cx43 totale ne varie pas de façon significative indiquant que l'IL-1 β ne cause pas une dégradation de la Cx43 mais un changement de l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 (fig 16 b).

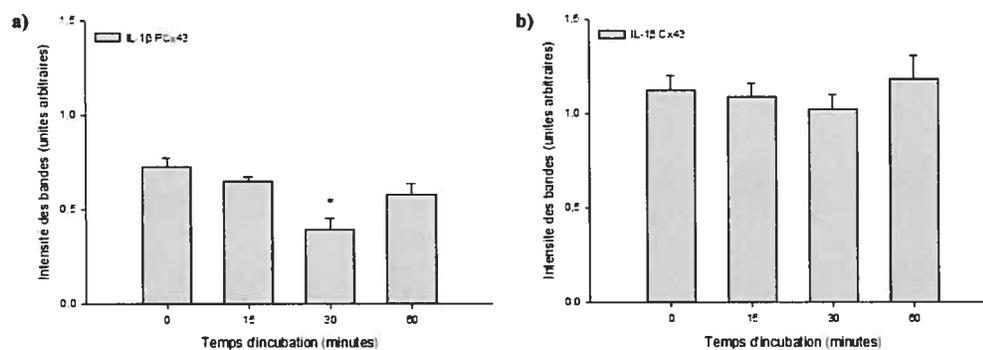


Figure 16

Figure 16. Cinétique de l'effet de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules TtT/GF avec l'IL-1 β durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blots avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films

et nous avons quantifié l'intensité des bandes. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de phosphorylation en Ser368 diminue de façon significative après 30 minutes d'incubation comparé au contrôle. Après 60 minutes d'incubation, le taux de PCx43 est comparable au niveau contrôle. (= $P < 0,01$ pour 30 minutes comparé à 15 minutes. (n = 4) b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 totale ne change pas de façon significative. (n = 3).*

3.4.2. Implication des PK dans l'effet de l'IL-1 β sur les cellules TtT/GF

Puisque l'IL-1 β cause une déphosphorylation de la PCx43 après 30 minutes de traitement suivie d'une rephosphorylation de la Cx43 en Ser 368 , il est possible que certaines PK soient impliquées dans la rephosphorylation de la Cx43 en Ser368. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé la PKC, la PKA et les MEK1/2 durant 30 minutes. Nous avons par la suite traité les cellules avec 10ng/mL d'IL-1 β durant 15, 30 et 60 minutes.

Nos résultats démontrent que la PKC joue un rôle non seulement dans la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368, mais qu'elle est nécessaire à la rephosphorylation de la Cx43 suite au traitement avec l'IL-1 β (fig 17 a).

Nous avons répété la même expérience avec un inhibiteur de la PKA. Les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur durant 30 minutes avant de subir une exposition à l'IL-1 β durant 15, 30 ou 60 minutes. Nos analyses des bandes de Western Blots indiquent que l'inhibition de la PKA inhibe la déphosphorylation de la PCx43 causée par l'IL-1 β (fig 17 b). Ceci démontre une implication de la

PKA dans la modulation de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 par l'IL-1 β .

Finalement, nous avons répété l'expérience en inhibant les MEK1/2 durant 30 minutes. L'inhibition des MEK1/2 inhibe la déphosphorylation de la PCx43 causée par l'IL-1 β (fig 17 c). Ces résultats indiquent que les MEK1/2 pourraient jouer un rôle indirect dans le changement de l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 lors d'une exposition à court terme des cellules TtT/GF à l'IL-1 β .

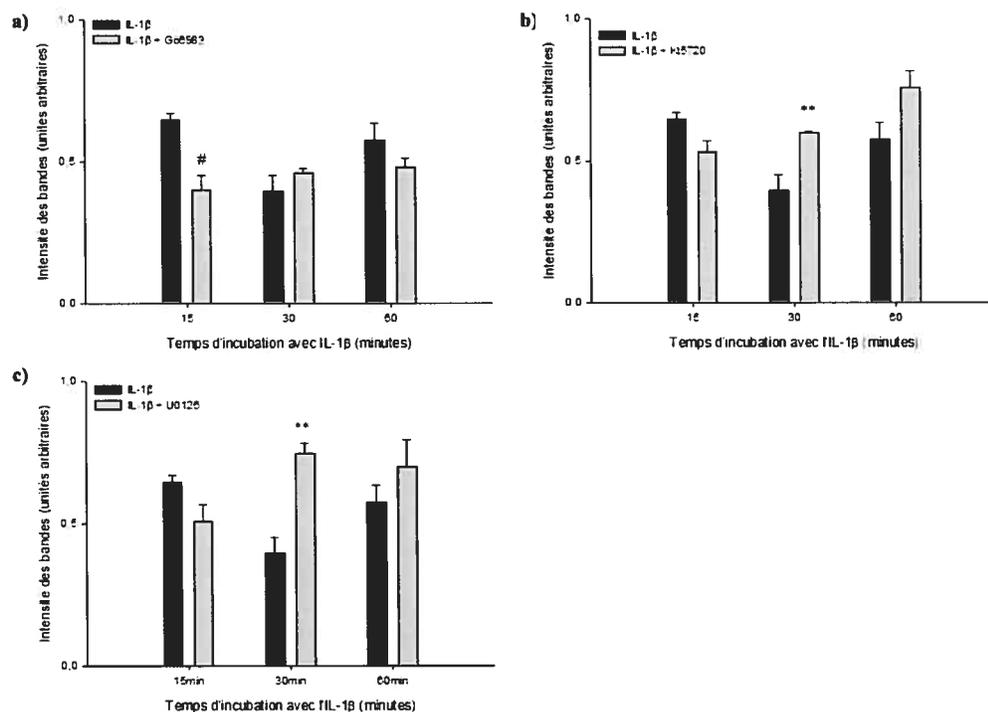


Figure 17

Figure 17. Participation de la PKC, PKA et MAPK dans les effets de l'IL-1 β sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons préincubé les cellules avec du milieu de culture contenant (colonnes grises) ou non (colonnes noires) les inhibiteurs respectifs de PKC (a), PKA (b) et MEK1/2 (c) durant 30 minutes. Par

la suite, les cellules ont été incubées avec l'IL-1 β durant différents intervalles de temps. Ensuite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43. Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Les graphiques montrent les taux de PCx43 suite à un traitement avec l'IL-1 β seul ou après l'inhibition de la PKC (a), la PKA (b) ou les MEK1/2 (c). a) Le taux de rephosphorylation de la Cx43 après traitement avec l'IL-1 β est affecté par l'inhibition de la PKC. (# = $P < 0,02$ pour inhibition de PKC et traitement avec IL-1 β durant 15 minutes. $n = 3$). b) La déphosphorylation de la PCx43 par l'IL-1 β observée après 30 minutes est significativement inhibée lorsque la PKA est inhibée. L'inhibition de la PKA n'affecte pas la rephosphorylation de la Cx43 suite au traitement avec l'IL-1 β . (** = $P < 0,001$ pour inhibition de PKA et traitement avec IL-1 β durant 30 minutes. $n = 4$). c) La déphosphorylation de la PCx43 par l'IL-1 β après 30 minutes de traitement est significativement inhibée lorsque les MEK1/2 sont inhibées. L'inhibition des MEK1/2 n'affecte pas la rephosphorylation de la Cx43 suite au traitement avec l'IL-1 β . (** = $P < 0,001$ pour inhibition de MEK1/2 et traitement avec IL-1 β durant 30 minutes. $n = 3$).

3.4.3. Effets de l'IL-1 β sur la localisation intracellulaire de la PCx43

Après nos études sur l'effet de l'IL-1 β sur l'état de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368, nous nous sommes demandés si cet effet impliquait aussi une relocalisation intracellulaire de la PCx43. Pour étudier cette possibilité, nous avons traité les cellules Tt/GF avec l'IL-1 β durant 15, 30 ou 60 minutes. Nous les avons ensuite préparées pour la microscopie de fluorescence et nous les avons

marquées avec des anticorps contre la PCx43 et contre la NPCx43. Des microphotographies représentatives sont présentées dans la figure 18. Nos résultats démontrent que dans les cellules contrôles, la PCx43 se retrouve surtout à la membrane plasmique et aux endroits de contacts intercellulaires mais aussi en région périnucléaire. Après 15 minutes d'incubation avec l'IL-1 β , aucun changement n'est observé. Par contre, après 30 minutes d'incubation avec la cytokine, le niveau de PCx43 à la membrane plasmique semble diminuer (fig 18 a, 30 minutes). Nous avons aussi observé une faible diminution du marquage de la PCx43 dans la région périnucléaire. Après 60 minutes d'incubation, le niveau de PCx43 augmente en région périnucléaire (fig 18 a, 60 minutes). La localisation périnucléaire de la NPCx43 ne semble pas varier avec le traitement (fig 18 b).

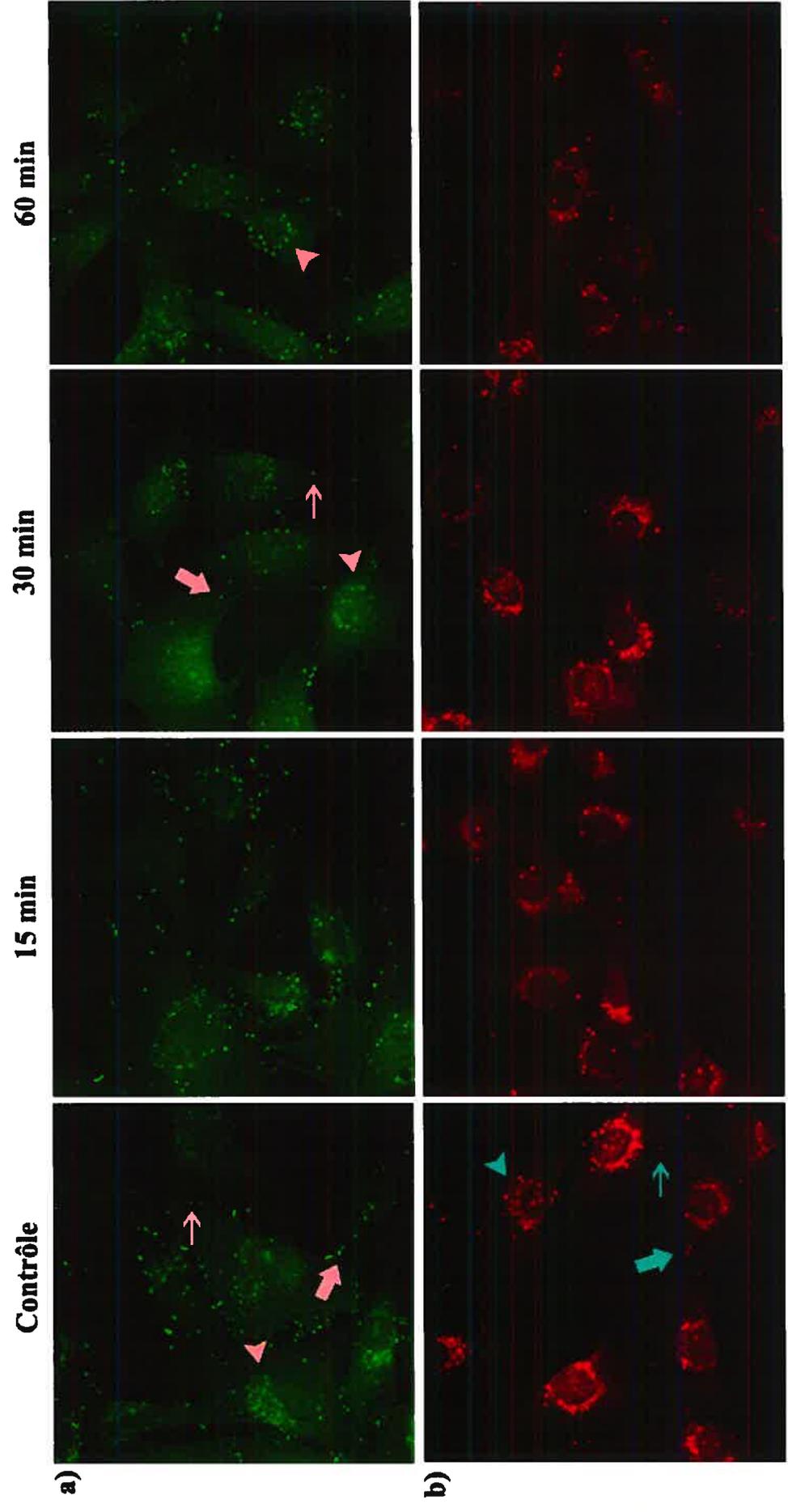


Figure 18

Figure 18. Localisation intracellulaire de la PCx43 et de la NPCx43 suite à un traitement avec l'IL-1 β . Nous avons incubé les cellules avec l'IL-1 β pour 15, 30 et 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été traitées pour la microscopie de fluorescence avec des anticorps anti-PCx43 (a) ou anti-NPCx43 (b). a) Dans les cellules contrôles, le marquage de PCx43 se trouve à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact cellulaire (grosse flèche). Dans certaines cellules, un faible marquage périnucléaire est aussi visible (tête de flèche). Suite à un traitement de 15 minutes avec l'IL-1 β , aucun changement n'est observé. Après un traitement de 30 minutes avec l'IL-1 β , il y a une diminution du marquage à la membrane plasmique (flèche), aux endroits de contact intercellulaire (grosse flèche) et en région périnucléaire (tête de flèche). Un traitement de 60 minutes avec l'IL-1 β induit ensuite une hausse du marquage en région périnucléaire (tête de flèche). b) Marquage de la NPCx43. Dans les cellules contrôles, le marquage est périnucléaire (tête de flèche), à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact cellulaire (grosse flèche). Suite à un traitement avec l'IL-1 β , aucune modification dans la localisation intracellulaire n'est observée.

3.4.4. Effets de l'IL-1 β sur la CIJC

Afin d'évaluer l'effet de l'IL-1 β sur la CIJC, nous avons fait des expériences de scrape-and-load sur les cellules TtT/GF traitées avec cette cytokine. Le niveau de communication intercellulaire entre les cellules contrôles ne varie pas durant l'expérience (fig 19 a). Cependant, l'incubation avec l'IL-1 β affecte significativement la CIJC (fig 19 a, b et c). Des incubations de 15 et 30 minutes induisent une diminution significative de la CIJC. Cette communication est rétablie à un niveau normal après 60 minutes (fig 19 c). Nous voyons une corrélation entre la diminution de la CIJC et la déphosphorylation de la PCx43 après 30 minutes d'incubation avec l'IL-1 β (fig 19 c et d). Cependant, la diminution initiale de la CIJC après 15 minutes d'incubation n'est pas accompagnée par une déphosphorylation significative de la PCx43. Il est possible que l'IL-1 β induise des changements affecte des résidus autres que la Ser368 dans la Cx43 ou que l'IL-1 β affecte l'état d'autres protéines.

