Suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de gap-FRAP sur des modèles in vitro (2-D, 3-D) et ex vivo : intérêt pour le diagnostic du cancer

Muriel Abbaci

▶ **To cite this version:**

Muriel Abbaci. Suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de gap-FRAP sur des modèles in vitro (2-D, 3-D) et ex vivo : intérêt pour le diagnostic du cancer. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10058 . tel-00343150v1

HAL Id: tel-00343150

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-00343150v1

Submitted on 29 Mar 2018 (v1), last revised 29 Nov 2008 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Octobre 2008

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

Discipline : Ingénierie cellulaire et tissulaire

Par **Muriel ABBACI**

Suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de *gap*-FRAP sur des modèles *in vitro* (2-D, 3-D) et *ex vivo* : Intérêt pour le diagnostic du cancer

Membres du jury :

Juges :

Mme Le Dr. Corinne LAPLACE-BUILHÉ (Villejuif, France) *Présidente du jury*

Mr Le Pr. François GUILLEMIN (Nancy, France) *Directeur de thèse*

Mme Le Dr. Muriel BARBERI-HEYOB (Nancy, France) *Co-Directrice de thèse*

Mr Le Dr. Jacques DIDELON (Nancy, France)

Rapporteurs :

Mr Le Dr. Georges WAGNIÈRES (Lausanne, Suisse)

Mme Le Pr. Maria Lùcia ZAIDAN DAGLI (Sao Paulo, Brésil)

Invité :

Mr Le Dr. Walter BLONDEL (Nancy, France)

CENTRE DE RECHERCHE EN AUTOMATIQUE DE NANCY

CNRS - CENTRE ALEXIS VAUTRIN - NANCY-UNIVERSITÉ

à mes grands-parents
à mes parents

REMERCIEMENTS

J’exprime mes sincères remerciements à :

Mr le Professeur **François Guillemin**. Ce fut un honneur pour moi qu’il ait accepté de diriger ma thèse. Je tiens à lui exprimer mon admiration pour son grand dévouement à l’exercice de la médecine et à la recherche. Malgré son importante charge de travail, il s’est toujours montré attentif à mes études. Je le remercie de m’avoir guidée au cours de chacune de nos réunions et de m’avoir inculqué que la présentation de résultats n’a d’intérêt que si le scientifique est également un bon pédagogue.

Mme le Docteur **Muriel Barberi-Heyob** à qui j’adresse toute ma gratitude pour son soutien moral indéfectible. Je la remercie chaleureusement pour sa ténacité et son esprit d’analyse qui nous ont permis de venir à bout de nos « trois étapes ». Toujours disponible lorsque je frappais à sa porte, nous avons traversé ensemble cette période de ma vie qui s’est avérée semée d’embûches. Elle a su à chaque fois trouver les mots pour me redonner confiance.

Mr le Docteur **Jacques Didelon**, qui m’a installée sur les rails de la thèse. Je le remercie de s’être toujours montré à l’écoute ainsi qu’enthousiaste à mon égard. Premier persuadé que nous terminerions avec des mesures sur du tissu sain et cancéreux, il m’a accordé toute sa confiance. Sa gentillesse et sa bonne humeur ont constitué pour moi un véritable réconfort.

Mr le Professeur **Alain Richard** pour m’avoir accueillie au CRAN et avoir toujours porté de l’intérêt pour mon travail.

Mr le Professeur **Didier Wolf** pour m’avoir accueillie avec bienveillance au sein du groupe Ingénierie pour la Santé du CRAN pour réaliser cette thèse.

Mme le Docteur **Corinne Laplace-Builhé** que je remercie vivement de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et pour m'avoir également offert l'opportunité de travailler à ses côtés aujourd'hui.

Mme le Professeur **Maria-Lùcia Zaidan Dagli** et Mr le Docteur **Georges Wagnières** à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de rapporter mon travail. Je les remercie pour leurs commentaires avisés.

Mr le Docteur **Walter Blondel**, pour la qualité de son enseignement, l'attention accordée à mon travail de thèse et sa participation.

Mr le Docteur **Dominique Dumas**, qui m'a fait bénéficier de ses compétences en microscopie. Je le remercie pour tous ses conseils avertis et pour m'avoir toujours aidée lorsque le besoin s'en faisait sentir.

Mr le Docteur **Thierry Bastogne**, pour s'être confronté avec enthousiasme à toutes les questions que nous nous posions sur le recouvrement de fluorescence. Je le remercie pour ce précieux temps passé à nos côtés pour y répondre.

Melle **Saoussen Berrahmoune** pour ses encouragements et la simplicité avec laquelle elle m'a transmis, dans la dernière ligne droite, son savoir-faire en expérimentation animale. Travailler avec elle fut un réel plaisir et je lui adresse aujourd'hui toute mon amitié.

Mr le Docteur **Benoît Godbert** et l'ensemble du **personnel soignant du service 1**, pour leur écoute, leur gentillesse et leur aide indirecte mais essentielle dans l'aboutissement de mes études. C'est avec une profonde sympathie que je pense à eux.

Mr le Professeur **François Plénat** et Mme **Corinne Bonnet** pour leur disponibilité et leur expertise concernant les travaux d'histologie.

Melle le Docteur **Elisabeth Werkmeister** et Mr le Docteur **Cédric Boura** pour leur disponibilité dans la réalisation des images macroscopiques de fluorescence des sphéroïdes et de la vessie.

Sabrina, Marine, Loraine, Noémie, Sanae, Denise, Monique, Ghislaine, Luc, Anne-Laure, Annabelle et Aurélie que j'ai rencontrés au cours de ma thèse, qui y ont apporté leur touche de diverses façons et qui ont fait de cette période un moment d'échanges et de rencontres enrichissantes.

Je tiens également à remercier le **ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche** pour m'avoir attribué une allocation de recherche ainsi que les **comités lorrains de La Ligue Contre le Cancer** pour leur soutien financier qui m'a permis de réaliser l'ensemble de mes travaux.

Enfin mais surtout, à **ma mère, mon père, mon frère et Sergueï** pour leur soutien inconditionnel pendant toutes ces années à mes côtés, dans les bons moments mais aussi dans les périodes difficiles. Il n'existe pas de mot assez fort pour témoigner de la chance que j'ai de les avoir.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS INTERNATIONALES ET NATIONALES

Abbaci M., Barberi-Heyob M., Berrahmoune S., Plénat F., Bastogne T., Dumas D., Blondel W., Didelon J. and Guillemin F.
Gap junctional communication capacity in an orthotopic rat bladder tumor model after intravesical instillation by gap-FRAP technique.
Soumis 09/08.

Abbaci M., Bastogne T., Dumas D., Didelon J., Guillemin F., Blondel W. and Barberi-Heyob M.
A system engineering model to analyze gap-FRAP in a multicellular 3-dimensional model.
Eur. Biophys. J, en révision.

Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W.,Guillemin F., Didelon J.
Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication.
Biotechniques, 45, (1), 33-62, 2008.

Abbaci M., Barberi-Heyob M., Stines J. R., Blondel W., Dumas D., Guillemin F., Didelon J.
Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique : a comparative study.
Biotechnology J., 2, (1), 50-61, 2007.

Stines J. R., **Abbaci M.,** Blondel W., Barberi-Heyob M., Dumas D., Guillemin F., Didelon J
Instrumental optimization of Gap-FRAP technique related to gap junctions functionality for different cell types.
ITBM-RBM, 26, 279-281, 2005.

PRÉSENTATIONS ORALES ET PAR POSTER

Gap-FRAP technique applied on spheroid three-dimensional model with the confocal scanning laser microscope.
Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., Dumas D, Guillemin F., Didelon J.
International Gap Junction conference, Helsingor : Danemark (2007) poster.

Application de la technique de gap-FRAP en mode monophoton sur modèle tridimensionnel de sphéroïdes.
Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., Guillemin F., Didelon J.
11e Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, CYTOMETRIE'2006, Bruges : Belgique (2006) communication orale.

Application de la technique de gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching en mode monophoton sur modèle tridimensionnel de sphéroïdes.
Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., Guillemin F., Didelon J.
Journée Annuelle de la Recherche Médicale de la faculté de médecine de Nancy, Nancy : France (2006) et Journée de Rencontres Club SFO (Société Française d'Optique) Photonique et Sciences du Vivant (PSV), Paris : France (2006) poster.

In vitro characterization of gap junctional intercellular communication by gap-FRAP technique.
Abbaci M., Stines J. R., Barberi-Heyob M., Blondel W., Dumas D., Guillemin F., Didelon J.
European Conferences on Biomedical Optics, Munich : Allemagne (2005) communication orale. Proceedings of the SPIE, 5859 (2005) 25-32.

Instrumental optimization of Gap-FRAP technique related to gap junctions functionality for different cell types.
Stines J. R., **Abbaci M.,** Blondel W., Barberi-Heyob M., Dumas D., Guillemin F., Didelon J.
Premières Journées Sciences Technologie Imagerie en Médecine (JSTIM), Nancy : France (2005) communication orale.

Résumé

Ce travail de recherche s'inscrit dans un axe de diagnostic du cancer *via* le développement d'une méthode optique pour la caractérisation fonctionnelle de tissus. La technique de *gap*-FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) permet l'étude quantitative de la fonctionnalité des jonctions *gap*. La majorité des cellules néoplasiques se caractérisent par une modification du niveau d'expression et/ou de la fonctionnalité des jonctions *gap* par comparaison à leurs homologues saines. La technique de *gap*-FRAP permet en conséquence de discriminer les cellules cancéreuses en fonction de la communication intercellulaire *gap* jonctionnelle (CIGJ). Particulièrement utilisée *in vitro*, cette technique restait cependant anecdotique *ex vivo*. Nous avons validé la faisabilité du transfert de cette méthode sur tissus et organes *ex vivo*. A partir de cellules de statuts différents en expression et en distribution des connexines, nous avons caractérisé la calcéine-AM comme étant une sonde fluorescente adaptée pour des mesures sur tissus. Puis nous avons développé un modèle d'ingénierie systéme pour l'analyse comparative des données de recouvrement de fluorescence sur des modèles bi et tridimensionnels. Nous avons transposé ces conditions préalablement définies sur organe entier *ex vivo* : la vessie de rat. Un marquage multiple a été optimisé avec une sonde fluorescente pour le *tracking* des cellules cancéreuses dans la vessie *ex vivo*, un marqueur pour l'identification histologique de l'urothélium et la calcéine-AM pour mesurer la CIGJ. Le gap-FRAP a été utilisé pour la première fois pour différencier le degré de communication intercellulaire *gap* jonctionnelle entre le tissu sain et néoplasique sur un organe entier *ex vivo*, ouvrant des perspectives pour le diagnostic du cancer de la vessie corrélé à la modification de la CIGJ.

Mots-clés : jonctions *gap*, connexines, *gap*-FRAP, calcéine-AM, sphéroïde, vessie, microscopie confocale.