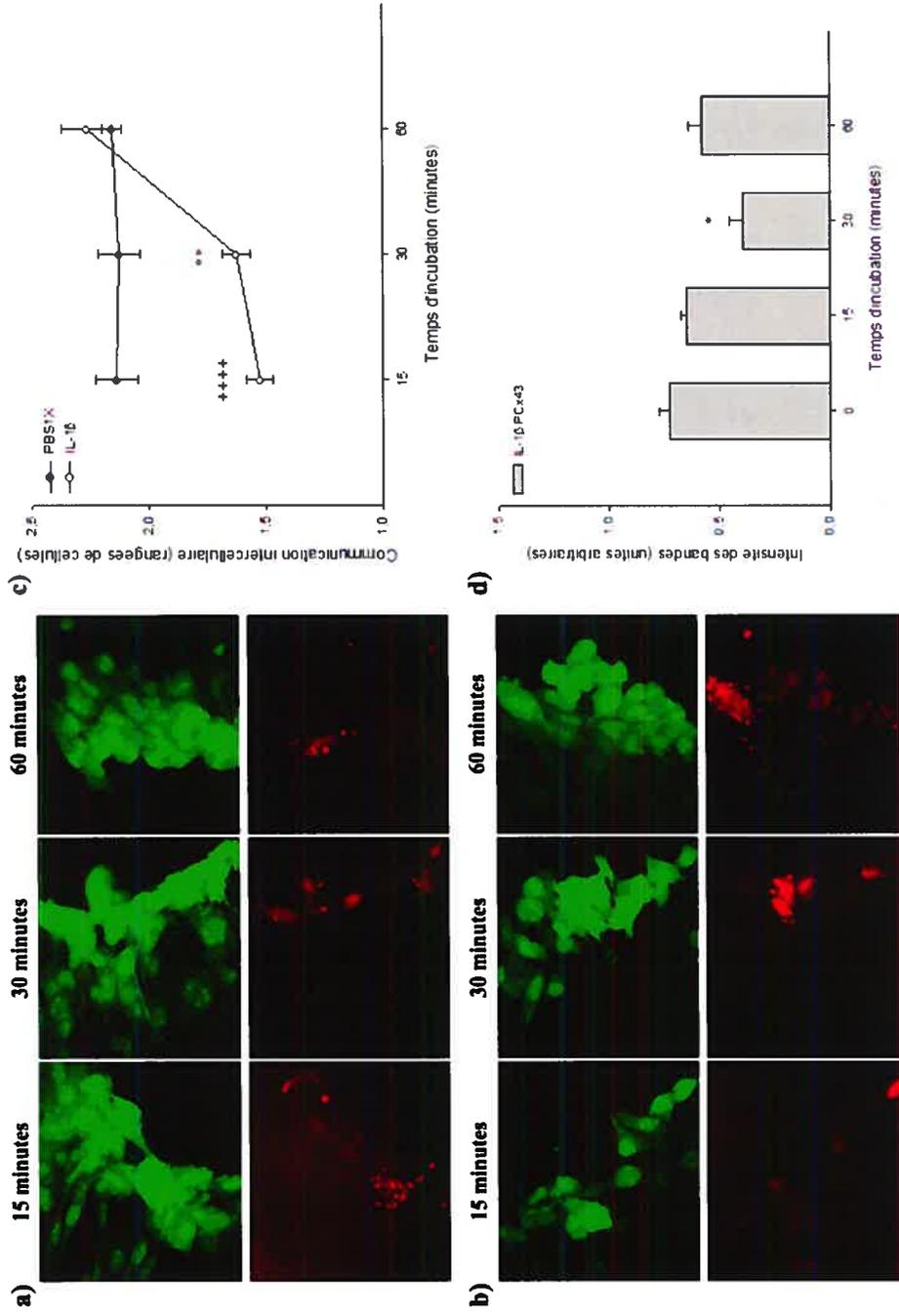


Figure 19

Figure 19. Effets de l'IL-1 β sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage de la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du DMEM pendant 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec l'IL-1 β durant 15, 30 et 60 minutes. La communication intercellulaire diminue après 15 minutes d'incubation. Par la suite, la communication intercellulaire est récupérée. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape and load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow après 15 et 30 minutes de traitement avec l'IL-1 β est significativement plus bas que le nombre de rangées de cellules traitées avec le DMEM. Ce n'est qu'après 60 minutes d'incubation avec l'IL-1 β que la CIJC est rétablie à un niveau normal. (++++ = $P < 0,00005$, ** = $P < 0,001$, pour les cellules traitées comparées aux cellules contrôles. $n = 8$) d) Répétition de la figure 16 a. Taux de PCx43 après un traitement avec l'IL-1 β . (* = $P < 0,01$ pour 30 minutes comparées à 15 minutes. $n = 4$)

3.5. IMPACT DU TNF- α SUR L'ÉTAT DE PHOSPHORYLATION DE LA Cx43 EN SER368 ET LA CIJG

3.5.1. Effets du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en S368

Nous avons traité les cellules TtT/GF avec 20ng/mL de TNF- α durant 15, 30 et 60 minutes. Nos résultats démontrent que le TNF- α induit une déphosphorylation rapide et transitoire de la PCx43. Après 15 minutes de traitement, la PCx43 est déphosphorylée de façon significative dans les cellules traitées comparées aux cellules contrôles (fig 20 a). Par la suite, la phosphorylation de la Ser368 est récupérée et dépasse significativement le niveau normal. Tout au long du traitement, le taux de Cx43 demeure constant (fig 20 b).

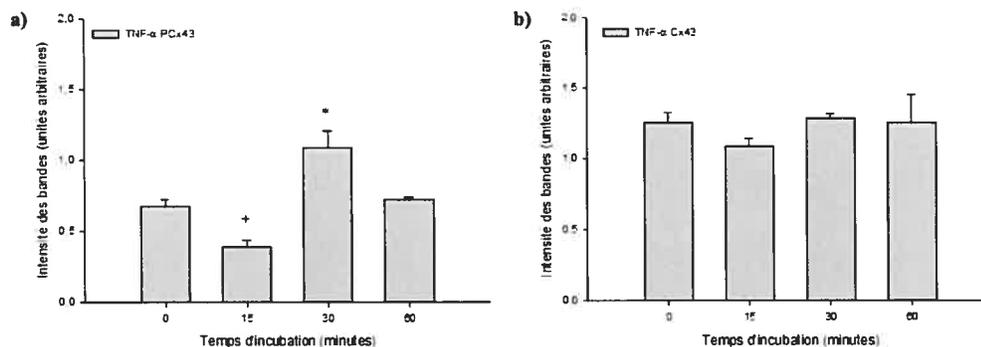


Figure 20

Figure 20. Cinétique de l'effet du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons traité les cellules TtT/GF avec le TNF- α durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à une électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons

considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Le taux de phosphorylation diminue de façon significative après 15 minutes d'incubation comparé au taux contrôle. Par la suite, la Cx est significativement phosphorylée après 30 minutes. (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes comparé au contrôle, * = $P < 0,01$ pour 30 minutes comparé à 15 minutes. $n = 3$). b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 totale ne varie pas de façon significative. ($n = 3$).

3.5.2. Effets du TNF- α sur la localisation intracellulaire de la PCx43

Dans les cellules contrôles, la PCx43 est localisée à la membrane plasmique, aux contacts intercellulaires et en région périnucléaire (fig 21 a). Après 15 minutes d'exposition, le marquage de PCx43 diminue aux contacts intercellulaires. Un traitement de 30 minutes induit la récupération de la PCx43 à la membrane plasmique et aux contacts intercellulaires (fig 21 a).

Dans les cellules contrôles, la NPCx43 se retrouve surtout en région périnucléaire. Le marquage ne semble pas varier après 15 et 30 minutes de traitement. Par contre, après 60 minutes, nous voyons l'apparition d'un faible marquage cytosolique (fig 21 b).

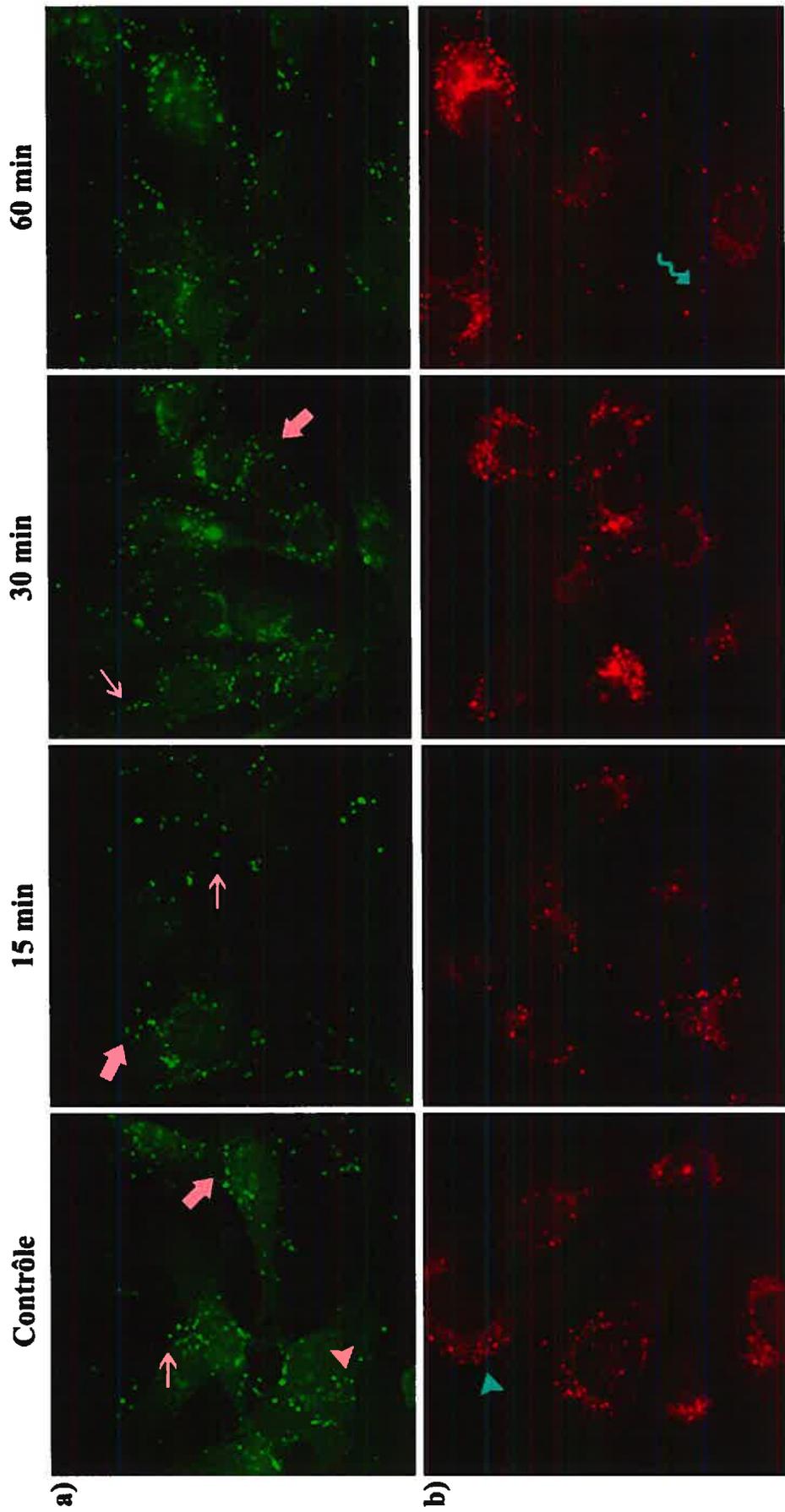


Figure 21

Figure 21. Localisation intracellulaire de la PCx43 et la NPCx43 suite à un traitement avec le TNF- α Nous avons incubé les cellules avec le TNF- α pour 15, 30 et 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été traitées pour la microscopie de fluorescence avec des anticorps anti-PCx43 (a) ou anti-NPCx43 (b). a) Dans les cellules contrôles, le marquage de PCx43 se trouve à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact cellulaire (grosse flèche). Dans certaines cellules, un marquage périnucléaire est aussi visible (tête de flèche). Suite à un traitement de 15 minutes avec le TNF- α , la PCx43 diminue à la membrane plasmique (flèche) et aux contacts intercellulaires (grosse flèche). Suite à un traitement de 30 minutes, la PCx43 est réapparait à la membrane plasmique (flèche) et aux endroits de contact intercellulaire (grosse flèche). b) Marquage de la NPCx43. Dans les cellules contrôles, le marquage est périnucléaire (tête de flèche). Suite à un traitement de 60 minutes avec le TNF- α , un marquage de la NPCx43 apparait en région cytosolique (flèche zig-zag).

3.5.3. Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF

Puisqu'un traitement de 15 minutes avec le TNF- α induit une diminution de la PCx43, nous nous sommes demandé quelles protéines phosphatases seraient impliquées dans cette déphosphorylation. Pour ce faire, nous avons prétraité les cellules durant 30 minutes avec l'acide okadaïque à une concentration finale de 200nM afin d'inhiber la PP1 et la PP2A et à une concentration de 10nM pour inhiber uniquement la PP2A. Afin d'inhiber la PP2B, nous avons utilisé la cyclosporine A à une concentration finale de 1 μ M. Les cellules ont ensuite été traitées avec le TNF- α durant 15 minutes. L'inhibition de ces PP inhibe la déphosphorylation causée par le TNF- α (fig 22 a). Ces résultats démontrent que

la PP2A, la PP2B et possiblement la PP1 pourraient être impliquées dans la déphosphorylation de la PCx43 causée par le TNF- α . Le taux total de Cx43 reste constant tout au long de l'expérience (fig 22 b).

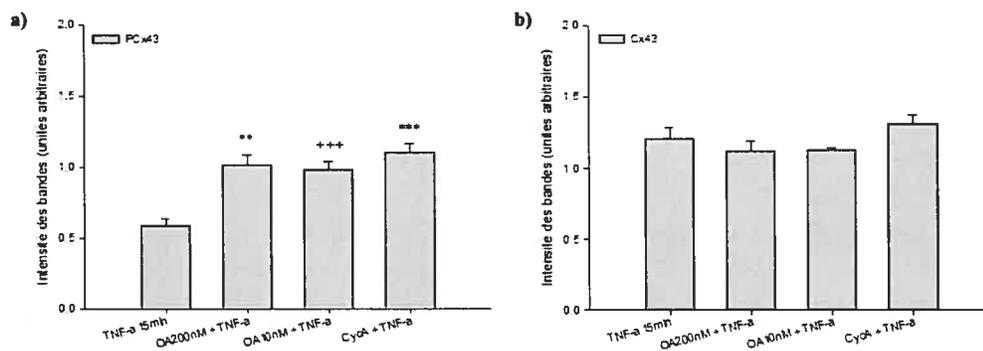


Figure 22

Figure 22. Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF. Les cellules ont été prétraitées avec l'AO à une concentration de 200nM ou 10nM ou avec la cyclosporine A à une concentration finale de 1 μ M durant 30 minutes. Les cellules ont été par la suite exposées au TNF- α durant 15 minutes. Par la suite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43 (a) ou anti-Cx43 (b). Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Dans le cas de l'anti-Cx43, nous avons considéré toutes les bandes ensemble. a) Taux de PCx43 suite aux traitements. Un traitement de 15 minutes avec le TNF- α cause une déphosphorylation significative de la PCx43. L'inhibition de la PP1 et PP2A, la PP2A ou la PP2B inhibe la déphosphorylation causée par le TNF- α (** = $P < 0,001$ pour prétraitement avec l'OA 200nM comparé au traitement avec le TNF- α seul, +++ = $P < 0,0005$ prétraitement avec

*l'OA 10nM comparé au traitement avec le TNF- α seul, *** = $P < 0,0001$ prétraitement avec la cyclosporine A comparé au traitement avec le TNF- α seul. $n = 6$). b) Taux de Cx43 suite aux traitements. Le taux de Cx43 total ne varie pas de façon significative durant les traitements. ($n = 6$).*

3.5.4. Implication des PK dans l'effet du TNF- α sur les cellules TtT/GF

Lorsque les cellules TtT/GF sont exposées au TNF- α durant 30 minutes, nous avons observé la rephosphorylation de la Cx34. Une ou plusieurs PK pourraient donc être impliquées dans ce phénomène. Afin d'étudier l'implication possible de différentes protéines kinases, nous avons inhibé la PKC, la PKA ou les MEK1/2 et nous avons ensuite traité les cellules avec le TNF- α durant 15, 30 ou 60 minutes. L'inhibition de chacune de ces PK inhibe la rephosphorylation significative de la PCx43 suite à un traitement de 30 minutes avec la TNF- α (fig 23). L'inhibition de la PKC inhibe complètement la rephosphorylation de la Cx43 en Ser368. Cependant, on voit une faible hausse de la PCx43 même lorsque la PKA et les MEK1/2 sont inhibées (fig 23 c, d). La déphosphorylation significative après 15 minutes de traitement avec le TNF- α est inhibée lorsque les PKA et MEK1/2 sont inhibées.

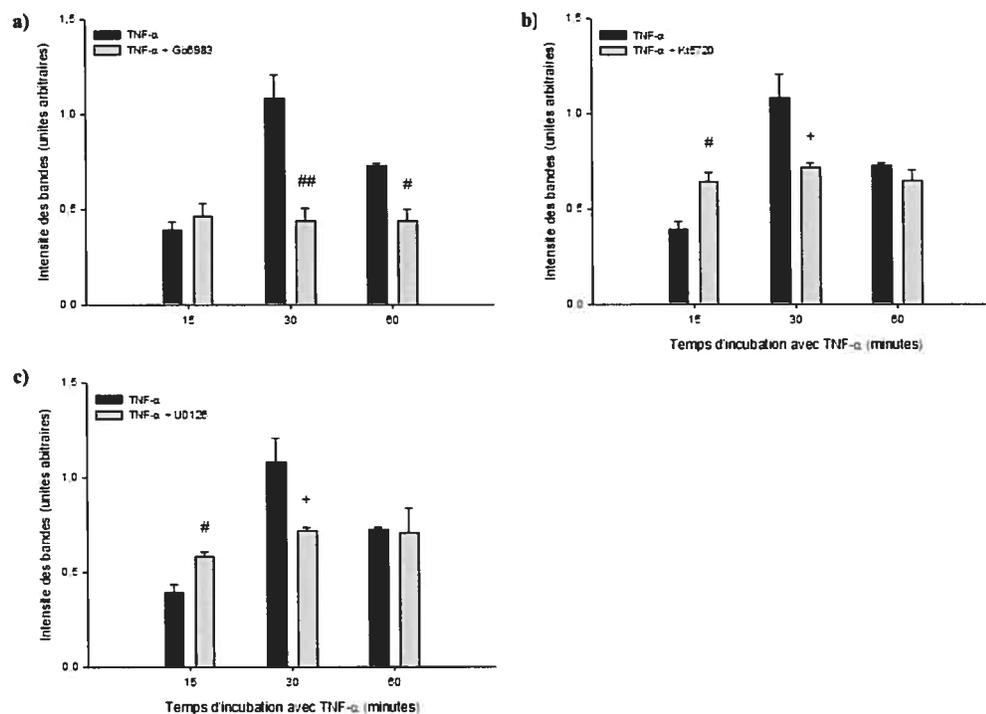


Figure 23

Figure 23. Participation de la PKC, PKA et MAPK dans les effets du TNF- α sur l'état de phosphorylation de la Cx43. Nous avons préincubé les cellules avec (bandes grises) ou sans (bandes noires) inhibiteurs de PKC (a), PKA (b) et MEK1/2 (c) durant 30 minutes. Par la suite, nous avons traité les cellules avec le TNF- α durant différents intervalles de temps. Ensuite, nous avons récupéré les cellules, nous avons préparé les homogénats et nous les avons soumis à l'électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43. Nous avons scanné les films et quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. a) L'inhibition de la PKC ne bloque pas la déphosphorylation de la PCx43 induite par un traitement avec le TNF- α durant 15 minutes. Cependant, l'inhibition de la PKC inhibe significativement la rephosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 30 et 60 minutes d'exposition au TNF- α (## = $P < 0,002$ pour inhibition de PKC et traitement avec TNF- α durant

30 minutes, # = $P < 0,02$ pour inhibition de PKC et traitement avec TNF- α durant 60 minutes. $n = 3$). b) La déphosphorylation de la Cx43 causée par le TNF- α après 15 minutes d'incubation est inhibée par l'inhibition de la PKA. La rephosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 30 minutes de traitement avec le TNF- α est significativement moindre lorsque la PKA est inhibée. (# = $P < 0,02$ pour inhibition de PKA et traitement avec TNF- α durant 15 minutes, + = $P < 0,05$ pour inhibition de PKC et traitement avec TNF- α durant 30 minutes. $n = 3$). c) La déphosphorylation de la Cx43 causée par le TNF- α après 15 minutes d'incubation est bloquée lorsque les MEK1/2 sont inhibées. La rephosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 30 minutes de traitement avec le TNF- α est significativement moindre lorsque les MEK1/2 sont inhibées. (# = $P < 0,02$ pour inhibition de MEK1/2 et traitement avec TNF- α durant 15 minutes, + = $P < 0,05$ pour inhibition de MEK1/2 et traitement avec TNF- α durant 30 minutes. $n = 3$).

3.5.5. Études sur l'interaction potentielle entre la Cx43 et la PKC ou la PP2A après traitement avec le TNF- α

Nos résultats démontrent que la PP2A et la PKC pourraient être impliquées dans les changements de l'état de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 suite à un traitement avec le TNF- α . De plus, certains chercheurs ont démontré que la PKC et la PP2A pourraient interagir avec la Cx43 de façon directe (132, 152). Afin d'étudier la possibilité d'une interaction entre la Cx43, la PP2A et/ou la PKC dans notre système, nous avons réalisé des fractionnements subcellulaires des cellules traitées avec le TNF- α afin de séparer la fraction Triton-insoluble (CK) du restant de la cellule et récupérer ainsi la Cx43 assemblée en jonctions communicantes. Par la suite, nous avons fait des Westerns blots avec

les anticorps anti-PCx43, anti-PP2A et anti-PKC. Nos résultats démontrent que la Cx43 est déphosphorylée de façon significative dans la fraction insoluble après 15 minutes de traitement avec le TNF- α (fig 24 a). Après 30 minutes, le niveau de PCx43 atteint à nouveau le niveau basal, ce qui est suivi d'une augmentation significative du taux de phosphorylation. Donc, la courbe du taux de PCx43 après une exposition à court terme des cellules TtT/GF au TNF- α suit plus ou moins la courbe du niveau de la PCx43 dans les cellules totales.

Le niveau de l'isoforme α de la PKC dans la fraction Triton-insoluble des cellules TtT/GF traitées avec le TNF- α est significativement plus élevé que dans les cellules contrôles tout au long du traitement (fig 24 b). De plus, le niveau de PP2A est aussi significativement plus élevé dans la fraction Triton-insoluble des cellules traitées que dans celle observée pour les cellules contrôles (fig 24 c).

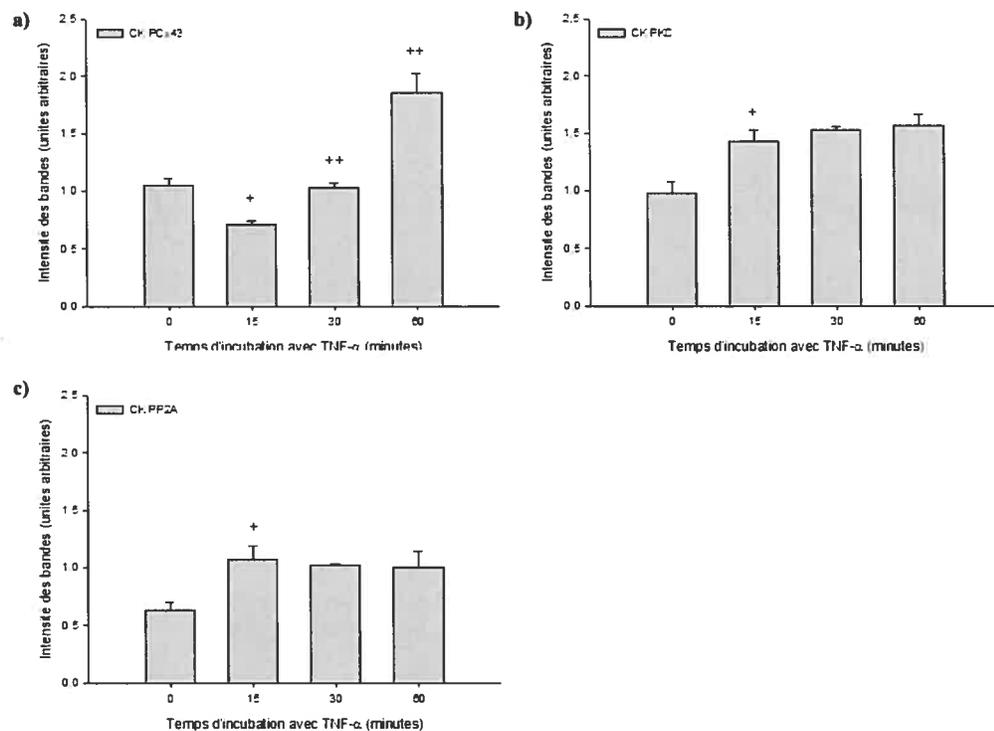


Figure 24

Figure 24. Taux de PCx43, PKC et PP2A dans la fraction Triton-insoluble des cellules TtT/GF traitées avec le TNF- α Nous avons traité les cellules avec le TNF- α durant différents intervalles de temps. Nous avons par la suite récupéré les cellules et préparé les fractions Triton-insolubles. Nous avons soumis ces fractions à une électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43, anti-PKC et anti-PP2A. Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes. Les résultats sont des moyennes de quantifications. Taux de PCx43 (a), PKC- α (b) et PP2A (c) dans la fraction Triton-insoluble suite à un traitement avec le TNF- α . a) La Cx43 est significativement déphosphorylée après 15 minutes de traitement. Après 30 minutes, le taux de PCx43 est récupéré et il est significativement plus élevé après 60 minutes de traitement. (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes de traitement comparé au contrôle, ++ = $P < 0,005$ pour 30 minutes de traitement comparé à 15 minutes, +++ = $P < 0,005$ pour 60 minutes de traitement comparé à 30 minutes. $n = 3$). b) Le taux de PKC est significativement plus élevé dans la fraction Triton-insoluble des cellules traitées durant 15 minutes comparé aux cellules contrôles. Après 30 et 60 minutes, le niveau de PKC est comparable au niveau de la protéine suite à 15 minutes de traitement. (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes de traitement comparé au contrôle. $n = 3$). c) Le taux de PP2A est significativement plus élevé dans le cytosquelette des cellules traitées durant 15 minutes comparé aux cellules contrôles. Après 30 et 60 minutes, le niveau de PP2A est comparable à son niveau après 15 minutes de traitement. (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes de traitement comparé au contrôle. $n = 3$).

Nous avons par la suite fait des Western blots avec la fraction Triton-soluble (NCK) des cellules en utilisant les mêmes anticorps. La PCx43 est

significativement déphosphorylée dans cette fraction après 15 minutes de traitement avec le TNF- α (fig 25 a). La protéine est par la suite phosphorylée à un niveau basal après 30 minutes pour ensuite être significativement déphosphorylée après 60 minutes. Le taux de PKC- α dans la fraction Triton-soluble est affecté par le TNF- α seulement après 30 minutes de traitement (fig 25, b). À cet intervalle de temps, le taux de PKC- α diminue. Le taux de PP2A augmente après 30 minutes de traitement et diminue à un niveau comparable au niveau basal après 60 minutes d'exposition au TNF- α (fig 25 c).

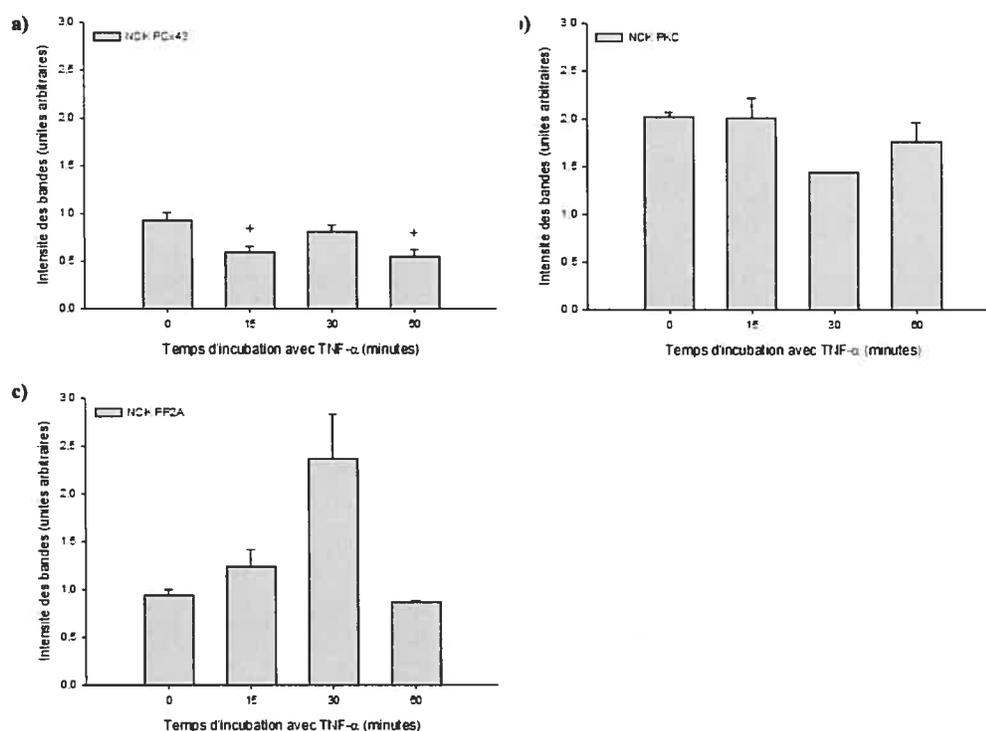


Figure 25

Figure 25. Taux de PCx43, PKC et PP2A dans la fraction Triton-soluble des cellules Tt/GF traitées avec le TNF- α . Nous avons traité les cellules Tt/GF avec le TNF- α durant différents intervalles de temps. Par la suite, nous avons récupéré les cellules et nous avons préparé les fractions Triton-solubles. Nous

avons soumis ces fractions à une électrophorèse suivie de Western blot avec anti-PCx43, anti-PKC- α et anti-PP2A. Nous avons scanné les films et nous avons quantifié l'intensité des bandes immunoréactives. Les résultats sont des moyennes de quantifications. a) La Cx43 est significativement déphosphorylée après 15 minutes de traitement. Après 30 minutes, le taux de PCx43 est revenu à son niveau basal. La Cx43 est ensuite significativement déphosphorylée après 60 minutes de traitement. (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes de traitement comparé au contrôle, + = $P < 0,05$ pour 60 minutes de traitement comparé à 30 minutes. $n = 3$). b) Le taux de PKC- α diminue suite à 30 minutes de traitement avec le TNF- α . Après 60 minutes, le niveau de PKC- α est comparable au niveau basal de la protéine. ($n = 3$). c) Le taux de PP2A augmente dans la fraction Triton-soluble des cellules traitées avec le TNF- α durant 30 minutes. Après 60 minutes, le niveau de PP2A est comparable au niveau basal de la protéine. Bien que le graphique illustre une augmentation de la PP2A entre 15 et 30 minutes et une diminution entre 30 et 60 minutes, ces changements ne sont pas statistiquement significatifs. ($n = 3$).