Abstract

Assessing gap junctions functionality using gap-FRAP technique on models *in vitro* (2-D, 3-D) and *ex vivo* : Interest for cancer diagnosis

Optical methods to characterize tissues for tumor detection are an area of diagnosis research. Gap-FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) technique is used to estimate gap junctions functionality. The majority of malignant cells are characterized by a modification of the number and functionality of gap junctions, compared to their healthy counterparts. Gap-FRAP technique appears adapted to distinguish cancerous cells from normal cells according to their intercellular communication (GJIC). Particularly used *in vitro*, we optimized the use of gap-FRAP technique for a potential transfer on tissues and organs *ex vivo*. We resolved, using cell lines with a different connexin expression and distribution pattern, the choice of a fluorescent dye for further *in vivo* measurements: calcein-AM. The following stage consisted in developing a system engineering model for the comparative analysis of the fluorescence recovery data for bi-dimensional and three-dimensional (spheroid) models. The conditions previously defined have been transposed in entire organ, bladder rat. Multi-color staining was applied using a fluorescent dye to track to tumors cells in bladder *ex vivo*, a fluorescent marker to distinguish cellular details of the entire urothelium, and calcein-AM to assess GJIC. Gap-FRAP was used for the first time to differentiate intercellular communication degree between healthy and tumor tissue in entire organ *ex vivo* opening perspectives for the diagnosis of the bladder cancer correlated to feature modifications of GJIC.

Key words: gap junctions, connexins, gap-FRAP, calcein-AM, spheroid, bladder, confocal microscopy.

SOMMAIRE

I INTRODUCTION GÉNÉRALE 15

II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 17

II.1 PHOTODETECTION DES ÉTATS PATHOLOGIQUES TISSULAIRES APPLIQUÉES AU DIAGNOSTIC *IN VIVO* 17

II.1.1 Spectroscopie optique 17

II.1.1.1 Principe de la fluorescence 17

II.1.1.2 Spectroscopie d'autofluorescence 19

II.1.1.3 Spectroscopie de fluorescence induite 20

II.1.1.4 Spectroscopie de diffusion Raman 21

II.1.1.5 Spectroscopie de diffusion élastique 23

II.1.2 Imagerie optique (micro et macroscopique) 24

II.1.2.1 Imagerie endoscopique de fluorescence 24

II.1.2.2 La microscopie confocale fibrée 24

II.1.2.3 Tomographie par Cohérence Optique (OCT) 26

II.1.3 Imagerie multi ou hyper-spectrale 27

II.1.4 Technique par analyse d'image : Du FRAP au gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 27

II.1.4.1 Les réactions photochimiques 28

II.1.4.2 Réactions photochimique de type I 29

II.1.4.3 Réactions photochimiques de type II 29

II.1.4.4 Photoblanchiment 30

II.1.4.5 Principe de la technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) .. 31

II.1.4.6 Principe de la technique de gap-FRAP 34

II.2 LES JONCTIONS COMMUNICANTES 35

II.2.1 Structure des jonctions communicantes 35

II.2.1.1 De la communication intercellulaire à la jonction gap 35

II.2.1.2 De la jonction gap aux connexines 36

II.2.1.3 Connexines : sous-unités protéiques 38

II.2.1.4 Synthèse, assemblage et dégradation 43

II.2.1.5 Phosphorylation des connexines 47

II.2.1.6 Phosphorylation de la Connexine 43 48

II.2.2 Ouverture et fermeture des jonctions gap 49

II.2.2.1 Concentration du calcium intracellulaire 49

II.2.2.2 pH intracellulaire 50

II.2.2.3 Potentiel transjonctionnel 50

II.2.3 Propriétés physiologiques des jonctions communicantes 50

II.2.3.1 Couplage électrique 50

II.2.3.2 Couplage métabolique 51

II.2.3.3 Perméabilité sélective des jonctions gap 51

II.2.3.4 Fonctions physiologiques dans un tissu sain 52

II.2.3.5 Jonctions gap et pathologies 54

II.3 JONCTIONS COMMUNICANTES ET CANCER 58

II.3.1 Cancer et anomalie de l'expression des Connexines 58

II.3.1.1 Historique 58

II.3.1.2 Inhibition de la communication intercellulaire par les promoteurs de tumeur 59

II.3.1.3 Caractéristiques 59

II.3.1.4 Caractérisation de l'expression des Connexines pour le cancer de la vessie 61

II.3.1.5 Gènes suppresseur de tumeur 63

II.3.2 Hypothèses de l'implication des Connexines dans le processus de cancérogenèse 64

II.3.3 Connexines, invasivité et métastases 66

II.3.3.1 Connexines et invasivité 66

II.3.3.2 Connexines et métastases 67
II.3.4 Outils de pronostic d'évolution du cancer 68
II.3.4.1 Sein 68
II.3.4.2 Colon et Rectum 69
II.3.4.3 Poumon 69
II.3.4.4 Pancréas 69
II.3.4.5 Thyroïde 70
II.3.5 Outils thérapeutiques 70
II.3.5.1 Communication intercellulaire : chimioprévention et chimiothérapie 70
II.3.5.2 Thérapie génique anti-tumorale 71
II.4 MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE 73

III OBJECTIFS 89

IV RÉSULTATS 90

IV.1 ETUDE COMPARATIVE DU CFDA ET DE LA CALCÉINE-AM EN TANT QUE TRACEUR DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE PAR LA TECHNIQUE DE GAP FRAP 90
IV.2 DÉVELOPPEMENT D'UN MODÉLE COMPORTEMENTAL POUR ANALYSER LA TECHNIQUE DE *GAP*-FRAP DANS UNE CULTURE TRIDIMENSIONNELLE, LE SPHÉROIDE 104
IV.3 COMPARAISON DE LA FONCTIONNALITE DES JONCTIONS *GAP* DE LA VESSIE SAINE ET TUMORALE CHEZ LE RAT PAR LA TECHNIQUE DE GAP-FRAP 124

V SYNTHÈSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS 154

VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES 157

VII BIBLIOGRAPHIE 164

VIII ANNEXES 180

VIII.1 PROCEEDINGS SPIE 180
VIII.2 ITBM-RBM 187

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFM	*Atomic Force Microscope*
ALA	Acide Amino-Levulinique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BBN	N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
Calcein-AM	*Calcein acetoxymethylester*
CFDA	*Carboxyfluorescein diacetate*
CI	Conversion Inter-Systèmes
CK1	Caséine Kinase 1
CMTX	Charcot-Marie-Tooth lié au chromosome X
Cx	Connexine
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FLIP	*Fluorescence Recovery In Photobleaching*
FRAP	*Fluorescence Recovery After Photobleaching*
GFP	*Green fluorescent Protein*
GJIC	Gap junctional intercellular communication
HALA	Hexylester d'Acide Amino-Levulinique
hCx	Connexine humaine
HeM	Connexon hétéromérique
HeT	Connexon hétérotypique
HoM	Connexon homomérique
HoT	Connexon homotypique
HSV-tk	Herpès simplex virus-thymidine kinase
IP_3	Inositol triphosphate
IR	Infrarouge
LAMP	Local Activation of a Molecular Fluorescent Probe
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
mCx	Connexine murine
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NO	Monoxyde d'Azote

OCT	Tomographie par Cohérence Optique
ODDD	Dysplasie Oculo-Dento-Digitale
PA	Molécule Photoactivable
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PpIX	Protoporphyrine IX
PR	Récepteur à la progestérone
ER	Récepteur à l'œstrogène
R	Fraction Mobile
RE	Réticulum endoplasmique
TPA	Tétradécanoyl 12-13 phorbol acétate
UV	Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Partie II : Synthèse bibliographique

Figure 1 : Interaction « Lumière-Tissu » montrant les phénomènes physiques 17
Figure 2 : Diagramme de Jablonsky 18
Figure 3: Spectres d'autofluorescence d'un carcinome des cordes vocales 20
Figure 4 : Spectres représentatifs de la différence d'intensité de fluorescence d'une zone saine (en vert) et d'une zone cancéreuse (en rouge) après injection de Photofrin. 21
Figure 5 : A. Comparaison des spectres Raman moyens normalisés de tissus gastriques normaux (noir) et dysplasiques (rouge). 22
Figure 6 : Spectres typiques de diffusion élastique obtenus dans l'œsophage. 23
Figure 7 : Images endoscopiques de fluorescence de lésions cancéreuses 24
Figure 8 : Schéma du montage optique d'un microscope confocal fibré 25
Figure 9 : Biopsie *in vivo*. Autofluorescence mesurée dans une bronchiole terminale saine à une excitation de 488nm. 25
Figure 10 : Principe d'un tomographe à cohérence optique. 26
Figure 11 : Mise en évidence d'une zone cancéreuse le long de la bordure alvéolaire à l'intérieur de la bouche par tomographie par cohérence optique 27
Figure 12 : Les réactions photochimiques de types I et II 29
Figure 13 : Recouvrement de fluorescence schématique après photoblanchiment (FRAP) 32
Figure 14 : Représentation schématique des jonctions *gap* 37
Figure 15 : A. Image obtenue par cryofracture qui montre la vue interne de canaux intercellulaires 38
Figure 16 : A. Structure des gènes codant les connexines 39
Figure 17 : Formation de canaux hétéromérique / hétérotypique 40
Figure 18 : Modèle topologique d'une connexine 42
Figure 19 : Représentation schématique des étapes de la synthèse, de l'assemblage et de la dégradation des jonctions *gap*. 44
Figure 20 : Sites phosphorylés de la Cx43 49
Figure 21 : Modèle d'initiation/promotion/progression de la carcinogenèse 66
Figure 22: Vue d'ensemble du synoptique de l'instrument proposé dédié à la technique endoscopique fibrée de *gap*-FRAP 163

LISTE DES TABLEAUX :

Partie II : Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Compatibilité hétéromérique et hétérotypique entre Connexines de mammifères..... 41
Tableau 2 : Nomination des connexines murines et humaines..... 43
Tableau 3 : Connexines humaines et leur expression majeure dans un organe, un tissu ou un type cellulaire..... 53
Tableau 4 : Phénotypes des souris déficientes en Cx (souris *knock-out*) et maladies humaines héréditaires associées à des mutations des Cx correspondantes..... 56
Tableau 5 : Expression et caractéristiques des Cx révélées par des études *in situ* dans des tumeurs humaines..... 60
Tableau 6 : Distribution des Connexines et fonctionnalité des jonctions *gap* dans la vessie chez l'homme..... 62
Tableau 7 : Différents effets observés suite à la restauration de la communication intercellulaire 63
Tableau 8 : Modulateurs de la communication intercellulaire gap jonctionnelle pour une stratégie chimiopréventive ou chimiothérapeutique. 71

I INTRODUCTION GÉNÉRALE

La **communication intercellulaire**, au sein d'un organisme multicellulaire, est nécessaire à la régulation de la croissance des cellules et au maintien de l'homéostasie. Les jonctions communicantes assurent l'échange de cytoplasme à cytoplasme, de molécules hydrophiles dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa. **La technique de *gap*-FRAP** (Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment) élargit la technique de FRAP à l'étude de la communication intercellulaire médiée par les jonctions *gap*. Elle permet de déterminer si une cellule communique avec les cellules adjacentes.

Le poids moléculaire, la formule chimique et les propriétés biophysiques des traceurs fluorescents définissent la capacité de communication intercellulaire et permettent de quantifier cette fonctionnalité même si les traceurs n'ont aucun rôle métabolique. Ces molécules sont appliquées aux mesures de perméabilité *gap* jonctionnelle, de communication hétérocellulaire et à des études consacrées à l'embryogenèse ou encore à la cancérogenèse.

La technique de *gap*-FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) est limitée principalement aux cultures cellulaires en monocouche *in vitro.* Cependant, quelques études portant sur la communication intercellulaire du cartilage, des ligaments et du tissu nerveux ont été abordées. Les résultats s'appuient sur l'irradiation d'une cellule individuelle dans une population et l'analyse des données de recouvrement de fluorescence ne considère, ni le nombre de cellules en contact avec la zone irradiée, ni l'influence des couches sous jacentes. De nombreuses études ont démontré que plusieurs types de cancers étaient caractérisés par **une modification du nombre et de la fonctionnalité des jonctions communicantes**. La technique de *gap*-FRAP semble particulièrement adaptée pour discriminer des types cellulaires en fonction de la fonctionnalité des jonctions *gap*.

Ce manuscrit aborde, dans une première partie, une synthèse bibliographique sur les techniques de diagnostic basées sur **la photodétection** des états pathologiques avec la présentation de la technique de *gap*-FRAP comme nouvelle méthode d'intérêt. Basée sur **l'étude de la fonctionnalité de la communication intercellulaire**, son potentiel est mis en avant par la description des jonctions communicantes à l'état sain et pathologique. L'accent

est également mis sur l'ensemble des méthodes actuelles permettant **d'évaluer la communication intercellulaire gap jonctionnelle**.

Dans une deuxième partie, sont présentés les résultats expérimentaux du suivi de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de *gap*-FRAP sur **des modèles *in vitro* (2-D et 3-D).** L'étude du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment menée sur des cultures 3-D a permis d'étudier la participation des couches sous jacentes au flux intercellulaire. Le choix **du traceur fluorescent** et la description **de paramètres significatifs** par la mise en place d'un **modèle d'ingénierie systéme** sont détaillés. Enfin, des travaux ***ex vivo***, portant sur la communication intercellulaire à l'intérieur de la **vessie** saine et tumorale du rat, sont décrits pour une utilisation possible pour le diagnostic du cancer de la vessie.

Une conclusion générale dégage les principaux résultats issus de ce travail de recherche et les perspectives à court et moyen terme, pour lesquelles les améliorations possibles, quant à l'utilisation de la technique de *gap*-FRAP avec **une instrumentation fibrée sur des modèles *in vivo,*** est développée.

II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 PHOTODETECTION DES ÉTATS PATHOLOGIQUES TISSULAIRES APPLIQUÉES AU DIAGNOSTIC *IN VIVO*

La photodétection des états pathologiques tissulaires se caractérise entre autre, par l'évaluation non invasive des tissus, en temps réel pour le patient. Elle ne nécessite ni prélèvements tissulaires, ni introduction invasive d'outils de détection dans les organes examinés. Les applications potentielles de la biopsie optique comprennent le diagnostic, la détermination du stade pathologique et sa localisation.

Les méthodes de diagnostic *in vivo* peuvent être classées en trois catégories :

- la spectroscopie optique,
- l'imagerie optique,
- et, l'imagerie multi ou hyper-spectrale.

Ces méthodes dépendent du trajet des photons dans un tissu (Fig.1).

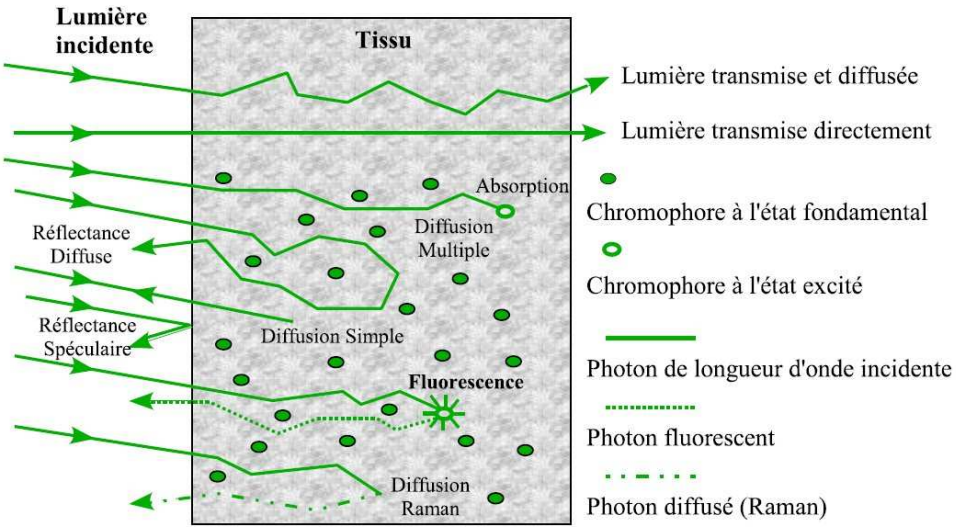

Figure 1 : Interaction « Lumière-Tissu » montrant les phénomènes physiques qui en résultent (Pery E., 2007).

II.1.1 Spectroscopie optique

II.1.1.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence correspond à la propriété qu'ont certains corps d'émettre de la lumière lorsqu'ils reçoivent un rayonnement lumineux. Observée pour la première fois en 1852, elle a

été mise en évidence en 1911 par Stübel pour son intérêt diagnostic des tissus dans le domaine spectral ultraviolet (UV)-visible.

La lumière émise aux longueurs d'onde situées dans l'UV et le visible possède une énergie suffisante pour générer une excitation électronique spécifique des molécules. Par définition, une molécule à l'état fondamental est dite stable quand ses électrons se trouvent dans l'orbital disponible de plus faible énergie (orbite liante). Lors de l'excitation de cette molécule à l'aide d'un faisceau lumineux, les photons sont absorbés par les atomes. L'apport d'énergie provenant de la source lumineuse va provoquer un changement du niveau d'énergie initial. A un état énergétique supérieur, la molécule est dite excitée. Ce niveau d'énergie est par nature instable et ne dure que quelques nanosecondes. La molécule excitée devient alors le siège d'une série de réactions, caractérisées par diverses manifestations, jusqu'à son retour à l'état stable. Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire : les processus de désactivation non radiative et les processus de désactivation radiative ou luminescence. Selon le spin (mode de rotation de l'électron sur lui-même), on distingue deux états excités d'énergie et de nature différente : l'état singulet instable (S) et l'état triplet métastable (T). Si l'émission se produit entre deux états de même multiplicité (singulet excité – singulet fondamental), le phénomène est appelé **fluorescence**. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet – singulet fondamental), le phénomène est appelé phosphorescence. La fluorescence est illustrée par le diagramme de Jablonsky (Fig.2).

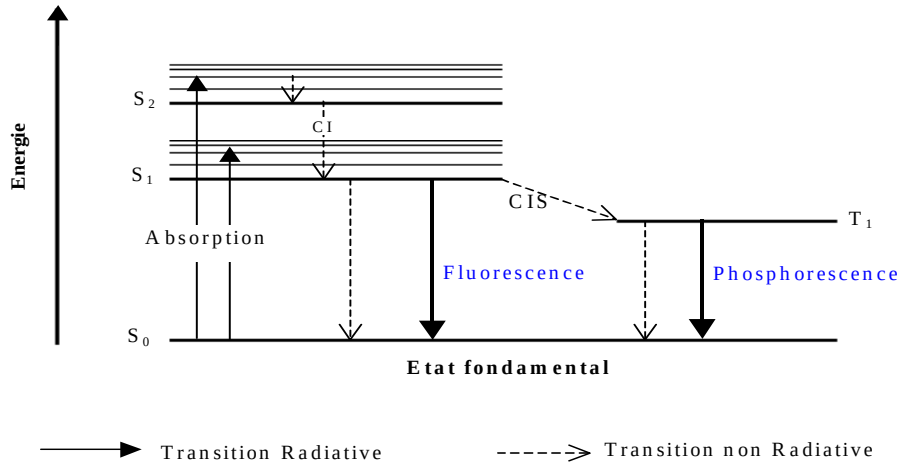

Figure 2 : Diagramme de Jablonsky représentant les différentes transitions énergétiques possible entre les états singulets S0 (état stable), S1 et S2 (états excités) et l'état triplet T1.

L'apport d'énergie correspond à : **E = (hc) / λ**

Avec :

E : énergie exprimée en joules.

h : constante de Planck (égale à $6{,}626.10^{-34}$ J.s).

c : célérité (égale à 3.10^{-8} m/s).

λ : longueur d'onde exprimée en mètre.

Le diagnostic par fluorescence est basé sur l'interaction d'une lumière de longueur d'onde déterminée avec les fluorophores intrinsèques ou extrinsèques présents dans les tissus. La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus dépend de la longueur d'onde utilisée. Cette profondeur, qui n'est que de quelques microns dans l'UV, peut atteindre plusieurs millimètres dans le proche Infrarouge (IR).

II.1.1.2 Spectroscopie d'autofluorescence

Cette méthode est basée sur l'analyse de spectres acquis par une fibre optique ou autre dispositif optique d'acquisition, sur une zone limitée. Chaque spectre correspond à l'exploration d'un volume tissulaire dont la dimension est déterminée par la surface de l'extrémité distale du système de transfert optique de la lumière émise. La détection des états pathologiques par spectroscopie de fluorescence tissulaire, générée par l'éclairement des fluorophores endogènes ou exogènes, est basée sur l'analyse comparative des spectres mesurés sur des zones saines et des zones suspectes. La spectroscopie d'autofluorescence est une méthode non invasive et atraumatique car aucune administration préalable d'un produit n'est nécessaire La plupart des tissus recèlent des fluorophores endogènes, identifiables par une émission dans une région spectrale spécifique, et dont la distribution est concentration-dépendante du métabolisme et de la structure du tissu (Ramanujam, 2000). Le tryptophane, les flavines, la porphyrine, le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), l'élastine et le collagène sont parmi les fluorophores endogènes les plus étudiés à ce jour pour le diagnostic optique des lésions précancéreuses de divers organes (Charvet *et al.*, 2004). L'évolution cancéreuse du tissu entraîne des modifications biochimiques et structurelles qui se traduisent par des variations des contributions relatives des différents fluorophores endogènes. Ces molécules présentent une fluorescence dans un domaine spectral allant de l'UV proche au visible. La spectroscopie d'autofluorescence a montré des résultats prometteurs pour la détection de cancer dans certains tissus (Arens *et al.*, 2006, Mayinger *et al.*, 2003).

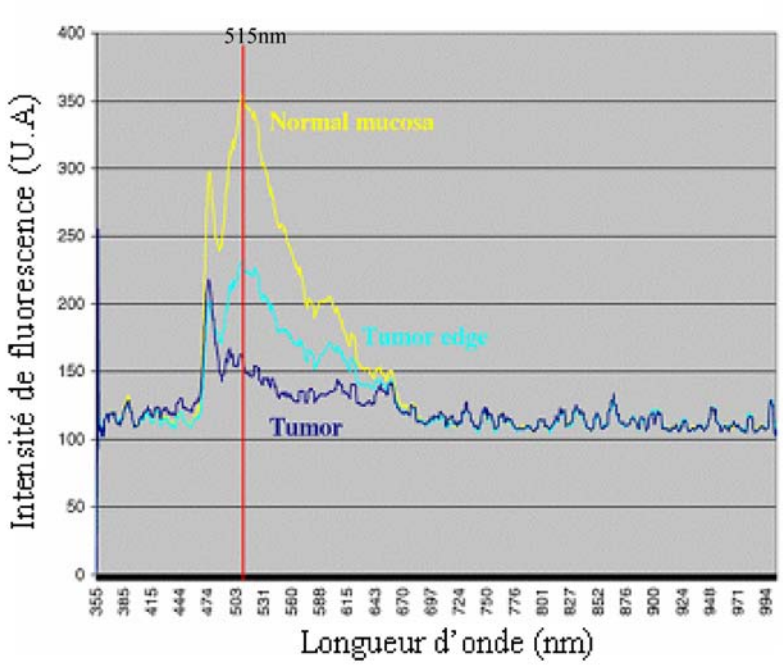

Figure 3: Spectres d'autofluorescence d'un carcinome des cordes vocales. Les trois spectres, muqueuse saine (jaune), bord de la tumeur (bleu ciel) et tumeur (bleu), montrent une baisse du pic d'autofluorescence à 515 nm en fonction du caractère néoplasique du tissu (barre rouge) (Arens *et al.*, 2006).