Nos résultats suggèrent une interaction entre la Cx43, la PKC- α et la PP2A dans la fraction Triton-insoluble suite à un traitement à court terme avec le TNF- α . Afin d'étudier cette possibilité plus en détail, nous avons réalisé des expériences de microscopie confocale. Nous avons marqué les cellules TtT/GF traitées avec le TNF- α avec des anticorps contre la Cx43 totale et la PKC- α ou la PP2A. Nos résultats démontrent que la PKC colocalise avec la Cx43 dans le cytosol et en région périnucléaire après 15 et 30 minutes de traitement avec le TNF- α (fig 26 a). Dans les cellules contrôles, la PP2A colocalise avec la Cx43

dans le cytosol, en région périnucléaire et aux contacts intercellulaires. Suite au traitement avec le TNF- α , la PP2A semble toujours colocaliser avec la Cx43 dans le cytosol, en région périnucléaire et à la membrane plasmique près des contacts intercellulaires. Cependant, après 60 minutes de traitement avec le TNF- α , nous voyons une diminution de la colocalisation (fig 26 b).

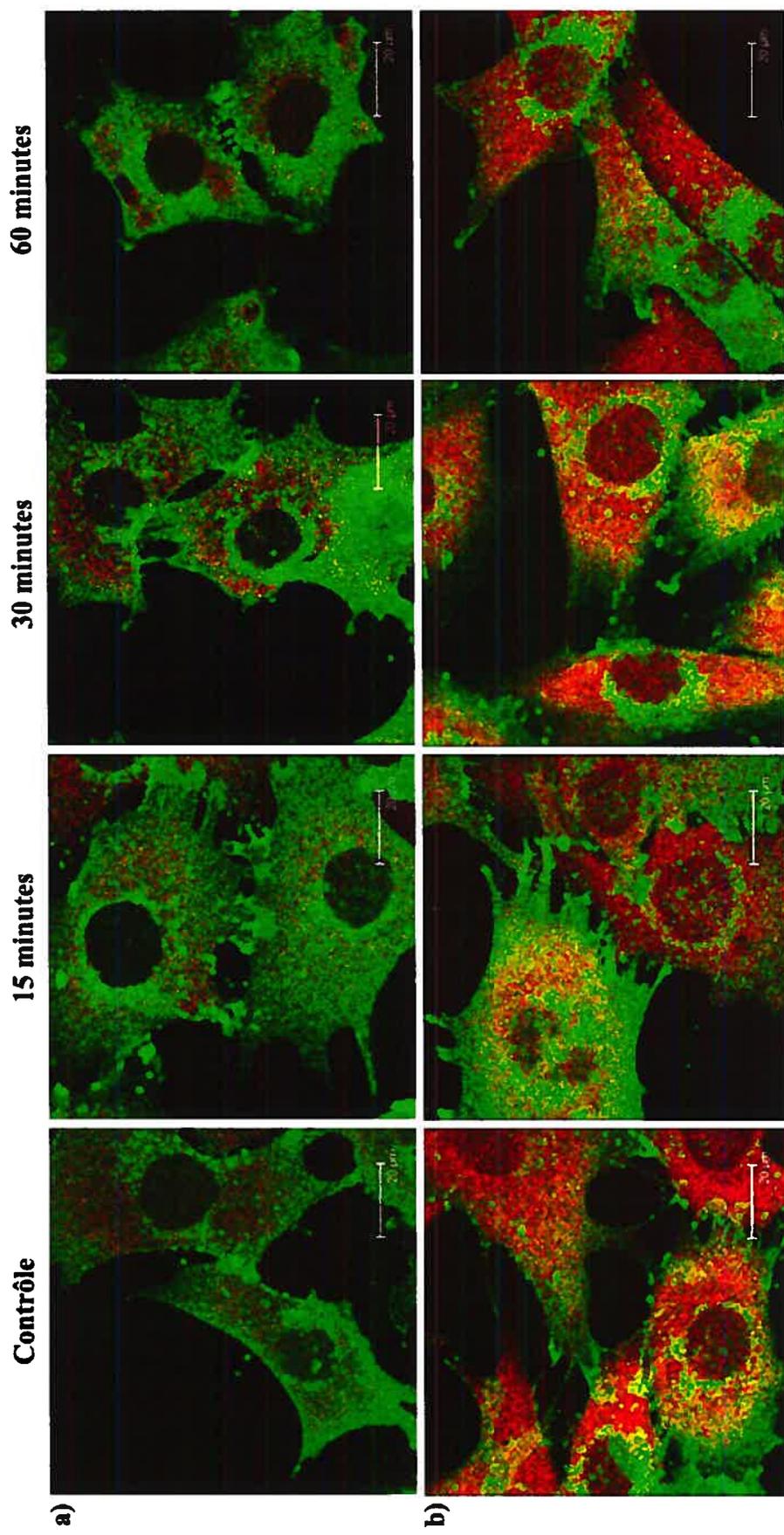


Figure 26

Figure 26. Études en microscopie confocale de la colocalisation de la Cx43 et la PKC ou PP2A. Nous avons incubé les cellules avec le TNF- α pour 15, 30 et 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été traitées pour la microscopie confocale avec des anticorps anti-Cx43 (vert) et a) anti-PKC- α (rouge) ou b) anti-PP2A (rouge). a) Dans les cellules contrôles, sur le même plan Z, la Cx43 se retrouve dans le cytosol, à la membrane plasmique, aux contacts intercellulaires et en région périnucléaire. La PKC- α est surtout cytosolique. Après 15 et 30 minutes d'exposition au TNF- α , la Cx43 et la PKC- α semblent colocaliser dans le cytosol et en région périnucléaire. b) Dans les cellules contrôles, sur le même plan Z, la Cx43 se retrouve dans le cytosol, à la membrane plasmique, aux contacts intercellulaires et en région périnucléaire. La PP2A semble colocaliser avec la Cx43. Après 15 et 30 minutes d'exposition au TNF- α , on peut voir une colocalisation de la Cx43 et la PP2A dans le cytosol, en proximité de la membrane plasmique et en région périnucléaire. La colocalisation diminue après 60 minutes de traitement.

3.5.6. Effets du TNF- α sur la CIJC

Puisque nous avons observé qu'à court terme, le TNF- α a un effet important sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368, nous avons étudié l'effet du TNF- α sur la CIJC. La communication intercellulaire diminue de façon significative suite à l'incubation avec le TNF- α (fig 27). Bien que le niveau de communication augmente après 30 minutes, il demeure significativement plus bas que le taux contrôle (fig 27 c). Après 60 minutes en présence du TNF- α , la communication intercellulaire est rétablie au niveau basal, tout comme le taux de PCx43 (fig 27 c, d).

Nos résultats de scrape-and-load démontrent une corrélation entre la déphosphorylation de la PCx43 et la diminution de la CIJC suite à un traitement avec le TNF- α . De plus, les protéines phosphatases PP1, PP2A et PP2B semblent être impliquées dans la déphosphorylation de la PCx43. Nous avons donc étudié l'implication des PP dans la diminution de la CIJC suite à un traitement de 15 minutes avec le TNF- α . Nous avons inhibé les protéines phosphatases durant les 30 minutes précédant le traitement de 15 minutes avec le TNF- α . Nos résultats démontrent que l'inhibition de la PP1 et la PP2A ensemble, la PP2A seule ou la PP2B abolit la diminution de la CIJC induite par le traitement avec le TNF- α (fig 28 a, b). Nos résultats démontrent qu'il y a une corrélation temporelle entre l'abolition de la déphosphorylation causée par le TNF- α et la diminution de la CIJC (fig 28 b, c). Donc, la diminution de la CIJC induite par un traitement à court terme avec le TNF- α semble être médiée par la déphosphorylation de la Cx43

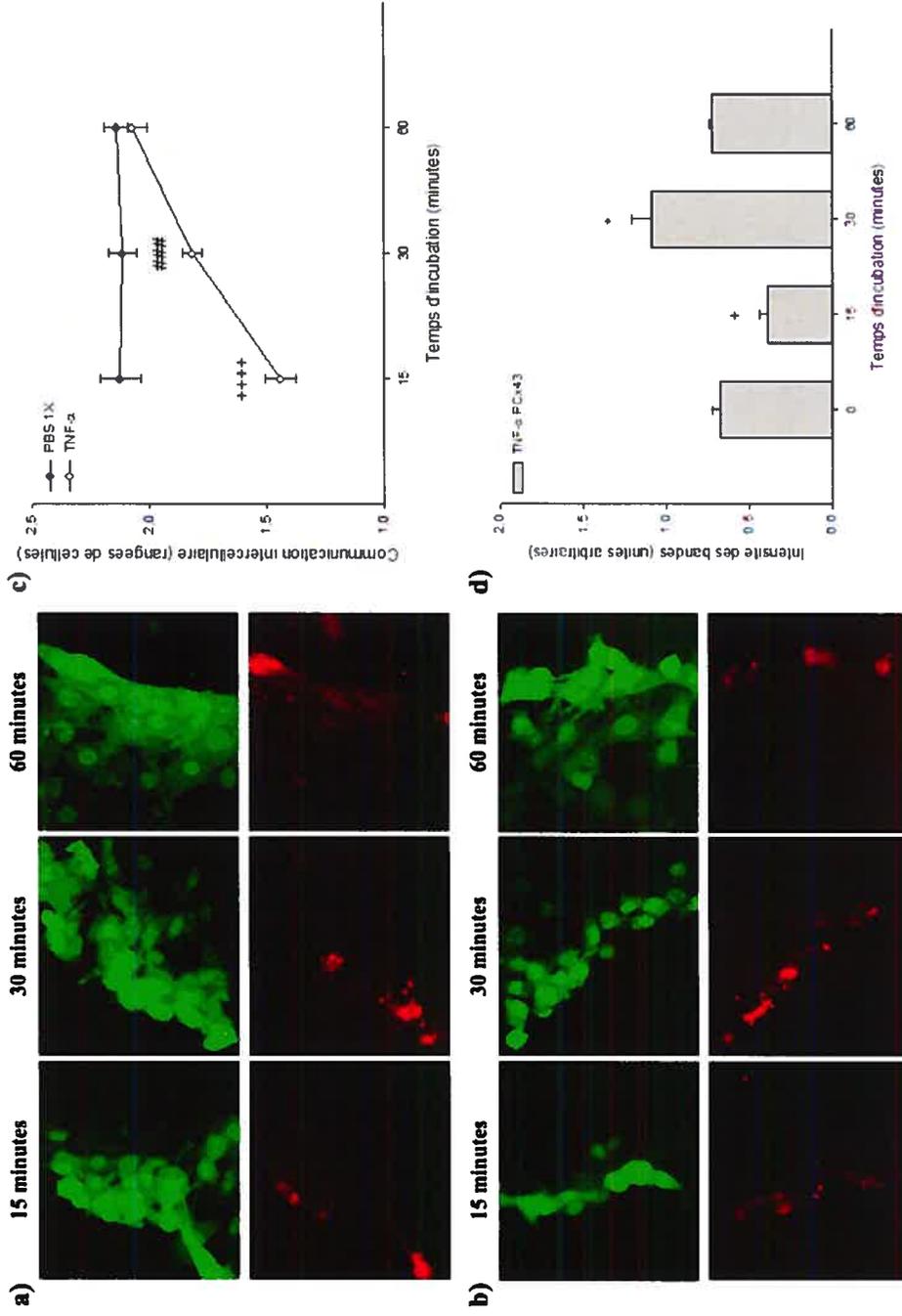


Figure 27

Figure 27. Effets du TNF- α sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage de la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées avec du PBS pendant 15, 30 et 60 minutes. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow demeure constant. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Cellules traitées avec le TNF- α durant 15, 30 et 60 minutes. La communication intercellulaire diminue après 15 minutes d'incubation. Par la suite, la communication intercellulaire est récupérée. La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. c) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape-and-load. Le nombre de rangées de cellules marquées au lucifer-yellow après 15 minutes de traitement avec le TNF- α est significativement plus bas que le nombre de rangées de cellules traitées avec le PBS. Après 30 minutes de traitement avec le TNF- α , la CIJC est récupérée, mais demeure toujours significativement plus basse que la CIJC entre les cellules traitées avec le PBS. Ce n'est qu'après 60 minutes d'incubation avec le TNF- α que la CIJC est rétablie au niveau contrôle. (++++ = $P < 0,00005$ pour les cellules traitées avec le TNF- α durant 15 minutes comparées aux cellules traitées avec le PBS, ### = $P < 0,002$, pour les cellules traitées avec le TNF- α durant 30 minutes comparées aux traitées avec le PBS. $n = 6$) d) Répétition de la figure 20 a. Taux de PCx43 après un traitement avec le TNF- α (+ = $P < 0,05$ pour 15 minutes comparé au contrôle, * = $P < 0,01$ pour 30 minutes comparé à 15 minutes. $n = 3$).

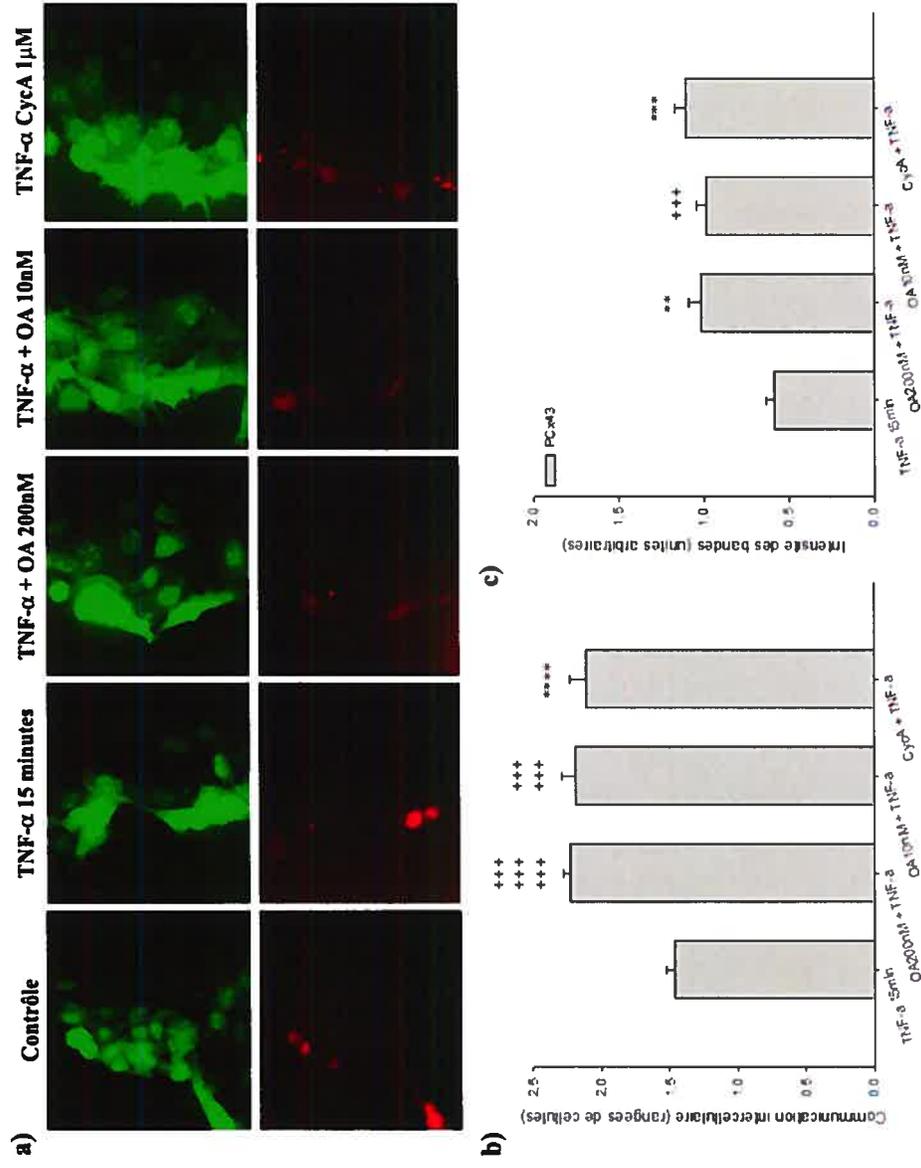


Figure 28

Figure 28. Implication des PP dans l'effet du TNF- α sur la CIJC. Nous avons mesuré la communication intercellulaire par la technique de scrape-and-load (voir Matériels et Méthodes). Le marquage au LY est en vert et le marquage de la RD est en rouge. a) Microphotographies de cellules contrôles traitées durant 15 minutes avec le TNF- α et prétraitées ou non avec les inhibiteurs de PP. Le nombre de rangées marquées au LY est moindre dans les cellules traitées avec le TNF- α durant 15 minutes que dans les cellules contrôles. L'inhibition des PP1 et PP2A, de la PP2A ou de la PP2B avant le traitement au TNF- α abolit la diminution de la communication intercellulaire causée par le TNF- α . La RD se trouve dans la première rangée de cellules où nous avons brisé le tapis cellulaire. b) Représentation graphique des résultats des expériences de scrape and load. Lorsque la PP1 et PP2A, la PP2A ou la PP2B sont inhibées, la chute dans la communication intercellulaire entre les cellules traitées avec le TNF- α durant 15 minutes est significativement bloquée. (+++++ = $P < 0,000000005$ pour les cellules prétraitées avec l'OA 200nM comparées aux cellules traitées avec le TNF- α seul, +++++ = $P < 0,0000005$ pour les cellules prétraitées avec l'OA 10nM comparées aux cellules traitées avec le TNF- α seul. **** = $P < 0,00001$ pour les cellules prétraitées avec la cyclosporine A comparées aux cellules traitées avec le TNF- α seul, $n = 8$) c) Répétition de la figure 22 a. Taux de PCx43 après un traitement avec le TNF- α durant 15 minutes avec ou sans inhibition des PP. (** = $P < 0,001$ pour prétraitement avec l'OA 200nM comparé au traitement avec le TNF- α seul, +++ = $P < 0,0005$ prétraitement avec l'OA 10nM comparé au traitement avec le TNF- α seul, *** = $P < 0,0001$ prétraitement avec la cyclosporineA comparé au traitement avec le TNF- α seul. $n = 6$).