Cette approche présente une grande sensibilité à la composition chimique des tissus ; l'information collectée est alors de type statique. Cependant, l'inconvénient majeur de la spectroscopie d'autofluorescence provient de sa richesse d'information : le spectre d'autofluorescence fournit une information globale alors qu'il peut contenir des pics dus à l'absorption de fluorophores endogènes, dans une même bande d'absorption. L'interprétation quantitative des spectres, pour connaître les mécanismes à l'origine des modifications lors de la cancérogenèse, est difficile et les critères de discrimination entre tissus sains et tumoraux sont déterminés de façon empirique.

II.1.1.3 Spectroscopie de fluorescence induite

Il est possible de d'observer le phénomène de fluorescence en administrant des fluorophores exogènes non cytotoxiques et facilement administrables par voie systémique ou topique. Le développement des fluorophores exogènes comme marqueurs tumoraux a été essentiellement une conséquence de la thérapie photodynamique (la plupart des substances déjà utilisées en clinique sont des photosensibilisateurs). Les molécules actuellement employées pour le diagnostic sont le 5-ALA (acide amino-levulinique), l'hexylester d'ALA (Hexvix®) et l'hypéricine (Jocham *et al.*, 2008).

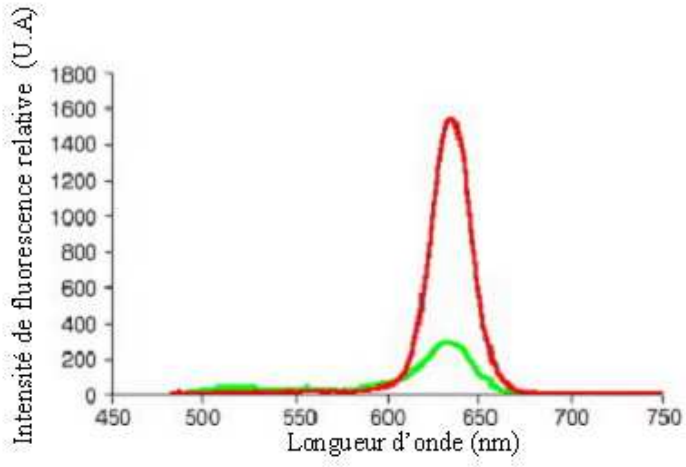

Figure 4 : Spectres représentatifs de la différence d'intensité de fluorescence d'une zone saine (en vert) et d'une zone cancéreuse (en rouge) après injection de Photofrin® dans le cas de carcinome épidermoïde oral chez l'hamster (Mang *et al.*, 2006).

La concentration du photosensibilisateur à l'équilibre est dans la plupart des cas supérieure dans les tissus tumoraux due à l'activité métabolique plus élevée des cellules cancéreuses. (Brown *et al.*, 2004). L'effet d'accumulation des photosensibilisateurs n'est cependant pas limité au tissu tumoral. La majorité des porphyrines s'accumulent dans les organes du systéme réticulo-endothélial tels le foie (cellules de Kupffer), les reins et la rate (les macrophages) et en quantité notable dans la peau, le muscle et le cerveau entrainant un ratio de fluorescence tumeur/tissu sain très variable (Carcenac *et al.*, 2000). L'injection de l'agent photosensibilisant entraîne l'inconvénient majeur d'une photosensibilité de la peau, dont la durée est variable selon chaque individu, en cas d'administration systémique (Silva *et al.*, 2006).

II.1.1.4 Spectroscopie de diffusion Raman

La spectroscopie Raman, basée sur la diffusion inélastique de la lumière, est utilisée depuis de nombreuses années pour l'étude biochimique de molécules biologiques variées. Elle permet de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau par l'interaction entre la lumière et les vibrations des atomes entre eux. Cette vibration peut impliquer une déformation du nuage électrique : la molécule se comporte comme un dipôle oscillant qui a pour propriété d'émettre des photons dans toutes les directions et dont la fréquence peut être différente de celle du champ électrique (Mazet, 2005). Ces dernières années, un intérêt grandissant s'est développé pour l'utilisation de cette technique à des fins diagnostiques

(Zhiwei Huang *et al.*, 2003). Quand un photon incident frappe une molécule, il peut être transmis, absorbé ou diffusé. Lorsque les photons incidents et diffusés n'ont pas la même énergie (diffusion inélastique), on parle de diffusion Raman. Deux types de diffusions inélastiques sont décrits : la diffusion Stokes, lorsque le photon diffusé est d'énergie plus faible que le photon incident et la diffusion anti-Stokes, quand le photon diffusé est d'énergie plus grande que le photon incident. La spectroscopie Raman est très sensible aux modifications chimiques des cellules et des tissus (Amharref *et al.*, 2007). Les investigations ont montré des caractéristiques spectrales spécifiques de spectres Raman corrélées avec des changements moléculaires et structurels du tissu associé à sa transformation néoplasique. Ainsi, la capacité de cette technique à détecter de faibles modifications biochimiques permet à priori de différencier les dysplasies des tissus sains (Fig. 5) (Teh *et al.*, 2008). Les derniers travaux réalisés semblent indiquer à moyen terme l'application de cette technique en endoscopie clinique, dépendamment des évolutions technologiques pour mesurer des signaux d'amplitudes extrêmement faibles (Shim *et al.*, 2000, Lau *et al.*, 2003).

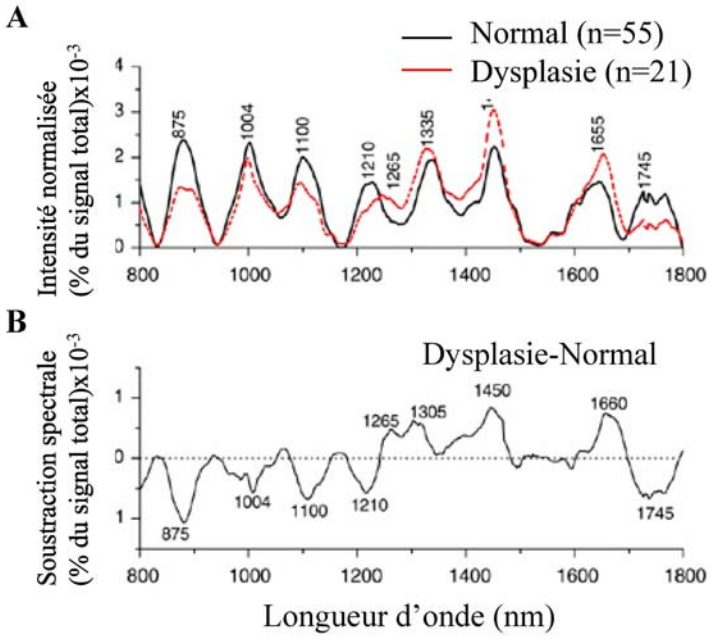

Figure 5 : A. Comparaison des spectres Raman moyens normalisés de tissus gastriques normaux (noir) et dysplasiques (rouge). B. Différence calculée entre les spectres Raman moyens normalisés des tissus normaux et dysplasiques. Les tissus dysplasiques présentent des intensités plus faibles à 875, 1004, 1100, 1210 et 1745 nm et supérieures à 1265, 1305, 1450 et 1660 nm par rapport aux tissus sains. Ces résultats indiquent une augmentation ou une diminution du pourcentage d'un certain type de biomolécules relatif aux constituants Raman actifs totaux dans les tissus dysplasiques (Teh *et al.*, 2008).

II.1.1.5 Spectroscopie de diffusion élastique

La spectroscopie de diffusion élastique est basée sur l'enregistrement de la lumière diffusée lors de son interaction avec le tissu. La forme du spectre dépend des paramètres de diffusion et d'absorption des tissus. Le spectre de la lumière diffusée contient de l'information sur la structure du tissu (propriété de diffusion) et sa composition chimique (propriété d'absorption) (Pery, 2007). La façon dont la lumière est absorbée ou diffusée par un tissu est un reflet de sa morphologie ou constitution. Cette méthode permet de détecter des modifications des propriétés optiques des tissus liées à la taille des noyaux et des cellules, la vascularisation, l'oxygénation ou des altérations structurelles. Ces perturbations sont liées dans des proportions variables, à la transformation maligne (Lovat *et al.*, 2006). L'utilisation en endoscopie limite l'étude en lumière rétrodiffusée (lumière qui après avoir été propagée dans le tissu, ressort du même côté ou sur la même surface d'excitation). On parle alors de spectroscopie en réflectance diffuse. Malgré un nombre limité de travaux, cette technique éveille un intérêt croissant pour la détection de cancer à des stades précoces (Fig. 6) (Perelman, 2006).

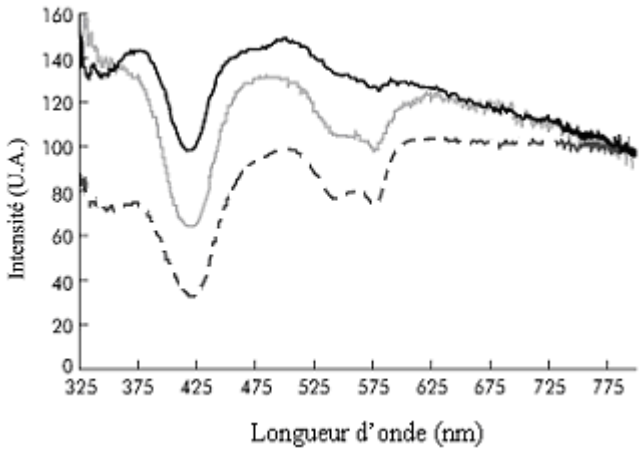

Figure 6 : Spectres typiques de diffusion élastique obtenus dans l'œsophage pour un adénocarcinome (gris clair), une dysplasie de grade élevé (noir) et une métaplasie non dysplasique de Barrett (pointillés) (Lovat *et al.*, 2006).

II.1.2 Imagerie optique (micro et macroscopique)

II.1.2.1 Imagerie endoscopique de fluorescence

Il n'est pas envisageable actuellement d'effectuer en clinique des biopsies optiques point par point sur toute la surface de l'organe à examiner. Lié à sa faible résolution spatiale, la spectroscopie présente un risque de faux négatifs dû à la zone malade. Or pour lever cette difficulté, de nouveaux systèmes d'imagerie en endoscopie ont été développés, suite à différents travaux ayant mis en évidence l'intérêt de l'imagerie de fluorescence en endoscopie pour optimiser le contraste entre zone saine et zone cancéreuse (Thiberville *et al.*, 2006). L'imagerie endoscopique de fluorescence présente, dans ces conditions, un intérêt certain pour l'exploration de grandes zones avec une résolution et une définition de bonne qualité (Fig. 7) (Mayinger *et al.*, 2008). Elle est basée sur la combinaison de plusieurs images acquises dans des bandes spectrales différentes du spectre de fluorescence. Un traitement d'images approprié présente une image en fausses couleurs reflétant la valeur des indicateurs spectraux, caractéristiques de tissus sains ou tumoraux.