4. DISCUSSION

L'hypophyse est une glande dont le rôle est central dans la régulation endocrine chez les mammifères. Les hormones produites par l'hypophyse ont la capacité de réguler d'autres glandes comme, par exemple, la glande thyroïde (2). Une glande maîtresse comme l'hypophyse se doit d'être dotée d'un système lui permettant de contrôler la production hormonale. Les cellules FS de l'HA pourraient jouer un rôle important dans le contrôle des fonctions hypophysaires (3). En effet, les cellules FS sont sensibles à diverses hormones et cytokines et peuvent, suite à une exposition à celles-ci, produire plusieurs molécules bioactives dont certaines cytokines (16, 204). De plus, les cellules FS forment un réseau de communication qui pourrait être indispensable pour le contrôle hormonal dans l'HA (37). Nous avons démontré que l'exposition à long terme aux cytokines proinflammatoires IL-1 β et TNF- α modifie la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF et que ce phénomène implique une modulation de l'expression et de la localisation de la Cx43 (190). Cependant, il est connu que les cytokines peuvent exercer différents effets selon leur temps d'exposition. Dans l'étude présente, nous nous sommes concentrés sur les effets à court terme des cytokines sur la communication intercellulaire entre les cellules FS. Nous avons étudié les changements de l'état de phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43, un résidu impliqué dans l'activité des JC. Nos résultats démontrent que l'IL-1 β et le TNF- α induisent une diminution rapide et transitoire de la communication intercellulaire dépendante, en partie, de la déphosphorylation de la Ser368 de la Cx43. Dans la réponse au TNF- α , ce phénomène impliquerait la PKC et la PP2A.

4.1. MODULATION BASALE DE LA CIJC ET DE LA PHOSPHORYLATION DE LA Cx43 EN SER368

Puisque les cellules de la lignée TtT/GF possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles que les cellules FS de l'HA (199), nous utilisons cette lignée comme modèle de cellules FS dans nos expériences. Tout d'abord, nous avons étudié l'implication de certaines PK dans la phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43 et dans le maintien de la CIJC dans des conditions basales.

4.1.1. La PKC est impliquée dans le maintien de la perméabilité des JC et de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368

Nos résultats montrent un lien étroit entre l'activité de la PKC et le maintien d'un niveau de communication intercellulaire basal. Nos expériences de scrape-and-load démontrent une chute significative de la CIJC lors de l'inhibition de la PKC. Cette chute semble être étroitement liée à la diminution de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 puisque l'inhibition de la PKC avec l'inhibiteur Gö6983 induit une chute rapide de la forme PCx43. En effet, après seulement 5 minutes d'exposition à l'inhibiteur, on voit une diminution significative de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368. La phosphorylation n'est pas récupérée, même après 60 minutes.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de l'effet inhibiteur de la déphosphorylation de la Cx43 sur l'activité des jonctions intercellulaires (54, 205). Cependant, nos études sur le rôle de la PKC dans l'activité des JC nous indiquent que l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et le fonctionnement de la JC est loin d'être simple. En effet, nous avons trouvé que la stimulation de

la PKC avec le PMA, un stimulateur de PKC, induit une augmentation rapide et soutenue de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368, un effet évidemment attendu. Cependant, nos études sur l'effet de la stimulation de la PKC sur la communication intercellulaire ont démontré que la relation entre la phosphorylation de la Ser368 et l'activité des JC est différente selon le temps d'exposition des cellules à l'activateur de la PKC. À des temps de stimulation très courts, le PMA augmente la phosphorylation de la Ser368 et la communication intercellulaire. Par contre, lors de traitements plus longs, la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 est accompagnée de la diminution de la communication intercellulaire. Donc, le même effet sur l'état de la phosphorylation de la Cx43 est accompagné de deux effets opposés sur la communication intercellulaire. Ces résultats mettent en évidence l'importance du facteur « temps » dans l'étude des effets des cytokines.

De plus, ces résultats démontrent qu'il existe un équilibre délicat entre l'activité de la PKC, la phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43 et la CIJC. Une activité minimale de la PKC serait nécessaire afin de garder un niveau adéquat de PCx43, permettant ainsi aux JC d'être fonctionnelles dans des conditions basales. Une phosphorylation basale de la Ser368 par la PKC semble nécessaire pour le maintien de la CIJC (142). Par contre, il est possible qu'une phosphorylation excessive ou trop prolongée induise un changement de conformation de la Cx43 qui se reflète par une diminution de la CIJC (149). Il est aussi possible qu'un traitement prolongé avec le stimulateur de PKC induise la phosphorylation d'autres acides aminés dans la molécule de Cx43 qui ne soit pas détectée par l'anticorps que nous avons utilisé dans nos études. Le fait que nos résultats montrent une corrélation entre l'état de phosphorylation de la Cx43 et

l'activité des CIJC suite aux manipulations de la PKC appuie la notion que la PKC pourrait interagir directement avec la Cx43 (206).

4.1.2. La PKA est impliquée dans le maintien de la perméabilité des JC et de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368

La stimulation de la PKA par la FK ne cause pas de changement significatif dans la CIJC et le taux de phosphorylation de la Cx43 en Ser368. Cependant, l'inhibition de la PKA par le Kt5720 induit un effet biphasique sur l'activité de CIJC. Tout d'abord, après 5 minutes d'exposition à l'inhibiteur, on voit une diminution significative de la CIJC, bien que la PCx43 soit toujours à un niveau normal. Par la suite, la CIJC est récupérée à un niveau comparable au niveau basal tandis que la PCx43 est significativement déphosphorylée. Finalement, après 60 minutes d'exposition, la CIJC diminue parallèlement à la déphosphorylation de la PCx43.

Le résidu cible de la PKA dans la Cx43 est la Ser364 (207). Avec l'anticorps que nous utilisons, qui est dirigé contre la Cx43 phosphorylée en Ser368, nous ne pouvons pas détecter si le résidu Ser364 est affecté. De plus, il n'est pas encore connu si la PKA phosphoryle la Cx43 directement ou si elle agit via l'activation d'une autre PK (207). La PKA doit donc jouer un rôle indirect dans le maintien de la phosphorylation de la Cx43 en Ser368. La stimulation de la PKA n'affecte pas la phosphorylation du résidu Ser368 dans la Cx43. Par contre, l'inhibition de l'enzyme conduit à la perte de la phosphorylation de cet acide aminé. Il est possible que la PKA agisse sur un intermédiaire qui contrôle l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368.

Il est aussi possible que la PKA et la PKC agissent de façon séquentielle : la phosphorylation de la Ser364 par la PKA pourrait permettre une phosphorylation de la Ser368 par la PKC (142). La déphosphorylation de la PCx43 observée lors de l'inhibition de la PKA pourrait être due à l'incapacité de la PKC de phosphoryler la Ser368 quand la Ser364 n'est pas phosphorylée. Puisque la PKA peut aussi phosphoryler et activer l'Inhibiteur-1, un inhibiteur de PP1 (153), et que la PP1 interagit avec la Cx43 (152), l'inhibition de la PKA pourrait induire une activation de la PP1 et donc une déphosphorylation de la Cx43. Nous avons démontré que la déphosphorylation de la PCx43 par l'inhibition de la PKC induit une perte de la communication intercellulaire. Puisque nous ne voyons pas la même corrélation lors de l'inhibition de la PKA, il s'ensuit que l'inhibition de cette PK a des effets sur d'autres régions de la Cx43 ou sur d'autres molécules pouvant interagir avec la Cx43 sans affecter la communication intercellulaire.

4.1.3. Les ERK1/2 pourraient jouer un rôle dans le maintien de la phosphorylation basale de la Cx43 en Ser368

L'inhibition des MEK1/2 par le U0126 induit la déphosphorylation de la PCx43 après 30 minutes d'incubation. La protéine est ensuite rephosphorylée. Ces résultats indiquent que la voie MAPK pourrait être impliquée dans le maintien de la phosphorylation du résidu Ser368 de la Cx43. Cependant, vu la variation minime de l'état de phosphorylation de ce résidu lorsque comparé à la variation lors de l'inhibition de la PKC ou la PKA, il est possible que la voie MAPK soit une voie secondaire. Puisque la voie MAPK induit la phosphorylation d'une panoplie de protéines (révisé dans (202)), il est possible qu'un des substrats de la

MAPK agit sur l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43. De plus, il est connu que les MEK phosphorylent et activent certaines PP (208). Chose certaine, l'effet des ERK1/2 sur l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 est indirect puisque les ERK1/2 phosphorylent les résidus Ser255, Ser279 et Ser282 (136, 209, 210).

4.2. IMPACT À COURT TERME DU TNF- α SUR LA COMMUNICATION

INTERCELLULAIRE ENTRE LES CELLULES TtT/GF

4.2.1. Le TNF- α induit une diminution rapide et transitoire de la CIJC

Le TNF- α est produit en grande partie par des monocytes activés (211). Il s'agit d'une cytokine proinflammatoire pléiotrope puisqu'elle a plusieurs effets qu'elle exerce sur plusieurs types de cellules. Lors d'une réponse inflammatoire, le TNF- α est la première cytokine à se retrouver dans la circulation sanguine (193). Le TNF- α se retrouve sous forme soluble, ancré à la surface membranaire ou fixé aux récepteurs du TNF- α (revue dans (192)). Dans l'hypophyse, le TNF- α induit une modulation de la production d'ACTH, de PRL, de GH et de TSH (165). Les cellules FS de l'HA sont sensibles au TNF- α et produisent l'IL-6 suite à une stimulation. Les cellules FS et TtT/GF possèdent des récepteurs au TNF- α de type I (194).

La CIJC et la Cx43 sont affectées par le TNF- α . Cependant, l'effet de la cytokine sur la CIJC et sur la modulation de la Cx43 semble dépendre du type de cellules étudié et du temps d'exposition à la cytokine (196, 203, 212). Le but de notre projet était d'étudier l'effet à court terme des cytokines sur la CIJC et d'évaluer s'il y a un phénomène cause/effet entre la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 et la communication intercellulaire. Pour se faire, nous avons exposé

les cellules TtT/GF, notre modèle de cellules FS, à une concentration finale de TNF- α de 20 ng/mL durant 15, 30 ou 60 minutes. Nos résultats d'expériences de scrape-and-load indiquent que le TNF- α induit une diminution rapide de la CIJC. Après 15 minutes de traitement, le niveau de CIJC est significativement plus bas dans les cellules traitées que dans les cellules contrôles. Cette diminution est transitoire puisqu'après 30 minutes de traitement, le niveau de CIJC remonte. Cependant, la CIJC n'est rétablie à un niveau normal qu'après 60 minutes de traitement.

Nos résultats confirment, à travers les cellules TtT/GF, que les cellules FS de l'HA sont sensibles au TNF- α . De plus, nos résultats indiquent que le TNF- α a la capacité de moduler la CIJC à court terme. Cette modulation de la CIJC pourrait être importante dans le contrôle de la sécrétion hormonale hypophysaire. Les cellules FS forment un circuit dans l'HA permettant à l'information d'être transférée à l'intérieur de l'hypophyse (30). Ce réseau d'intercommunication faciliterait la synchronisation et la communication entre les différentes parties de l'hypophyse (38). Les résultats de nos expériences sur la CIJC indiquent que le TNF- α module le fonctionnement de la CIJC et que cette modulation peut se produire à l'intérieur d'un délai très bref. Lors d'une inflammation, le TNF- α pourrait agir comme modulateur de la sécrétion hormonale via la modulation de la CIJC entre les cellules FS de l'HA.

4.2.2. La diminution de la CIJC suite à un traitement avec le TNF- α corrèle avec la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368

L'étape suivante du projet était d'évaluer la corrélation potentielle entre l'effet du TNF- α sur la CIJC et l'état de phosphorylation de la Cx43. Pour ce

faire, nous avons soumis les cellules TtT/GF au même traitement que pour les expériences d'évaluation de la communication intercellulaire. Par la suite, nous avons fait des Western blots avec deux anticorps : un anticorps dirigé contre la PCx43 et un autre dirigé contre la Cx43 totale. Suite à 15 minutes de traitement avec le TNF- α , la PCx43 est significativement déphosphorylée. Après 30 minutes, la phosphorylation de la Cx43 en Ser368 est récupérée. Le taux total de Cx43 n'est pas affecté par le traitement, ce qui prouve que la diminution de la PCx43 est due à la déphosphorylation de la protéine et non à sa dégradation. La déphosphorylation et rephosphorylation de la Cx43 induites par le TNF- α sont concomitantes à la diminution/récupération de la communication intercellulaire causée par la cytokine. Ces résultats démontrent que l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 pourrait être, du moins en partie, responsable des effets à court terme du TNF- α sur la communication intercellulaire dans les cellules FS.

4.2.3. Participation des PP et des PK dans l'effet du TNF- α sur la CIJC et sur la phosphorylation de la Cx43 en Ser368

Puisque le TNF- α induit initialement la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 dans nos conditions expérimentales, nous avons étudié l'implication de différentes PP dans la modulation de la phosphorylation de la Cx43 suite au traitement avec cette cytokine. Nous avons prétraité les cellules TtT/GF avec des inhibiteurs de différentes PP. Afin d'inhiber les PP1 et PP2A, nous avons utilisé l'acide okadaïque à une concentration finale de 200nM et à une concentration finale de 10nM afin d'inhiber uniquement la PP2A. De plus, nous avons traité les cellules avec la cyclosporine A afin d'inhiber la PP2B. Nos résultats démontrent que la PP2A, la PP2B et possiblement la PP1 bloquent l'effet du TNF- α sur l'état

de phosphorylation de la Cx43 et donc ces phosphatases seraient impliquées dans la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 induite par le TNF- α . De plus, les expériences de scrape-and-load indiquent que lorsque ces PP sont inhibées, la diminution de la CIJC par le TNF- α est aussi inhibée.