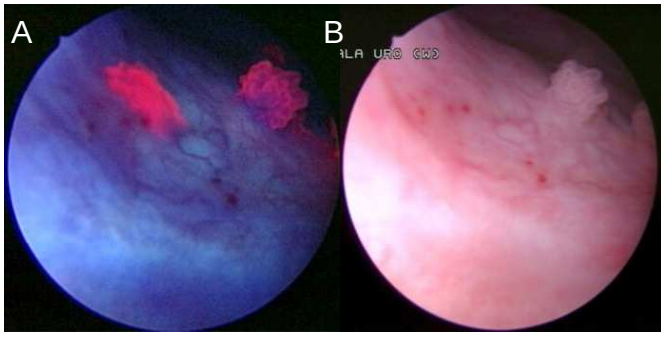

Figure 7 : Images endoscopiques de fluorescence (A) de lésions cancéreuses (en rouge) de la vessie après instillation de 50 mL de solution contenant 1,5 g d'ALA et en lumière blanche (B) (Jocham *et al.*, 2008).

II.1.2.2 La microscopie confocale fibrée

La microscopie par fibres optiques *in vivo* (Fig. 8) est une technique permettant l'analyse de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire, comparable à l'histopathologie standard, à des profondeurs allant jusqu'à 100 µm à partir de la surface de l'organe (Sung *et al.*, 2002).

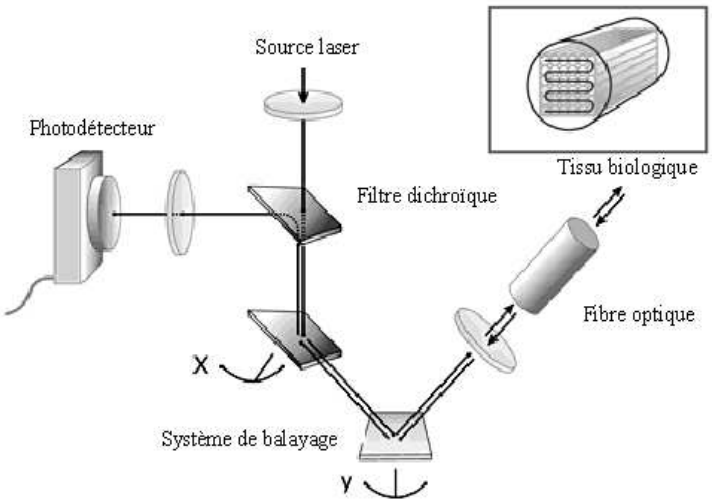

Figure 8 : Schéma du montage optique d'un microscope confocal fibré (Cell vizio®, Mauna Kea Technologies, Paris, France) (Laemmel *et al.*, 2004)

Cette technique peut être appliquée simultanément à une fibroscopie sous anesthésie locale. Elle permet l'analyse des zones éloignées, inaccessibles par endoscopie classique telles que les bronchioles terminales (Fig. 9) (Thiberville *et al.*, 2007).

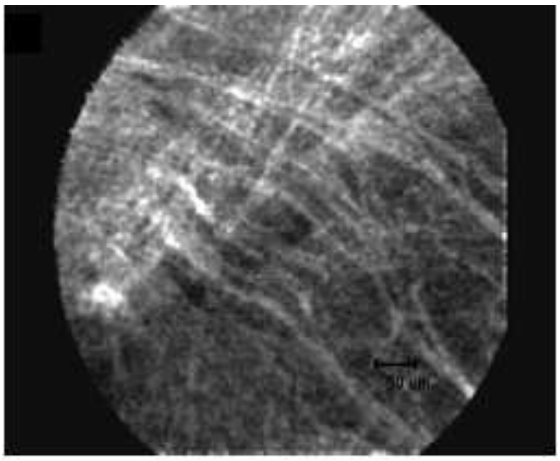

Figure 9 : Biopsie *in vivo*. Autofluorescence mesurée dans une bronchiole terminale saine à une excitation de 488 nm. La visualisation des microstructures est permise par le système Cell-Vizio®. L'image typique consiste en un entrelacement régulier de petites fibres semblable à un treillage (Thiberville *et al.*, 2007)

Il existe deux modalités d'imagerie utilisées en microscopie confocale fibrée : l'imagerie confocale de réflectance et l'imagerie confocale de fluorescence. L'imagerie confocale fibrée pourrait être utile pour un grand nombre d'applications médicales, entre autres le diagnostic précoce du cancer épithélial (MacAulay *et al.*, 2004). Les domaines d'application de la

microscopie confocale sont larges, ils concernent les lésions cutanées (Swindle *et al.*, 2003), gastro-intestinales (McLaren *et al.*, 2002) et du col de l'utérus (Tan *et al.*, 2007).

II.1.2.3 Tomographie par Cohérence Optique (OCT)

L'OCT est une technique d'imagerie analogue à l'échographie mais reposant sur l'utilisation des propriétés de la lumière plutôt que des ultrasons. Elle utilise la réflectance de la lumière infra-rouge pour former des images tissulaires *in vivo* avec une résolution 10 fois supérieures à celle de l'échoendoscopie standard. Basée sur le principe de l'interféromètre de Michelson, la lumière émise par une source laser infrarouge (à l'aide d'une diode laser émettant à 830 nm ou 1270 nm, ou d'un laser titane-saphir) est divisée par un séparateur puis dirigée d'une part, sur un miroir de référence placé à une distance parfaitement définie et d'autre part, sur l'échantillon tissulaire à étudier ; ce dernier étant illuminé via une fibre optique (Ascencio *et al.*, 2007). La lumière est réfléchie par le miroir et l'échantillon. Les deux faisceaux réfléchis se recombinent uniquement lorsque les deux distances parcourues sont identiques (Fig.10). Le déplacement du miroir de référence permet de recueillir une réflexion de l'échantillon à des distances variables (Ascencio *et al.*, 2007).

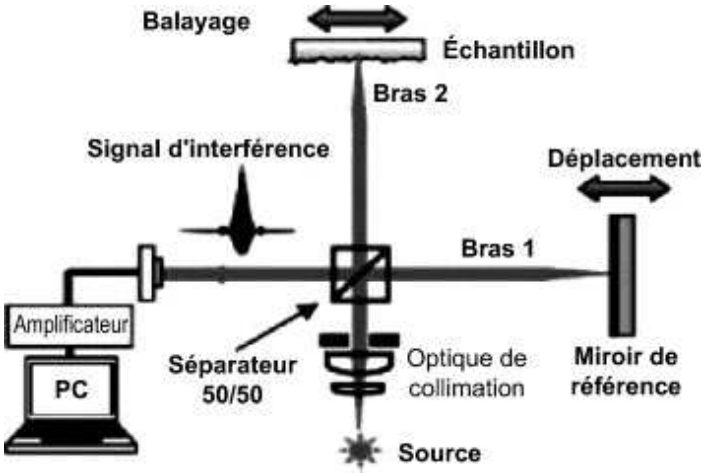

Figure 10 : Principe d'un tomographe à cohérence optique. Il nécessite l'utilisation de techniques d'interférométrie et la création de franges d'interférence. L'image de l'amplitude du signal d'interférence correspond à l'image tomographique d'une coupe de l'échantillon (Mordon *et al.*, 2005).

Les meilleurs images sont obtenus en plaçant la sonde à 1 ou 2 mm au dessus de la muqueuse ce qui évite les artéfacts architecturaux liés à la déformation des tissus sous la sonde (Mordon *et al.*, 2005). Elle renseigne alors sur l'architecture plus ou moins profonde du tissu, avec cependant une définition qui ne permet pas d'évaluer les modifications cytologiques. En effet,

la résolution (latérale et axiale pouvant atteindre de 4 à 20 µm jusqu'à des profondeurs de l'ordre de 2 mm) est telle qu'il est possible d'obtenir de véritables biopsies tissulaires en temps quasi-réel (Fig. 11) (Mordon, 2000).

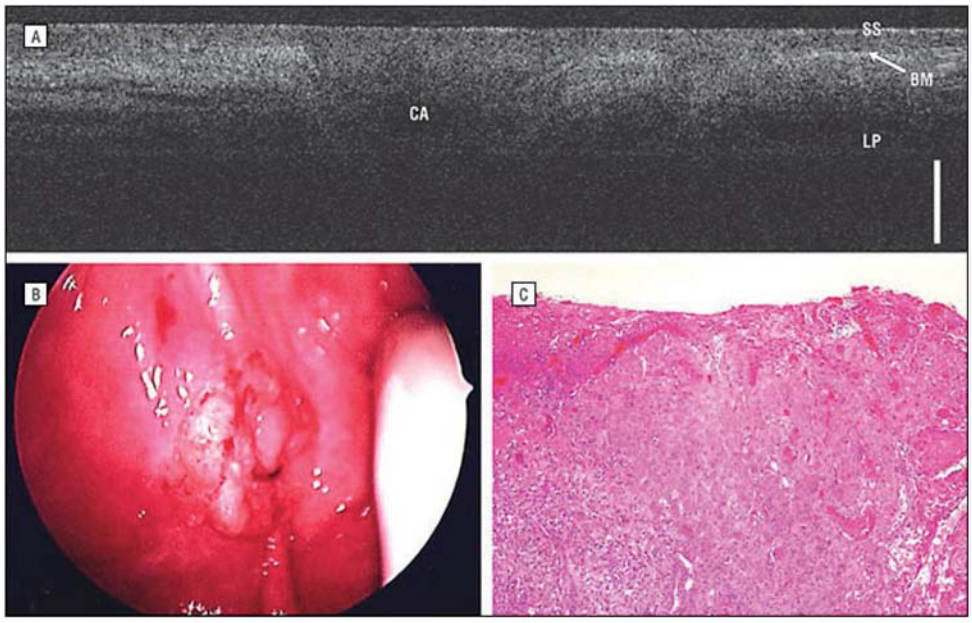

Figure 11 : Mise en évidence d'une zone cancéreuse le long de la bordure alvéolaire à l'intérieur de la bouche par tomographie par cohérence optique (A), endoscopie (B) et histologie (C). CA : cancer épidermoïde, BM : membrane basale, LP : lamina propria, SS : épithélium stratifié. La barre verticale indique 500 µm (Ridgway *et al.*, 2006).

Aujourd'hui les applications cliniques de cette technique sont nombreuses en ophtalmologie (Van Velthoven *et al.*, 2007), dermatologie (Gambichler *et al.*, 2005), gastroentérologie (DaCosta *et al.*, 2005), pneumologie (Armstrong *et al.*, 2006) et urologie (Manyak *et al.*, 2005)

II.1.3 Imagerie multi ou hyper-spectrale

L'imagerie multi-spectrale ou hyper-spectrale combine spectroscopie et imagerie optique. L'image est construite à partir des données obtenues à des longueurs d'onde différentes.