Ces résultats démontrent qu'à court terme, le TNF- α diminue la CIJC via la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 suite à l'activation des voies de signalisation impliquant la PP2A, la PP2B et possiblement, la PP1.

La déphosphorylation de la Cx43 induite par l'exposition à court terme au TNF- α est suivie par la rephosphorylation de la Cx43 en Ser368. Ceci indique qu'une ou plusieurs PK sont activées afin de rétablir le taux de phosphorylation de la Cx43. Par conséquent, nous avons cherché quelles étaient les PK qui pourraient être impliquées dans ce phénomène. Nous avons prétraité les cellules TtT/GF avec des inhibiteurs spécifiques de PKA, de PKC et de MEK1/2 avant de soumettre les cellules à un traitement au TNF- α . En plus du fait que la PKC est importante dans le maintien d'un taux basal de phosphorylation de la Cx43 en Ser368, nos résultats indiquent que la PKC joue un rôle dans la rephosphorylation de la Cx43 après un traitement avec le TNF- α . La PKA et les MEK1/2 pourraient influencer la déphosphorylation de la Cx43 en Ser368 médiée par le TNF- α .

Puisqu'il est impossible durant le cours d'une maîtrise d'étudier en détail toutes les molécules impliquées dans une voie de signalisation, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la participation de la PP2A et de la PKC dans les voies de signalisation activées par l'exposition des cellules au TNF- α . Nous avons entrepris des expériences d'immunofluorescence afin d'analyser les compartiments subcellulaires où la déphosphorylation de la Cx43 avait lieu. Dans des conditions contrôles, la Cx43 phosphorylée en Ser368 est principalement

associée à la membrane plasmique et aux régions de contact entre les cellules. Par contre, la Cx43 non-phosphorylée en Ser368 s'accumule dans la région périnucléaire, ce qui est en accord avec la proposition que la phosphorylation de la Cx43 se produit à la membrane plasmique ou lorsqu'elle est en route vers la membrane (213). Le traitement au TNF- α cause la diminution du marquage dans la région membranaire et cytosolique. La rephosphorylation de la Cx43 en Ser368 après 30 minutes de traitement a lieu surtout à la membrane plasmique et aux endroits de contacts intercellulaires. Nous avons étudié ce phénomène de plus près. La littérature indique que les molécules de Cx43 qui forment des JC demeurent insolubles dans le Triton X-100 1% (77). Les résultats de nos Western blots démontrent que la PCx43 est significativement déphosphorylée dans les fractions Triton X-100-insolubles et Triton X-100-solubles après 15 minutes d'exposition au TNF- α , ce qui confirme nos résultats d'immunofluorescence. Par contre, la rephosphorylation de la Cx43 a lieu préférentiellement dans la fraction Triton X-100-insoluble, c'est-à-dire, dans les molécules de Cx43 associées aux JC.

Puisque la Cx43 est déphosphorylée et rephosphorylée suite au traitement au TNF- α , les molécules de Cx43 doivent interagir avec des phosphatases et/ou des kinases. Nos études sur la distribution de la PP2A et la PKC dans ces fractions sous-cellulaires montrent que dans la fraction Triton X-100-insoluble, le niveau de PP2A active (sous-unité catalytique) augmente significativement après 15 minutes de traitement et demeure plus élevé durant tout le traitement au TNF- α que dans les cellules contrôles. Cette augmentation de la « quantité » de PP2A pourrait expliquer la déphosphorylation de la Cx43 assemblée en JC après 15 minutes de traitement avec le TNF- α . En effet, il est connu qu'une des façons

« d'activer » les phosphatases est d'augmenter l'association de la sous-unité catalytique avec les cibles potentielles (voir introduction).

Cependant, nous avons aussi observé une augmentation significative de la PKC- α dans la fraction Triton X-100-insoluble après 15 minutes d'exposition au TNF- α . Le niveau de PKC reste élevé durant toute l'expérience. La PKC phosphoryle directement la Cx43 en Ser368 (127). Le fait que le niveau de PKC augmente après 15 minutes de traitement avec le TNF- α mais que le niveau de PCx43 augmente après 30 minutes semble contradictoire. Puisque la PP2A pourrait être requise pour la déphosphorylation des substrats de la PKC (214) et que la PP2A pourrait interagir avec la Cx43 (152), il est possible que dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la PP2A induise une déphosphorylation transitoire de la Cx43 en Ser368. La PP2A pourrait agir plus rapidement ou avoir plus d'accessibilité à la Cx43 que la PKC, ce qui expliquerait le délais dans l'action de la PKC. Ce délai peut aussi être expliqué par le fait que la PP2A pourrait agir comme inhibiteur de PKC (157). Puisque la PKC déphosphorylée est inactive, nos résultats indiquent que le TNF- α a un effet direct sur les JC déjà formées et que cet effet implique au moins la PP2A et la PKC.

En réponse à une stimulation extracellulaire, la PKC peut être transportée d'un compartiment sous-cellulaire à un autre (215). De plus, la PKC colocalise souvent avec son substrat (216). Lors d'expériences de microscopie confocale, nous voyons une colocalisation de la PKC et de la Cx43 suite à un traitement des cellules TtT/GF avec le TNF- α durant 15 et 30 minutes. Il semblerait que la PKC est recrutée à la membrane plasmique après un traitement avec le TNF- α . La PP2A colocalise avec la Cx43 en région périnucléaire et près de la membrane plasmique dans les conditions contrôles et après 15 et 30 minutes d'exposition au

TNF- α . Il semblerait qu'un traitement à court terme avec le TNF- α induit une déphosphorylation de la PCx43 par la PP2A et que la Cx43 est ensuite rephosphorylée par la PKC. Afin de clarifier l'interaction de la PKC et la PP2A avec la Cx43, nous faisons présentement des expériences d'immunoprécipitation.

4.3. IMPACT À COURT TERME DE L'IL-1 β SUR LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE ENTRE LES CELLULES TtT/GF

4.3.1. L'IL-1 β induit une diminution rapide et transitoire de la CIJC

L'IL-1 β est une cytokine proinflammatoire qui joue un rôle important dans la réponse aux infections (217). Des expériences d'ELISA ont démontré que dans conditions physiologiques, l'IL-1 β peut se trouver dans l'HA (218). De plus, l'IL-1R, le récepteur de l'IL-1 β , est distribué de façon homogène dans l'HA (219). L'IL-1 β module la sécrétion hormonale hypophysaire, en particulier, la sécrétion d'ACTH et de FSH (49, 165, 187, 220, 221). L'effet qu'exerce l'IL-1 β sur la sécrétion hormonale se ferait via les cellules FS. En réponse à l'IL-1 β , les cellules FS sécrètent l'IL-6, une cytokine antiinflammatoire qui module la sécrétion hormonale (187, 222). De plus, l'IL-1 β induit des changements dans la CIJC, un phénomène qui serait central à la réponse des cellules à la cytokine. L'effet de l'IL-1 β sur la CIJC dépend du temps d'exposition des cellules à la cytokine ainsi que du type cellulaire étudié (188, 212). Dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'une incubation de plus d'une heure avec l'IL-1 β induit une augmentation du niveau de CIJC et du turnover de la Cx43 (203). Nous avons poursuivi l'étude en étudiant l'effet de l'IL-1 β à court terme sur la CIJC entre les cellules TtT/GF.

Lorsque les cellules TtT/GF sont exposées à l'IL-1 β durant des temps courts, la communication intercellulaire diminue de façon rapide et transitoire, ce qui démontre que l'IL-1 β a des effets différents sur la CIJC entre les cellules TtT/GF selon le temps d'exposition. Une exposition de courte durée induit une diminution de la communication cellulaire, qui est récupérée par la suite. À des temps d'exposition au-delà de 60 minutes, le niveau de CIJC est augmenté d'avantage (203). Puisqu'à des temps d'incubation plus longs l'augmentation de la CIJC reflète une modulation de la synthèse et de la dégradation de la Cx43 (190), nous nous sommes penché sur l'étude des changements de l'état de phosphorylation de la Cx43 dans les effets à court-terme de l'IL-1 β .

4.3.2. La diminution de la CIJC et l'état de phosphorylation de la Cx43

Afin d'établir s'il y avait une corrélation entre la diminution de la CIJC et l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43, nous avons traité les cellules avec l'IL-1 β et évalué le taux de phosphorylation de la Cx43 avec un anticorps contre la PCx43. Nous avons observé une diminution du taux de phosphorylation de la protéine après 30 minutes d'exposition à l'IL-1 β . La phosphorylation était ensuite récupérée après 60 minutes d'incubation. Tout au long de l'expérience, le niveau de Cx43 total n'a pas varié de façon significative. Nous pouvons donc affirmer qu'une exposition à court terme à l'IL-1 β induit la déphosphorylation transitoire de la Cx43 en Ser368.

Par la suite, nous avons étudié l'implication de certaines PK dans la rephosphorylation de la Cx43 suite au traitement avec l'IL-1 β . Nous avons inhibé la PKC, la PKA ou les MEK1/2 avant de traiter les cellules TtT/GF avec l'IL-1 β . D'après nos résultats de Western blot, la PKC serait impliquée dans la

rephosphorylation de la Ser368 après 60 minutes de traitement. L'inhibition de la PKA précédant le traitement avec l'IL-1 β inhibe complètement la déphosphorylation de la Cx43 causée par l'IL-1 β . Les MEK1/2 n'affectent pas significativement la déphosphorylation initiale et la rephosphorylation de la Cx43 en Ser368 induites par l'IL-1 β .

À l'aide d'immunofluorescence, nous avons analysé la localisation intracellulaire de la PCx43 durant le traitement à l'IL-1 β . Dans les cellules contrôles, la PCx43 se retrouve surtout à la membrane plasmique aux endroits de contacts cellulaires et en région périnucléaire. Lors d'une exposition de 30 minutes à l'IL-1 β , le marquage disparaît pratiquement de la membrane plasmique. Après 60 minutes de traitement, la PCx43 réapparaît en région périnucléaire et à la membrane plasmique. Nos résultats démontrent qu'un traitement à l'IL-1 β induit principalement la déphosphorylation transitoire de la PCx43 associée à la membrane plasmique et aux contacts intercellulaires.

Pris ensemble, ces résultats démontrent que l'IL-1 β induit une réponse rapide dans les cellules FS. L'IL-1 β peut affecter le fonctionnement des JC en aussi peu que 15 minutes. À un temps si court, il semblerait qu'un mécanisme autre que l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 entre en jeu afin d'induire une diminution de la CIJC. Cependant, lors d'un traitement de 30 minutes avec l'IL-1 β , le niveau de PCx43 chute significativement et la CIJC n'est toujours pas rétablie. Nos résultats indiquent que la PKA et la PKC joueraient un rôle central dans les changements de l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 induits par l'IL-1 β . En effet, il a été rapporté que la PKA est impliquée dans le maintien de la phosphorylation basale de la Cx43 possiblement via la phosphorylation de la Ser364, induisant un changement conformationnel

permettant à la PKC de phosphoryler la Ser368. De plus, la PKA et la PKC sont tous deux impliquées dans le maintien de la perméabilité basale des JC (142). Vu la relation étroite entre ces PK et la déphosphorylation tardive de la Cx43 suite à un traitement avec l'IL-1 β , il est possible que l'IL-1 β inhibe la PKA. L'incapacité de la PKA de phosphoryler la Cx43 induirait une diminution rapide de la CIJC et l'inaccessibilité de la Ser368 à la PKC. Ceci entraînerait une diminution de la forme PCx43 et possiblement le maintien de la CIJC diminuée puisqu'une phosphorylation basale de la Ser368 semble être importante pour le fonctionnement de la JC (75).

Cependant, plusieurs chercheurs affirment que l'IL-1 β active la PKA et la PKC (223, 224). Nous pouvons avancer une deuxième hypothèse. Si dans notre modèle l'IL-1 β active la PKA, il est possible que la PKA, à son tour, active une PP. En particulier, la PKA pourrait activer la PP2B (161). De même, la PKC activée pourrait à son tour activer une PP, soit la PP2A (158). De cette manière, les PP auraient comme effet de déphosphoryler la Ser368 de la Cx43. De plus, cette hypothèse pourrait expliquer la diminution rapide de la CIJC sans la diminution de la PCx43 après 15 minutes d'exposition à l'IL-1 β . La PKA active aurait comme signal d'activer la PP2B au lieu de phosphoryler la Cx43 en un résidu autre que la Ser368, entraînant ainsi un manque de phosphorylation d'un résidu important pour la perméabilité basale de la JC.

4.4. IMPACT À COURT TERME DE L'IFN- γ

4.4.1. L'IFN- γ induit une diminution de la CIJC

L'IFN- γ est une cytokine de classe Th1 (cytokine produite par les cellules Th1). Elle agit généralement sur les macrophages, induisant la production de plusieurs cytokines dont l'IL-1 β (225). L'IFN- γ agirait sur les cellules de l'HA. Des recherches démontrent que lors de l'exposition de cellules de culture primaire d'HA à l'IFN- γ , la sécrétion d'ACTH, de GH et de PRL est diminuée (226). Cet effet semble dépendre de la présence de cellules FS puisque dans les populations de cellules primaires ayant très peu de cellules FS, l'effet négatif de l'IFN- γ sur la sécrétion hormonale ne se manifeste pas (174). L'IFN- γ pourrait donc jouer un rôle dans la régulation paracrine intrahypophysaire via les cellules FS. Puisque les cellules FS forment un réseau de communication via les jonctions communicantes et que cette communication est essentielle pour le contrôle de la sécrétion hormonale, nous avons évalué l'effet de l'IFN- γ sur la CIJC entre les cellules FS.

Nos résultats d'expériences de scrape-and-load démontrent que l'exposition des cellules FS à l'IFN- γ durant 15 minutes induit la diminution de la CIJC en comparaison aux cellules contrôles. Bien que la CIJC soit récupérée après 30 et 60 minutes d'exposition à la cytokine, le niveau de CIJC entre les cellules traitées demeure inférieur à celui des cellules contrôles. Ces résultats confirment que l'IFN- γ affecte les cellules FS. De plus, ces résultats nous offrent une preuve que l'IFN- γ a un effet négatif, rapide et transitoire sur la CIJC entre les cellules FS.

4.4.2. La diminution de la CIJC par l'IFN- γ ne dépend pas des changements de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368

Nous avons ensuite étudié le lien entre l'état de phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 et la diminution de la CIJC puisque nos résultats précédents ont démontré une corrélation entre l'état de phosphorylation de cet acide aminé et le niveau de CIJC. Cependant, nous n'avons trouvé aucune fluctuation significative de la PCx43. De plus, nos résultats démontrent qu'à court terme, l'IFN- γ n'a aucun effet sur la distribution de la PCx43. Il en découle donc que l'effet de l'IFN- γ sur la communication intercellulaire ne se fait pas par un changement de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 ni par un changement dans la localisation intracellulaire de cette forme phosphorylée.

Puisque nous ne pouvions évaluer que la phosphorylation de la Cx43 spécifiquement sur le résidu Ser368, il ne nous est pas possible d'évaluer une phosphorylation dans d'autres résidus de la Cx43. Il est possible que l'IFN- γ active une voie de signalisation impliquée dans la phosphorylation ou la déphosphorylation d'un résidu autre que la Ser368 causant ainsi une perturbation dans les jonctions communicantes et la CIJC. De plus, bien qu'il soit clair que les JC dans les cellules TtT/GF contiennent la Cx43, nous ne savons pas si les Cxons sont hétéromériques ou homomériques. Il est donc possible que la Cx43 ne soit pas impliquée dans la réponse à court terme des cellules FS à l'IFN- γ .