II.1.4 Technique par analyse d'image : Du FRAP au *gap*-FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)

II.1.4.1 Les réactions photochimiques

L'absorption de la lumière par un chromophore est l'étape initiale de toutes les réactions photophysiques et photochimiques. A température ambiante, la plupart des molécules sont à l'état fondamental S_0 qui est l'état électronique associé avec à la plus basse énergie et une configuration où tous les électrons sont orbitalement associés (orbitally paired). L'énergie de la lumière absorbée entraine le passage de la molécule photoactivable (PA), de son état fondamental dit singulet $^1PA_0$ vers des états de plus haute énergie dits états excités ($^1PA_1$*, $^1PA_2$* ou $^1PA_3$*…). Dans tout les cas, la molécule revient à l'état électronique excité de plus bas niveau d'énergie $^1PA_1$*, par une succession de relaxations vibrationnelles (conversions internes, CI). En complément à des processus radiatifs et non radiatifs, la molécule peut subir, depuis le premier état singulet excité, une transition vers l'état triplet T1 ($^3PA_1$*) *via* une conversion inter-systèmes (CIS). A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité et l'état singulet fondamental ($^1PA_0$), transition dite interdite. La durée de vie à l'état triplet est plus longue (1 µs à 1 s) que la durée de vie à l'état singulet (de l'ordre de la ns), augmentant ainsi la probabilité d'interactions avec des molécules voisines avec la molécule PA dans son état triplet. Différents moyens vont permettre à la molécule de revenir à l'état fondamental. Ainsi, la désexcitation peut se produire par l'émission, appelée phosphorescence, d'un photon ou alternativement, par un croisement inter-système suivi par une relaxation vibrationnelle.

Pour la plupart des molécules organiques, uniquement l'état singulet $^1PA_1$* et l'état triplet $^3PA_1{}^*$ de plus faible énergie, peuvent être considérés comme des candidats pour l'initiation de réactions photochimiques et photophysiques en raison du passage rapide depuis les états électroniques $n \geq 2$ par conversion interne depuis S_n vers S_1 et Tn vers T_1.

Une réaction photochimique peut être définie comme le processus par lequel l'activation d'une molécule induit les changements chimiques d'une autre molécule. L'étape initiale de la réaction correspond à l'absorption d'un photon par la PA entrainant la génération de molécules à des états triplets excités (^3PA*). Ce phénomène est à l'origine des réactions photochimiques de types I et II (Sharman *et al.*, 2000). Selon la définition établie par Foote (Foote, 1991) et comme présentée dans la figure 12, le mécanisme de type I implique l'interaction directe de ^3PA* avec un substrat S tandis que dans la réaction de type II, ^3PA* réagit par transfert d'énergie directement avec l'oxygène moléculaire pour former l'oxygène singulet $^1O_2$ qui pourra initier d'autres réactions avec les substrats cellulaires.

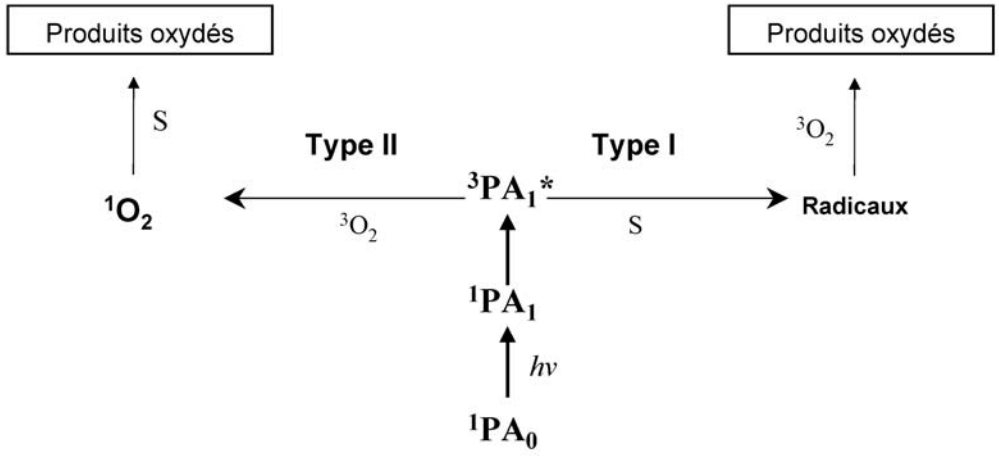

Figure 12 : Les réactions photochimiques de types I et II faisant intervenir la molécule PA à l'état triplet suite à son activation par la lumière.

II.1.4.2 Réactions photochimique de type I

Dans les réactions photochimiques de type I, la molécule PA à l'état triplet excité, interagit directement avec le substrat et entraîne la production d'espèces radicalaires, suite au transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène. Les espèces radicalaires qui résultent de cette réaction peuvent participer à différents types de réactions. Ainsi, en présence d'oxygène, les formes oxydées de la molécule photoactivable ou du substrat réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes qui vont initier une chaîne d'auto-oxydation (Aveline BM. *et al.*, 2001)

Les anions radicaux du PA ou du substrat peuvent également interagir de manière efficace avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ .Les formes semi-réduites de la PA ou du substrat interagissent efficacement avec l'oxygène. Le transfert d'électrons, qui a lieu entre les réactants, génère un anion radical superoxide. Une réaction qui produit de l'$O_2^{\bullet-}$ entrainera également la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la dismutation de l'$O_2^{\bullet-}$ ou la réduction d'un électron. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant modéré mais lorsqu'il s'accumule, il réagit avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ qui, par une réaction catalysée avec l'ion ferreux va produire le radical hydroxyle (réaction de Haber-Weiss).

II.1.4.3 Réactions photochimiques de type II

Les réactions photochimiques de type II requièrent la présence d'oxygène moléculaire dans son état triplet dès les premières étapes du processus. Suite aux mêmes étapes initiatrices que

pour les réactions de type I, la molécule PA se retrouve à l'état triplet excité $^3PA_1$*. Mais pour ce type de réaction, un transfert d'énergie vers l'oxygène moléculaire se produit entraînant la formation d'oxygène singulet ($^1O_2$). Ce dernier très réactif, hautement toxique et de faible durée de vie est susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son proche environnement. Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec l'oxygène singulet (Davies, 2004). De façon similaire, l'oxygène singulet peut également réagir avec la molécule PA à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation, dits photoproduits (phénomène de photoblanchiment ou de photomodification), dont certains peuvent eux-mêmes être phototoxiques

II.1.4.4 Photoblanchiment

Le photoblanchiment correspond à une variété de processus photochimiques entraînant la diminution de l'intensité de fluorescence. Il limite le nombre total de photons pouvant être émis par une molécule de fluorescence. Le processus conduisant au photoblanchiment n'est pas connu de façon générale car il peut être induit par une variété d'événements. La molécule d'oxygène dans l'état excité singulet est responsable du photoblanchiment d'un grand nombre de fluorophores (réaction de type II). Ainsi, le photoblanchiment s'observe par une diminution progressive de l'intensité de fluorescence qui dépend de la durée ou de l'intensité de l'excitation lumineuse (Bourg-Heckly, 2002). C'est un phénomène irréversible, que le mode d'illumination soit continu ou impulsionnel. Chaque fluorophore présente une sensibilité propre au photoblanchiment. L'utilisation d'une faible irradiance permet de le limiter mais réduit le signal de fluorescence. En présence d'une très forte intensité lumineuse, une plus grande proportion de molécules passe d'un état stable à un état excité de plus grande énergie. La perte des électrons peut alors donner naissance à des radicaux libres. Ces derniers étant très réactifs (réaction de type I), les molécules initialement fluorescentes sont alors profondément modifiées ce qui a pour conséquence de stopper ou d'annihiler leur fluorescence (Bourg-Heckly, 2002).

La technique de FRAP est basée sur le photoblanchiment appliqué à une sonde fluorescente exposée à un rayonnement lumineux, d'intensité donnée et de longueur d'onde correspondant au spectre d'absorption du fluorophore.

II.1.4.5 Principe de la technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

Dans un premier temps, l'irradiation générée par une impulsion brève mais très intense, jusqu'à obtenir un degré de photoblanchiment conséquent, d'une sonde fluorescente, localisée spatialement dans une région intracellulaire, est nécessaire. L'augmentation progressive de la fluorescence dans cette même région correspond à l'arrivée graduelle de molécules intactes par diffusion vers la zone photoblanchie. Elle permet de déterminer différents paramètres de diffusion, en 2 dimensions, de molécules conjuguées à un colorant dans les membranes soit cytoplasmique, soit nucléaire (diffusion latérale) ou dans le cytoplasme et les organites cellulaires.

La diffusion est le processus physique par lequel la matière est transportée de régions à forte concentration vers les régions à faible concentration. C'est le résultat macroscopique de l'agitation brownienne à l'échelle microscopique. Le modèle de diffusion d'une particule dans un volume est écrit par la formule de Stockes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

qui corrèle le comportement hydrodynamique d'une sphère avec la température absolue T, la viscosité de la solution η, la constante de Boltzmann k et le rayon hydrodynamique de la particule R_h.

La vitesse de diffusion va dépendre du milieu dans lequel la protéine étudiée se trouve et va refléter l'organisation de celui-ci. Des déviations du coefficient de diffusion par rapport à la valeur théorique indique (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001) :

Si D est plus faible :

- la particule pourrait être incorporée à un agrégat ou à un complexe plus large (D est inversement proportionnel à la taille de la molécule),
- l'environnement de la molécule est plus visqueux qu'attendu,
- la particule peut agir transitoirement avec des molécules fixes.

Si D est plus élevé :

- la particule peut montrer un comportement non diffusif tel qu'être intégré à un flux ou un mouvement dirigé par des protéines moteurs,
- l'environnement de la molécule est moins visqueux qu'attendu.

En pratique, la valeur du coefficient de diffusion des molécules ancrées dans la couche lipidique de la face externe de la membrane cellulaire est comprise entre 0,005 $\mu m^2.s^{-1}$ et 0,1 $\mu m^2.s^{-1}$ alors que pour celles ancrées sur la face interne, elle est comprise entre 0,1 $\mu m^2.s^{-1}$

et 1 $\mu m^2.s^{-1}$; pour une molécule dans le cytosol elle est supérieure à 10 $\mu m^2.s^{-1}$ (Matthews *et al.*, 2007).

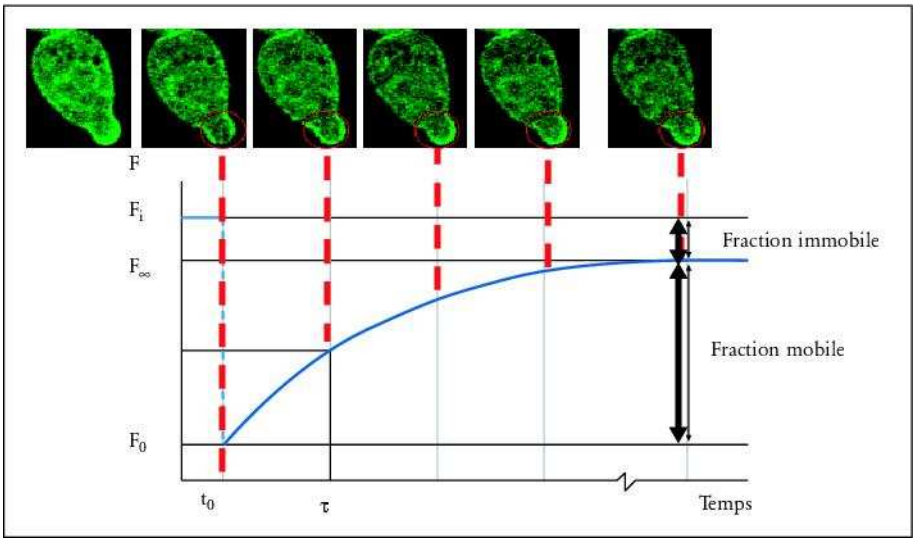

Figure 13 : Recouvrement de fluorescence schématique après photoblanchiment (FRAP). Suite au photoblanchiment d'une région fluorescente au temps t0, la fluorescence décroît de l'intensité initiale Fi à l'intensité F0. Il y a ensuite une récupération de fluorescence jusqu'à son maximum (F∞). Le demi-temps de récouvrement de τ donne le temps pour lequel la moitié de (F∞ - F0) est mesurée. En illustration cdc42 Δ/PMETCDC42, cellules mutantes de levure exprimant GFP-Cdc42 (PY196) (Matthews *et al.*, 2007)

Le coefficient de diffusion D peut aussi être calculé par :

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau}$$

Avec ω, rayon du faisceau laser (μm), τ , temps de demi-recouvrement (s).

La figure 13 montre une courbe de recouvrement typique et idéale. Dans un système encombré (comme une cellule), on ne retrouve généralement pas l'intensité de fluorescence initiale. Cela s'explique par le fait qu'une partie des molécules fluorescentes ne peut pas diffuser pour remplir la zone blanchie durant le temps de l'expérience ; on parle alors de fraction immobile.

La fraction mobile (R) est dans ses conditions calculée telle que (Reits *et al.*, 2001) :

$$R = \frac{F\infty - Fo}{Fi - Fo}$$

Avec $F_{\infty,}$ intensité de fluorescence finale ; $F_{0,}$ intensité de fluorescence après photoblanchiment ; F_i, intensité de fluorescence avant photoblanchiment.

La fraction mobile peut être modifiée en raison de certaines circonstances : Ainsi, (i) lorsqu'une molécule fluorescente interagit avec d'autres molécules ou membranes, ou (ii) qu'elle est affectée par des barrières membranaires et des microdomaines où elle demeure localisée. Ces facteurs non diffusionnels peuvent être responsables d'une mobilité réduite permanente ou temporaire.

La technique de FRAP est apparue dans les années 70, avec une application biologique principalement dédiée à l'étude de la mobilité de constituants marqués de la membrane cellulaire (Axelrod *et al.*, 1976). Le développement de la microscopie confocale dans les années 80, a par la suite facilité l'étude du comportement des molécules à l'intérieur des cellules, sans équipements spécialisés (association d'un microscope à épifluorescence avec une source laser indépendante). Cependant le FRAP n'était pas aussi populaire qu'aujourd'hui, probablement en raison d'une méthodologie dédiée et consommatrice de temps pour purifier, marquer les protéines ou autres composés et les injecter à l'intérieur des cellules (Houtsmuller, 2005). La révolution déclenchée par le développement des protéines chimériques fluorescentes (*Green, Red or Yellow fluorescent protein*) a donné un nouvel essor aux applications du FRAP en simplifiant l'étude du comportement des protéines dans les cellules vivantes (White *et al.*, 1999a). Cette technique permet entre autres aujourd'hui, de caractériser la mobilité des protéines nucléaires (Carrero *et al.*, 2003), d'étudier la mobilité de récepteurs de surface et de déterminer la microviscosité des compartiments cellulaires. En plus des applications cellulaires, le FRAP a également été utilisé pour étudier la mobilité de molécules dans l'espace interstitiel de tissu (tumeur) (Chary *et al.*, 1989), dans les matrices extracellulaires et dans les biofilms (Saltzman *et al.*, 1994), pour comprendre la délivrance des médicaments aux tumeurs et améliorer l'ingénierie tissulaire. En 2004, Gupta *et al.* proposent pour la première fois, suite à une étude menée sur 20 pièces opératoires de seins de patientes, l'utilisation de cette technique pour discriminer des tissus sains et cancéreux après comparaison des profils de photoblanchiment et de recouvrement de l'autofluorescence. Ces différences s'expliqueraient par les caractéristiques morphologiques des tissus (Gupta *et al.*, 2004). Actuellement, le développement informatique (vitesse et mémoire) facilite la modélisation des expériences de FRAP pour l'analyse de données complexes telles que la diffusion en 3 dimensions (Braeckmans *et al.*, 2003).

Proche de la technique de FRAP, le FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*) permet l'acquisition de la diminution de fluorescence dans les zones périphériques à la zone

photoblanchie, traduisant la diffusion des molécules intactes vers la zone ciblée (Köster *et al.*, 2005). Cette méthode fournit des indications sur les frontières entre compartiments.

II.1.4.6 Principe de la technique de gap-FRAP

Le *gap*-FRAP élargit la technique de FRAP à l'étude de la communication intercellulaire médiée par les jonctions *gap* (Wade *et al.*, 1986). Après introduction d'un traceur fluorescent spécifique dans une population cellulaire que l'on souhaite étudier, un gradient de concentration est généré par application d'une intensité de lumière monochromatique, d'intensité choisie, qui provoque le photoblanchiment de la sonde dans une cellule ciblée. Si le traceur est hydrophile et de poids moléculaire inférieur à 1 kDa et si la cellule cible communique avec les cellules adjacentes, la relaxation du gradient de concentration indique que le transfert de flux intercellulaire s'est effectué par les jonctions *gap* (Deleze *et al.*, 2001). Il est possible d'assimiler les jonctions *gap* à une membrane perméable dont le seuil de coupure serait de 1 kDa. Les concentrations dans chaque compartiment peuvent être considérées comme spatialement uniformes à tout instant. En conséquence, le gradient de concentration du soluté au travers des jonctions communicantes correspond à la différence de concentration (C_1-C_2), entre la cellule adjacente non photoblanchie et la cellule cible photoblanchie. Il est proportionnel à la quantité de soluté (*ds*), traversant la jonction communicante dans un temps (*dt*) et répond à la loi de Fick pour un système à deux compartiments séparés par une membrane (Deleze *et al.*, 2001)

$$\frac{ds}{dt} = -PA(C1 - C2)$$

Avec A la surface de la membrane et P le coefficient de perméabilité.

Des travaux portant sur l'application de la technique de *gap*-FRAP pour l'étude de la communication intercellulaire de cellules cancéreuses ont apporté des résultats significatifs (Carruba *et al.*, 2002, Soroceanu *et al.*, 2001).

La technique de *gap*-FRAP sera décrite par la suite dans la **partie II.4** de l'introduction bibliographique portant sur les méthodes d'étude de la communication intercellulaire. Cette approche sera comparée aux autres techniques également détaillées dans la littérature.

II.2 LES JONCTIONS COMMUNICANTES

II.2.1 Structure des jonctions communicantes

II.2.1.1 De la communication intercellulaire à la jonction gap

Dans un organisme multicellulaire, l'homéostasie est mécaniquement gouvernée par trois processus majeurs de la communication : (i) la **communication extracellulaire** *via* les hormones, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs et les cytokines, qui déclenchent (ii) la **communication intracellulaire** *via* des altérations des seconds messagers (e.g., Ca^{++}, diacylgycerol, pH, céramides, monoxyde d'azote (NO), Adénosine monophosphate cyclique (AMPc), les espèces réactives d'oxygène, qui vont activer les protéines impliquées dans les systèmes de transduction du signal pour moduler (iii) **la communication intercellulaire.** Ces moyens de communication sont donc intimement interconnectés pour contrôler l'aptitude des cellules à proliférer, se différencier, entrer en apoptose et répondre à un stimulus de manière adaptée (Trosko *et al.*, 1998). Les premières études sur la communication intercellulaire, faisant appel à la microscopie électronique datent des années 50. S'effectuant chez les vertébrés, elles utilisent les canaux transmembranaires reliant directement, de cytoplasme à cytoplasme, deux cellules adjacentes par cryofracture (Sjostrand *et al.*, 1954, Sjostrand *et al.*, 1958) et couplage électrique (Furshpan *et al.*, 1959). Différentes appellations ont été attribuées à ces jonctions intercellulaires tel que *nexus*, *macula communicans* et jonctions *gap* (Saez *et al.*, 2003). Cette dernière désignation trouve son origine dans le travail de Revel et Karnovsky (Revel *et al.*, 1967) qui présentent une vue en coupe perpendiculaire au plan membranaire. La jonction communicante est formée par l'apposition des deux membranes plasmiques, séparées par une mince fente de 2 à 3 nm de large et désignée par le terme *gap* en anglais. En marquant l'espace extracellulaire par le lanthane colloïdal, des agrégats de particules ou sous-unités protéiques ont été mis en évidence, rangées selon une structure pentalaminaire, qui se révélera typique des *jonctions gap*. Cette observation s'opposait aux jonctions serrées où le lanthane colloïdal ne pouvait pas pénétrer. En coupe fine, le marquage a montré des striations perpendiculairement à la membrane et reliant deux membranes cytoplasmiques (Robertson, 1963). Les études ultérieures, réalisées également par cryofracture et microscopie électronique ont montré que ces striations provenaient d'ensembles, constitués de centaines à plusieurs milliers de canaux intercellulaires, qui connectent le cytoplasme d'une cellule au cytoplasme de la cellule voisine (Goodenough *et al.*, 1970, Benedetti *et al.*, 1965). Les jonctions communicantes se regroupent ainsi pour former des plaques jonctionnelles constituées de milliers de jonctions *gap* rapprochées les

unes des autres, donnant ainsi une concentration pouvant aller jusqu'à 10^4 canaux/μm^2 de membrane (Lauf *et al.*, 2002). Le diamètre de ces plaques varie de 100 nm à plusieurs µm (Segretain *et al.*, 2004). Une caractéristique bien connue de ces plaques, exception faite de celles entre cellules de fibres du cristallin, est leur insolubilité dans les détergents non ioniques malgré l'absence d'association détectable avec le cytosquelette (VanSlyke *et al.*, 2000). Aujourd'hui, le terme *gap junction* se réfère à ces plaques contenant de multiples canaux intercellulaires, reliant deux membranes cytoplasmiques (Sosinsky *et al.*, 2005). Les quelques cellules saines qui n'expriment pas de jonction*s gap* sont les cellules musculaires striées adultes, certains neurones, les spermatozoïdes matures et les cellules circulantes du sang (Meda, 1996). Néanmoins, les cellules progénitrices de ces types cellulaires expriment les jonctions communicantes (Saez *et al.*, 2003, Rosendaal *et al.*, 1994). La communication intercellulaire lie, connecte et coordonne les cellules adhérentes. Cependant, elle n'est pas réservée uniquement aux organes et tissus compacts puisqu'elle est observée aussi dans certains types cellulaires du système immunitaire comprenant les organes lymphoïdes aussi bien que les lymphocytes périphériques migrant par le sang et les réseaux lymphatiques (Alves *et al.*, 1998).