Bien que l'IFN- γ soit synthétisé dans l'HA et qu'il agisse sur les cellules FS (révisé dans (164)), son mécanisme d'action reste inconnu. Cependant, dans d'autres types cellulaires, l'IFN- γ peut activer diverses PK (227). L'effet de l'IFN- γ sur la communication cellulaire pourrait donc impliquer, entre autre, la PKC ou la PKA.

5. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons démontré que les cellules FS de l'HA peuvent réagir de façon très rapide à un stimulus pro-inflammatoire. L'exposition des cellules TtT/GF au TNF- α , à l'IL-1 β ou à l'IFN- γ induit une diminution rapide et transitoire de la CIJC, ce qui nous permet de suggérer que les cellules FS seraient un élément important dans la régulation de la sécrétion hormonale hypophysaire via leur capacité de communication intercellulaire. De plus, nos résultats démontrent que la Ser368 de la Cx43, bien qu'importante dans le fonctionnement des canaux des JC (149, 228), n'est pas le seul résidu qui pourrait être phosphorylé afin de réguler la CIJC puisqu'un traitement à court terme avec l'IFN- γ induit une diminution significative de la CIJC sans altérer l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 ni sa localisation intracellulaire.

La réponse des cellules FS lors d'une inflammation semble impliquer une panoplie de PK et de PP. En réponse à une exposition à l'IL-1 β , la Cx43 est déphosphorylée rapidement à la membrane plasmique indiquant que l'IL-1 β pourrait agir sur la Cx43 déjà assemblée en jonctions. La déphosphorylation de la Cx43 suite à une exposition à l'IL-1 β dépendrait de la PKA et des ERK1/2, mais ces PK auraient un rôle indirect possiblement via l'activation des PP (161, 208). Cependant, l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 n'est pas le seul facteur sur lequel dépend la diminution de la CIJC suite à une exposition des cellules FS à l'IL-1 β puisque le niveau de CIJC diminue initialement sans qu'il y ait de modification dans la phosphorylation de la Ser368. Tout de même, la déphosphorylation de la Cx43 semble empêcher la récupération de la CIJC.

La réponse des cellules FS au TNF- α est semblable à leur réponse à l'IL-1 β . Cependant, la déphosphorylation de la PCx43 suite à une exposition au TNF-

α est beaucoup plus rapide comparée à la déphosphorylation lors d'un traitement avec l'IL-1 β . La déphosphorylation de la Cx43 lors d'une exposition à court terme au TNF- α implique la PP2A, la PP2B et possiblement la PP1. De plus, ces PP sont impliquées dans la diminution de la CIJC via la déphosphorylation de la Cx43.

La déphosphorylation de la PCx43 suite au traitement avec le TNF- α semble être concentrée dans la fraction Triton X-100-insoluble des cellules TtT/GF, une fraction où l'on retrouve les JC assemblées en plaques. Nos résultats démontrent que la PP2A et la PKC sont impliquées dans le changement de l'état de phosphorylation de la Cx43 en Ser368 dans les cellules FS suite à une exposition à court terme au TNF- α .

Nous entreprenons présentement des expériences d'immunoprécipitation afin de clarifier l'interaction entre la Cx43, la PP2A et la PKC. Il serait intéressant, par la suite, d'étudier l'interaction d'autres PK et PP avec la Cx43 ainsi que les changements de l'état de phosphorylation d'autres résidus de la Cx43. Finalement, des expériences nous permettant de voir les changements conformationnels des JC suite à tous ces stimuli offriraient une perspective importante dans la compréhension de la communication intercellulaire entre les FS de l'HA.

RÉFÉRENCES

1. **Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ** 1989 *Histology A Text and Atlas*. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins
2. **Allen MB, Mahesh VB** 1977 *The Pituitary A Current Review*. Symposium on the Pituitary, Medical College of Georgia, 1976. New York: Academic Press
3. **Imura H** 1994 *The Pituitary Gland*. 2 ed. New York: Raven Press
4. **Berne RM, Levy MN** 2000 *Principles of Physiology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby
5. **Burger HG, Loriaux DL, Marshall JC, Melmed S, Odell WD, Potts JTJ, Rubenstein AH** 2001 *Endocrinology*. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company
6. **Rinehart JF, Farquhar MG** 1953 Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1:93-113
7. **Farquhar MG** 1957 Corticotrophs of the rat adenohypophysis as revealed by electron microscopy. *Anat Rec* 127:291 (Abstract)
8. **Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC** 1997 Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 39:138-149
9. **Shiotani Y** 1980 An electron microscopic study on stellate cells in the rabbit adenohypophysis under various endocrine conditions. *Cell Tissue Res* 213:237-246
10. **Stokreef JC, Reifel CW, Shin SH** 1986 A possible phagocytic role for folliculo-stellate cells of anterior pituitary following estrogen withdrawal from primed male rats. *Cell Tissue Res* 243:255-261
11. **Reifel CW, Shin SH, Stokreef JC** 1989 Localization of acid phosphatase in lysosomes of pituitary folliculo-stellate cells following estrogen withdrawal from primed male rats. *Histochemistry* 91:483-485
12. **Horvath E, Kovacs K** 2002 Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol* 26:219-228
13. **Lloyd RV, Mailloux J** 1988 Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues. *Am J Pathol* 133:338-346
14. **Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D** 1987 Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5773-5777
15. **Gospodarowicz D, Lau K** 1989 Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* 165:292-298
16. **Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C** 1989 Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49:102-106
17. **Moore BW** 1965 A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744
18. **Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B** 1971 An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28:351-354
19. **Salazar H** 1963 The Pars Distalis of the Female Rabbit Hypophysis: an Electron Microscopic Study. *Anat Rec* 147:469-497

20. **Yoshimura F, Soji T, Sato S, Yokoyama M** 1977 Development and differentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocrinol Jpn* 24:435-449
21. **Dingemans KP, Feltkamp CA** 1972 Nongranulated cells in the mouse adenohypophysis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124:387-405
22. **Bambauer HJ, Ueno S, Umar H, Ueck M** 1985 Histochemical and cytochemical demonstration of Ca⁺⁺-ATPase activity in the stellate cells of the adenohypophysis of the guinea pig. *Histochemistry* 83:195-200
23. **Ferrara N, Henzel WJ** 1989 Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858
24. **Ferrara N, Winer J, Henzel WJ** 1992 Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: Identification as leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:698-702
25. **Tierney T, Patel R, Stead CA, Leng L, Bucala R, Buckingham JC** 2005 Macrophage migration inhibitory factor is released from pituitary folliculo-stellate-like cells by endotoxin and dexamethasone and attenuates the steroid-induced inhibition of interleukin 6 release. *Endocrinology* 146:35-43
26. **Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM** 1989 Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 125:575-577
27. **Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK** 1999 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *Journal of Endocrinology* 160:483-490
28. **Roberts WG, Palade GE** 1995 Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108 (Pt 6):2369-2379
29. **Höfler H, Walter GF, Denk H** 1984 Immunohistochemistry of Folliculo-stellate cells in Normal Human Adenohypophyses and in Pituitary Adenomas. *Acta Neuropathologica* 65:35-40
30. **Fauquier T, Guérineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P** 2001 Folliculostellate cell network: A route for longdistance communication in the anterior pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8891-8896
31. **Soji T, Herbert DC** 1989 Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 224:523-533
32. **Mira-Moser F, Schofield J, Orci L** 1975 Tight junction between follicular cells of the anterior pituitary gland: a freeze-fracture study. *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire* 22:117-120
33. **Soji T, Sirasawa N, Kurono C, Yashiro T, Herbert DC** 1994 Immunohistochemical study of the post-natal development of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Tissue Cell* 26:1-8
34. **Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Horiuchi O, Yashiro T, Kikuchi M, Hashimoto Y, Tsuruo Y, Herbert DC, Soji T** 2004 Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: X. Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculo-stellate

- cells in the rat anterior pituitary gland. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 278:462-473
35. **Allaerts W, Deneff C** 1989 Regulatory activity and topological distribution of folliculo-stellate cells in rat anterior pituitary cell aggregates. *Neuroendocrinology* 49:409-418
 36. **Fletcher WH, Anderson NCJ, Everett JW** 1975 INTERCELLULAR COMMUNICATION IN THE RAT ANTERIOR PITUITARY GLAND. *The Journal of Cell Biology* 67:469-476
 37. **Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Mounari-Silem Y** 1996 Cell-to-Cell Communication in the Anterior Pituitary: Evidence for Gap Junction-Mediated Exchanges between Endocrine Cells and Folliculostellate Cells. *Endocrinology* 137:3356-3367
 38. **Stojilkovic SS** 2001 A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends Endocrinol Metab* 12:378-380
 39. **Fawcett DW** 1994 *A Textbook of Histology*. 12th ed
 40. **McNutt NS, Weinstein RS** 1970 The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. *J Cell Biol* 47:666-688
 41. **Friend DS, Gilula NB** 1972 Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 53:758-776
 42. **Rash JE, Staehelin LA, Ellisman MH** 1974 Rectangular arrays of particles on freeze-cleaved plasma membranes are not gap junctions. *Exp Cell Res* 86:187-190
 43. **Musil LS, Goodenough DA** 1993 Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74:1065-1077
 44. **Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M** 1999 Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176-1180
 45. **Kistler J, Goldie K, Donaldson P, Engel A** 1994 Reconstitution of native-type noncrystalline lens fiber gap junctions from isolated hemichannels. *J Cell Biol* 126:1047-1058
 46. **Cascio M, Kumar NM, Safarik R, Gilula NB** 1995 Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. *J Biol Chem* 270:18643-18648
 47. **Falk MM, Buehler LK, Kumar NM, Gilula NB** 1997 Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *Embo J* 16:2703-2716
 48. **VanSlyke JK, Musil LS** 2000 Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods* 20:156-164
 49. **Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA** 1977 Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74:629-645
 50. **Gilula NB, Reeves OR, Steinbach A** 1972 Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* 235:262-265
 51. **Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC** 2003 Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400

52. **Spray DC** 1994 Physiological and pharmacological regulation of gap junction channels. In *Molecular Mechanisms of Epithelial Cell Junctions: From Development to Diseases*. Texas: R.G. Landes Company
53. **Loewenstein WR** 1981 Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61:829-913
54. **Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, McDonald JR, Walsh DA, Fletcher WH** 1993 In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 127-128:293-307
55. **Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM** 2000 Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 275:25207-25215
56. **Simon AM, Goodenough DA** 1998 Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 8:477-483
57. **Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH** 2002 Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503-507
58. **Lauf U, Giepmans BN, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10446-10451
59. **Falk MM** 2000 Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 79:564-574
60. **Falk MM, Kumar NM, Gilula NB** 1994 Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 127:343-355
61. **Zhang JT, Chen M, Foote CI, Nicholson BJ** 1996 Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. *Mol Biol Cell* 7:471-482
62. **Falk MM, Gilula NB** 1998 Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. *J Biol Chem* 273:7856-7864
63. **Ahmad S, Diez JA, George CH, Evans WH** 1999 Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem J* 339 (Pt 2):247-253
64. **Sarma JD, Wang F, Koval M** 2002 Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J Biol Chem* 277:20911-20918
65. **Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH** 2001 Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci* 114:3845-3855
66. **George CH, Kendall JM, Evans WH** 1999 Intracellular Trafficking Pathways in the Assembly of Connexins into Gap Junctions. *The Journal of Biological Chemistry* 274:8678-8685
67. **Laird DW, Castillo M, Kasprzak L** 1995 Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* 131:1193-1203
68. **Deschenes SM, Walcott JL, Wexler TL, Scherer SS, Fischbeck KH** 1997 Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci* 17:9077-9084

69. **De Sousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ, Kidder GM** 1993 Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117:1355-1367
70. **Rahman S, Carlile G, Evans WH** 1993 Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *J Biol Chem* 268:1260-1265
71. **Musil LS, Goodenough DA** 1991 Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115:1357-1374
72. **Kumar NM, Friend DS, Gilula NB** 1995 Synthesis and assembly of human beta 1 gap junctions in BHK cells by DNA transfection with the human beta 1 cDNA. *J Cell Sci* 108 (Pt 12):3725-3734
73. **Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG** 1996 Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol* 134:1019-1030
74. **Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R** 2000 Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol* 148:1063-1074
75. **Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA** 1990 Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 111:2077-2088
76. **Traub O, Druge PM, Willecke K** 1983 Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:755-759
77. **Goodenough DA, Gilula NB** 1974 The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides. *J Cell Biol* 61:575-590
78. **Ghoshroy S, Goodenough DA, Sosinsky GE** 1995 Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J Membr Biol* 146:15-28
79. **Larsen WJ, Tung HN, Murray SA, Swenson CA** 1979 Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *J Cell Biol* 83:576-587
80. **Mazet F, Wittenberg BA, Spray DC** 1985 Fate of intercellular junctions in isolated adult rat cardiac cells. *Circ Res* 56:195-204
81. **Severs NJ, Shovel KS, Slade AM, Powell T, Twist VW, Green CR** 1989 Fate of gap junctions in isolated adult mammalian cardiomyocytes. *Circ Res* 65:22-42
82. **Ginzberg RD, Gilula NB** 1979 Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium. *Dev Biol* 68:110-129
83. **Risinger MA, Larsen WJ** 1983 Interaction of filipin with junctional membrane at different stages of the junction's life history. *Tissue Cell* 15:1-15
84. **Laing JG, Beyer EC** 1995 The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270:26399-26403

85. **Spray DC** 1998 Gap junction proteins: where they live and how they die. *Circ Res* 83:679-681
86. **Yeager M, Unger VM, Falk MM** 1998 Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels *Current Opinion in Structural Biology* 8:517-527
87. **Laing JG, Tadros PN, Westphale EM, Beyer EC** 1997 Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp Cell Res* 236:482-492
88. **Qin H, Shao Q, Igdoura SA, Alaoui-Jamali MA, Laird DW** 2003 Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem* 278:30005-30014
89. **Risek B, Klier FG, Gilula NB** 1994 Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Dev Biol* 164:183-196
90. **Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, Ramanan SV, Beyer EC** 1997 Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* 273:C1386-1396
91. **He DS, Jiang JX, Taffet SM, Burt JM** 1999 Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6495-6500
92. **Kumar NM, Gilula NB** 1996 The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388
93. **Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC** 2002 Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:495-500
94. **Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R** 2001 Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292:1178-1180
95. **John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JJ, Weiss JN** 1999 Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J Biol Chem* 274:236-240
96. **Verselis VK, Trexler EB, Bukauskas FF** 2000 Connexin hemichannels and cell-cell channels: comparison of properties. *Braz J Med Biol Res* 33:379-389
97. **Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett MV** 2003 Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11388-11393
98. **Liu S, Taffet S, Stoner L, Delmar M, Vallano ML, Jalife J** 1993 A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys J* 64:1422-1433
99. **Kalvelyte A, Imbrasaite A, Bukauskiene A, Verselis VK, Bukauskas FF** 2003 Connexins and apoptotic transformation. *Biochem Pharmacol* 66:1661-1672
100. **Contreras JE, Sanchez HA, Veliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC** 2004 Role of connexin-based gap junction channels and

- hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev* 47:290-303
101. **Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Sohl G** 2001 Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* 8:163-165
 102. **Laird DW, Puranam KL, Revel JP** 1991 Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273(Pt 1):67-72
 103. **Musil LS, Beyer EC, Goodenough DA** 1990 Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation. *J Membr Biol* 116:163-175
 104. **Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H, Lampe P, Goldberg G** 2000 The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 33:369-378
 105. **Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK** 2000 Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2556-2561
 106. **Martin PE, Evans WH** 2004 Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovascular Research* 62:378-387
 107. **Martin PE, Steggle J, Wilson C, Ahmad S, Evans WH** 2000 Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. *Biochem J* 350 Pt 3:943
 108. **Foote CI, Zhou L, Zhu X, Nicholson BJ** 1998 The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J Cell Biol* 140:1187-1197
 109. **Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V** 2006 Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal* 18:592-600
 110. **Loewenstein WR, Rose B** 1992 The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* 3:59-79
 111. **Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH** 1999 Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 8:2369-2376
 112. **Martin PE, Mambetisaeva ET, Archer DA, George CH, Evans WH** 2000 Analysis of gap junction assembly using mutated connexins detected in Charcot-Marie-Tooth X-linked disease. *J Neurochem* 74:711-720
 113. **Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, Lanneluc I, Callouet E, Laoudj D, Lemaitre G, Hand C, Hayflick SJ, Zonana J, Antonarakis S, Radhakrishna U, Kelsell DP, Christianson AL, Pitaval A, Der Kaloustian V, Fraser C, Blanchet-Bardon C, Rouleau GA, Waksman G** 2000 Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 26:142-144
 114. **Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak, II, Mori CM, da Silva TC, Oloris SC, Garate AP, Massironi SM, Yamasaki H, Dagli ML** 2004 Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors

- in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25:1973-1982
115. **King TJ, Lampe PD** 2004 Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis* 25:669-680
 116. **Moreno AP, Saez JC, Fishman GI, Spray DC** 1994 Human connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ Res* 74:1050-1057
 117. **Yamamoto T, Hossain MZ, Hertzberg EL, Uemura H, Murphy LJ, Nagy JI** 1993 Connexin43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry* 100:53-64
 118. **Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J** 1995 Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831-1834
 119. **Zahler S, Hoffmann A, Gloe T, Pohl U** 2003 Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. *J Leukoc Biol* 73:118-126
 120. **Oviedo-Orta E, Errington RJ, Evans WH** 2002 Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. *Cell Biol Int* 26:253-263
 121. **Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR** 1991 Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 124:207-225
 122. **Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CC** 1991 Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1883-1887
 123. **Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I** 2004 Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14:650-658
 124. **Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP** 2002 Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41:5754-5764
 125. **Hunter AW, Jourdan J, Gourdie RG** 2003 Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. *Cell Commun Adhes* 10:211-214
 126. **Liu TF, Paulson AF, Li HY, Atkinson MM, Johnson RG** 1997 Inhibitory effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dye leakage from single Novikoff cells and on dye transfer between reaggregated cell pairs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19:573-577
 127. **Lampe PD, Lau AF** 2000 Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384:205-215
 128. **Fishman GI, Moreno AP, Spray DC, Leinwand LA** 1991 Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3525-3529
 129. **Dunham B, Liu S, Taffet S, Trabka-Janik E, Delmar M, Petryshyn R, Zheng S, Perzova R, Vallano ML** 1992 Immunolocalization and

- expression of functional and nonfunctional cell-to-cell channels from wild-type and mutant rat heart connexin43 cDNA. *Circ Res* 70:1233-1243
130. **Kwak BR, Hermans MM, De Jonge HR, Lohmann SM, Jongsma HJ, Chanson M** 1995 Differential regulation of distinct types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. *Mol Biol Cell* 6:1707-1719
 131. **Kwak BR, van Veen TA, Analbers LJ, Jongsma HJ** 1995 TPA increases conductance but decreases permeability in neonatal rat cardiomyocyte gap junction channels. *Exp Cell Res* 220:456-463
 132. **Lampe PD** 1994 Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J Cell Biol* 127:1895-1905
 133. **Puranam KL, Laird DW, Revel JP** 1993 Trapping an intermediate form of connexin43 in the Golgi. *Exp Cell Res* 206:85-92
 134. **Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF** 1996 Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J Biol Chem* 271:3779-3786
 135. **Kanemitsu MY, Lau AF** 1993 Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 4:837-848
 136. **Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ** 1991 Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* 266:22159-22163
 137. **Warn-Cramer BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF** 1998 Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:9188-9196
 138. **Solan JL, Lampe PD** 2005 Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711:154-163
 139. **Corbin JD, Keely SL** 1977 Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J Biol Chem* 252:910-918
 140. **Corbin JD, Soderling TR, Park CR** 1973 Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J Biol Chem* 248:1813-1821
 141. **Atkinson MM, Lampe PD, Lin HH, Kollander R, Li XR, Kiang DT** 1995 Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 9):3079-3090
 142. **Shah MM, Martinez AM, Fletcher WH** 2002 The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 238:57-68
 143. **Parker PJ, Murray-Rust J** 2004 PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132
 144. **Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Dotto GP** 1991 The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene

- modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* 11:5364-5371
145. **Berthoud VM, Ledbetter ML, Hertzberg EL, Saez JC** 1992 Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca²⁺. *Eur J Cell Biol* 57:40-50
 146. **Faucheux N, Zahm JM, Bonnet N, Legeay G, Nagel MD** 2004 Gap junction communication between cells aggregated on a cellulose-coated polystyrene: influence of connexin 43 phosphorylation. *Biomaterials* 25:2501-2506
 147. **Rivedal E, Yamasaki H, Sanner T** 1994 Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 15:689-694
 148. **Kenne K, Fransson-Steen R, Honkasalo S, Warngard L** 1994 Two inhibitors of gap junctional intercellular communication, TPA and endosulfan: different effects on phosphorylation of connexin 43 in the rat liver epithelial cell line, IAR 20. *Carcinogenesis* 15:1161-1165
 149. **Zhou L, Kasperek EM, Nicholson BJ** 1999 Dissection of the molecular basis of pp60(v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J Cell Biol* 144:1033-1045
 150. **Sim AT, Scott JD** 1999 Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26:209-217
 151. **Ceulemans H, Bollen M** 2004 Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39
 152. **Ai X, Pogwizd SM** 2005 Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A. *Circ Res* 96:54-63
 153. **Bollen M, Stalmans W** 1992 The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:227-281
 154. **Mumby MC, Walter G** 1993 Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73:673-699
 155. **McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM** 1996 The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* 271:22081-22089
 156. **Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC** 2002 Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4221-4226
 157. **Hansra G, Bornancin F, Whelan R, Hemmings BA, Parker PJ** 1996 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase C α correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *J Biol Chem* 271:32785-32788
 158. **Boudreau RT, Garduno R, Lin TJ** 2002 Protein phosphatase 2A and protein kinase C α are physically associated and are involved in *Pseudomonas aeruginosa*-induced interleukin 6 production by mast cells. *J Biol Chem* 277:5322-5329
 159. **Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ** 1988 Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 61:149-200

160. **Bandyopadhyay A, Shin DW, Kim DH** 2000 Regulation of ATP-induced calcium release in COS-7 cells by calcineurin. *Biochem J* 348 Pt 1:173-181
161. **Lester LB, Coghlan VM, Nauert B, Scott JD** 1996 Cloning and characterization of a novel A-kinase anchoring protein. AKAP 220, association with testicular peroxisomes. *J Biol Chem* 271:9460-9465
162. **Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M** 1998 Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J* 17:3101-3111
163. **Arzt E, Paez Pereda M, Costas M, Sauer J, Renner U, Holsboer F, Stalla GK** 1998 Cytokine expression and molecular mechanisms of their auto/paracrine regulation of anterior pituitary function and growth. *Annals of the New York Academy of Science* 840:525-531
164. **Arzt E, Paez Pereda M, Perez Castro C, Pagotto U, Renner U, Stalla GK** 1999 Pathophysiological Role of the Cytokine Network in the Anterior Pituitary Gland. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:71-95
165. **McCann SM, Lyson K, Karanth S, Gimeno M, Belova N, Kamat A, Rettori V** 1994 Role of Cytokines in the Endocrine System. *Annals New York Academy of Science* 741:50-63
166. **Wheelock E** 1965 Interferon-like-virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149:310-311
167. **Dijkmans R, Billiau A** 1988 Interferon gamma: a master key in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1:269-274
168. **Fountoulakis M, Zulauf M, Lustig A, Garotta G** 1992 Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur J Biochem* 208:781-787
169. **Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC** 1997 Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795
170. **Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, Garotta G** 1992 Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol* 22:2403-2412
171. **Schindler C, Darnell JE, Jr.** 1995 Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-651
172. **Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD** 1994 Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J* 13:1591-1600
173. **Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD** 1995 Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2:677-687
174. **Vankelecom H, Andries M, Billiau A, Denef C** 1992 Evidence that folliculo-stellate cells mediate the inhibitory effect of interferon-gamma on hormone secretion in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* 130:3537-3546
175. **Mensink A, Brouwer A, Van den Burg EH, Geurts S, Jongen WM, Lakemond CM, Meijerman I, Van der Wijk T** 1996 Modulation of intercellular communication between smooth muscle cells by growth factors and cytokines. *Eur J Pharmacol* 310:73-81

176. **Eugenin EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC** 2001 Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4190-4195
177. **Atkins E** 1960 Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 40:580-646
178. **Gupta S** 1988 Cytokines: molecular and biological characteristics. *Scand J Rheumatol Suppl* 76:189-201
179. **Apte RN, Voronov E** 2002 Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol* 12:277-290
180. **Spangelo BL, Gorospe WC** 1995 Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front Neuroendocrinol* 16:1-22
181. **Cannella B, Raine CS** 1995 The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424-435
182. **Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, 3rd, Araoz C** 1989 Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7611-7615
183. **Tyor WR, Glass JD, Griffin JW, Becker PS, McArthur JC, Bezman L, Griffin DE** 1992 Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* 31:349-360
184. **Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Fein HG** 1987 Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238:519-521
185. **Matta SG, Linner KM, Sharp BM** 1993 Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta stimulate adrenocorticotropin secretion in the rat through a similar hypothalamic receptor(s): effects of interleukin-1 receptor antagonist protein. *Neuroendocrinology* 57:14-22
186. **De Souza EB, Webster EL, Grigoriadis DE, Tracey DE** 1989 Corticotropin-releasing factor (CRF) and interleukin-1 (IL-1) receptors in the brain-pituitary-immune axis. *Psychopharmacol Bull* 25:299-305
187. **Bilezikjian LM, Leal AM, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW** 2003 Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1beta and a major source of intrapituitary follistatin. *Endocrinology* 144:732-740
188. **John GR, Scemes E, Suadicani SO, Liu JS, Charles PC, Lee SC, Spray DC, Brosnan CF** 1999 IL-1beta differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11613-11618
189. **Duffy HS, John GR, Lee SC, Brosnan CF, Spray DC** 2000 Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J Neurosci* 20:RC114
190. **Fortin ME, Pelletier RM, Meilleur MA, Vitale ML** 2006 Modulation of GJA1 Turnover and Intercellular Communication by Proinflammatory Cytokines in the Anterior Pituitary Folliculostellate Cell Line TtT/GF. *Biology of Reproduction* 74:2-12
191. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B** 1975 An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670

192. **Chouaib S, Robinet E, Zyad A, Branellec D** 1992 [Tumor necrosis factor: pleiotropic cytokine]. *Bull Cancer* 79:935-949
193. **Fukata J, Imura H, Nakao K** 1994 Cytokines as mediators in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical function. *J Endocrinol Invest* 17:141-155
194. **Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, Usui T, Ebisui O, Muro S, Hanaoka I, Inoue K, Imura H, Nakao K** 1997 Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res* 758:45-50
195. **Mensink A, de Haan LH, Lakemond CM, Koelman CA, Koeman JH** 1995 Inhibition of gap junctional intercellular communication between primary human smooth muscle cells by tumor necrosis factor alpha. *Carcinogenesis* 16:2063-2067
196. **Hao JL, Suzuki K, Lu Y, Hirano S, Fukuda K, Kumagai N, Kimura K, Nishida T** 2005 Inhibition of gap junction-mediated intercellular communication by TNF-alpha in cultured human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1195-1200
197. **Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A** 1999 Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine* 11:216-224
198. **van Rijen HV, van Kempen MJ, Postma S, Jongasma HJ** 1998 Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40, and connexin37 in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* 10:258-264
199. **Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A** 1992 Establishment of a Folliculo-Stellate-Like Cell Line from a Murine Thyrotropic Pituitary Tumor. *Endocrinology* 131:3110-3116
200. **Zheng G, Solinet S, Pelletier RM, Vitale ML** 2006 Actin cytoskeleton remodelling in the anterior pituitary folliculostellate cell line TtT/GF: Participation of the actin-binding protein cortactin. *Journal of Molecular Histology* sous presse
201. **El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC** 1987 Scrape-Loading and Dye-Transfer. *Experimental Cell Research* 168:422-430
202. **Hagemann C, Blank JL** 2001 The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13:863-875
203. **Fortin ME** 2004 Modulation de l'expression et de la localisation de la connexine 43 par des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules folliculostellaires de l'hypophyse antérieure. In: *Sciences biomédicales*. Montréal: Université de Montréal; 149
204. **Ishikawa H, Nogami H, Shirasawa N** 1983 Novel clonal strains from adult rat anterior pituitary producing S-100 protein. *Nature* 303:711-713
205. **Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A** 1995 Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol* 69:4489-4494
206. **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* 149:1503-1512
207. **Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG** 2000 Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 113 (Pt 17):3037-3049

208. **Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN** 1998 A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228
209. **Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL** 1991 Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 266:15180-15184
210. **Alvarez E, Northwood IC, Gonzalez FA, Latour DA, Seth A, Abate C, Curran T, Davis RJ** 1991 Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol Chem* 266:15277-15285
211. **Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, Spies T** 1987 Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8535-8539
212. **Hu J, Cotgreave IA** 1997 Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators in vitro. *J Clin Invest* 99:2312-2316
213. **Rivedal E, Ronnback L** 2004 Connexin43 synthesis, phosphorylation, and degradation in regulation of transient inhibition of gap junction intercellular communication by the phorbol ester TPA in rat liver epithelial cells. *Experimental Cell Research* 302:143-152
214. **Ricciarelli R, Azzi A** 1998 Regulation of recombinant PKC alpha activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. *Arch Biochem Biophys* 355:197-200
215. **Nishizuka Y** 1995 Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* 9:484-496
216. **Newton AC** 2003 Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370:361-371
217. **Dinarello CA** 1991 Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652
218. **Koenig JI, Snow K, Clark BD, Toni R, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA, Reichlin S, Lee SL, Lechan RM** 1990 Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology* 126:3053-3058
219. **Cunningham ET, Jr., Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB** 1992 In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* 12:1101-1114
220. **Campos M, Fadden P, Alms G, Qian Z, Haystead TA** 1996 Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem* 271:28478-28484
221. **Cohen P** 1989 The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453-508
222. **Bilezikjian LM, Turnbull AV, Corrigan AZ, Blount AL, Rivier CL, Vale WW** 1998 Interleukin-1beta regulates pituitary follistatin and inhibin/activin betaB mRNA levels and attenuates FSH secretion in response to activin-A. *Endocrinology* 139:3361-3364

223. **Chedid M, Mizel SB** 1990 Involvement of cyclic AMP-dependent protein kinases in the signal transduction pathway for interleukin-1. *Mol Cell Biol* 10:3824-3827
224. **Munoz E, Beutner U, Zubiaga A, Huber BT** 1990 IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *J Immunol* 144:964-969
225. **Koff WC, Dunegan MA** 1985 Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J Immunol* 135:350-354
226. **Vankelecom H, Carmeliet P, Heremans H, Van Damme J, Dijkmans R, Billiau A, Deneef C** 1990 Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* 126:2919-2926
227. **Zhang XF, Guo SZ, Lu KH, Li HY, Li XD, Zhang LX, Yang L** 2004 Different roles of PKC and PKA in effect of interferon-gamma on proliferation and collagen synthesis of fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin* 25:1320-1326
228. **Peracchia C, Sotkis A, Wang XG, Peracchia LL, Persechini A** 2000 Calmodulin directly gates gap junction channels. *J Biol Chem* 275:26220-26224