II.2.1.2 De la jonction gap aux connexines

En utilisant la diffraction aux rayons X, plusieurs études ont montré que chaque cellule contribue à la formation d'une jonction communicante par la juxtaposition d'un demi-canal ou connexon avec son homologue de la cellule voisine (Caspar *et al.*, 1977, Makowski *et al.*, 1977). Ces connexons sont fermement associés car ils résistent aux tentatives de séparations par action mécanique ou osmotique et au fractionnement membranaire (Hentati-Ksibi, 1999). La liaison entre connexon est maintenue par des interactions hydrophobes (Musil *et al.*, 1991b). L'étude des canaux jonctionnels en microscopie de force atomique (AFM) (Hoh *et al.*, 1993) montre d'une part, une distribution dense de connexons distants de centre-à-centre de 9-10 nm et d'autre part, une distribution hexagonale semblable. Des études par cryofracture et analyses AFM (Hoh *et al.*, 1993, Revel *et al.*, 1967) décrivent que les connexons contiennent une structure semblable à un pore de 2 nm de diamètre, 1 nm de profondeur et 3.8 nm de large (Saez *et al.*, 2003). Associée aux analyses de Fourier, la microscopie électronique à faible dose (Uwin, Ennis, 1980) a mis en évidence la présence d'un cylindre possédant en son centre un pore aqueux, qui constitue le connexon (Falk, 2000). La microscopie électronique combinée au traitement d'images (Unger *et al.*, 1999) et les analyses hydrodynamiques (Falk *et al.*, 1997) ont montré que chaque connexon consiste en

l'assemblage annulaire de 6 sous-unités protéiques transmembranaires polytopiques appelées connexines (Cx) (Fig. 14).

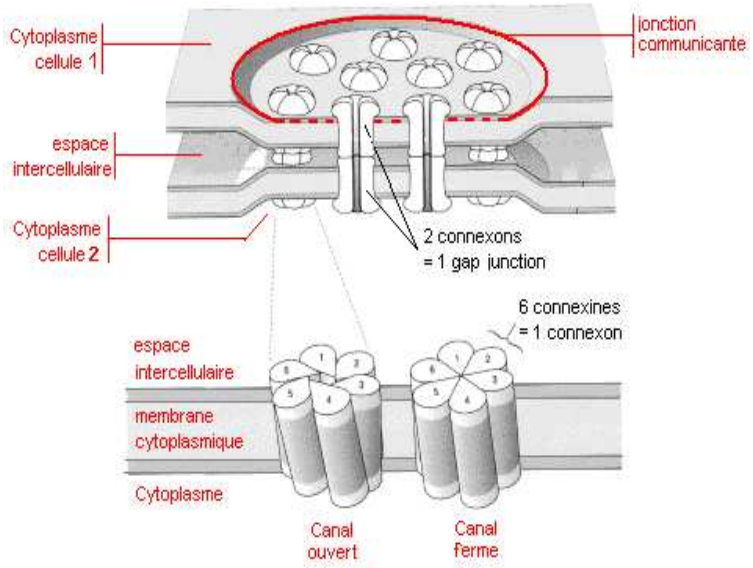

Figure 14 : Représentation schématique des jonctions *gap* (Söhl *et al.*, 2004). Les Connexines de chaque connexon modifient la conformation des connexons de manière coordonnée pour permettre l'ouverture et la fermeture du canal transmembranaire.

Le demi-canal peut supposer être divisé en trois domaines fonctionnels : (i) les domaines transmembranaires qui forment le canal, (ii) les domaines extracellulaires qui contribuent à la reconnaissance cellule-cellule, à l'amarrage de deux Cxs, et à la formation de la portion extracellulaire du pore, (iii) les domaines cytoplasmiques qui influencent les propriétés physiologiques d'ouverture/fermeture du canal (Sosinsky *et al.*, 2005). Cependant, il est connu que la séquence d'acides aminés primaires des domaines cytoplasmiques influe sur le mode de rencontre et de juxtaposition de deux connexons (Fig. 15) (Bruzzone *et al.*, 1994). L'AFM a permis d'observer, avec une résolution limitée, les changements conformationnels des canaux hexamèriques pendant l'ouverture et la fermeture du canal (Muller *et al.*, 2002). Durant plusieurs dizaines d'années, les demi-canaux dispersés dans des zones non jonctionnelles étaient considérés comme fermés en permanence pour éviter la mort cellulaire, mais des études rapportent depuis environ dix ans, que des demi-canaux formés par un certain nombre de Cxs différentes pourraient être ouverts au moins dans quelques cellules (Herve *et al.*, 2007).

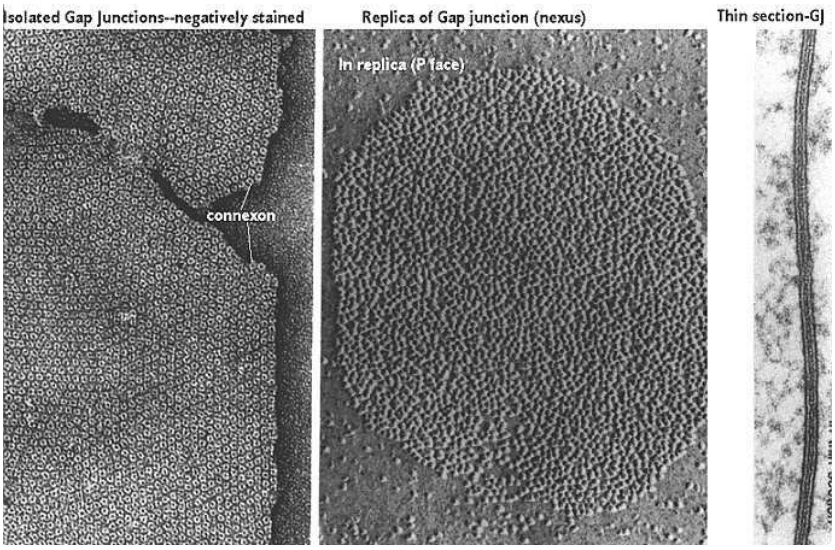

Figure 15 : A. Image obtenue par cryofracture montrant les canaux intercellulaires, B. La face côté cytoplasme, appelée face P (protoplasmique), C. Image typique obtenue par microscopie électronique. La ligne entre les deux membranes plasmiques correspond aux jonctions communicantes (Bloom *et al.*, 1994).

II.2.1.3 Connexines : sous-unités protéiques

- Gènes codant pour les connexines (Cx)

Les Cxs forment une famille multigénique. Actuellement, 20 gènes codant pour les Cxs chez la souris (mCx) et 21 gènes codant pour les Cxs chez l'homme (hCx), ont été mis en évidence (Söhl *et al.*, 2003). Dix-neuf d'entre eux sont présents chez les 2 espèces et peuvent être regroupés en paires orthologues (Söhl *et al.*, 2004). Les Cxs issues de ces gènes ne sont pas nécessairement exprimées dans le même type cellulaire, puisque les hCx30.2, hCx31.9, hCx40.1 and hCx62 sont exprimées dans le cœur humain tandis que leur orthologues murins mCx29, mCx30.2, mCx39 et mCx57 ne le sont pas, comme montré par Northern Blot. La plupart des gènes codant pour les Cxs contiennent deux exons et un intron de longueur variable (Saez *et al.*, 2003) (Fig. 16). Le premier exon contient seulement une séquence 5' non transcrite et le second exon contient la région codante complète et une séquence 3' non transcrite. Quelques exceptions ont été faites concernant les gènes codant pour les mCx36, hCx36, mCx39, hCx40.1 and mCx57. Ils peuvent être divisés en 2 catégories. Concernant la première catégorie, différentes séquences 5′- non transcrites peuvent être collées de façon consécutive ou alternée. Pour la seconde catégorie, la région codante peut être interrompue par des introns. Il est néanmoins nécessaire de clarifier si ces gènes expriment effectivement différents isoformes transcrits (Söhl *et al.*, 2004).

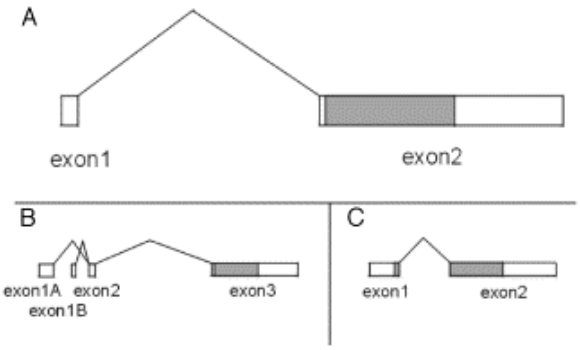

Figure 16 : A. Structure des gènes codant les connexines. B et C exceptions observées. Les régions traduites sont en gris clair et les régions non traduites en blanc (Söhl *et al.*, 2004).

La plupart des gènes sont situés sur des chromosomes différents. Cependant, dans certains cas, ils peuvent être rassemblés dans des portions spécifiques du génome. Ainsi, les gènes codant pour les Cx37 et Cx40 se trouvent à proximité l'un de l'autre sur le chromosome 1 et ceux codant pour les Cx26 et Cx46 sur le chromosome 13 (Meda, 1996). La conservation au cours de l'évolution d'une telle organisation suggère un partage de séquences régulatrices communes. Pourtant, il ne semble pas exister de lien entre la localisation et le regroupement de gènes sur certains chromosomes et leur expression dans divers tissus.

- Famille des connexines

A l'origine, toutes les jonctions *gap* étaient présumées composées par la même protéine. Les préparations enrichies en jonctions *gap*, similaires à celles utilisées pour les études structurelles, ont été utilisées pour l'identification protéique. La diversité des protéines a alors été mis en évidence par la variation de mobilité électrophorétique, entre 27 et 70 kDa, pour des jonctions *gap* provenant de différents tissus tels que des foies de souris et rat (Henderson *et al.*, 1979, Hertzberg *et al.*, 1979) et du cœur de rat (Manjunath *et al.*, 1985). Le séquençage de l'extrémité N-terminal de ces polypeptides, confirma que ces protéines étaient différentes mais que quelques cas partageaient un degré de similarité (Bruzzone *et al.*, 1996b). Après que la Cx majeure du foie chez le rat (Paul, 1986) et l'homme ait été déterminée (Kumar *et al.*, 1986, Heynkes *et al.*, 1986), l'addition rapide de nouvelles Cxs a nécessité la mise en place d'une nomenclature proposée par Beyer *et al.* (Beyer *et al.*, 1987). Elle est basée sur la masse moléculaire déduite à partir des séquences d'ADNc et de l'addition de l'espèce d'origine en préfixe telle que hCx pour les Cxs découvertes chez l'homme. Ainsi, la protéine de 43 kDa identifiée dans les jonctions *gap* est appelée connexine 43 (Cx43). Les Cxs paralogues de différentes espèces peuvent varier considérablement dans leur masse moléculaire mais les

critères fonctionnels peuvent aider à l'identification de Cxs homologues entre espèces, si la séquence seule n'est pas concluante. La famille des Cxs, chez l'homme, comprend actuellement 21 types de protéines.

Pour des cellules en culture, la demi-vie, très courte, de la plupart des Cx est comprise entre 1.5 et 4 h (Berthoud *et al.*, 2004). L'association des Cxs dans un connexon peut être identique ou différente comme le détaille la figure 17 (Yum *et al.*, 2007).

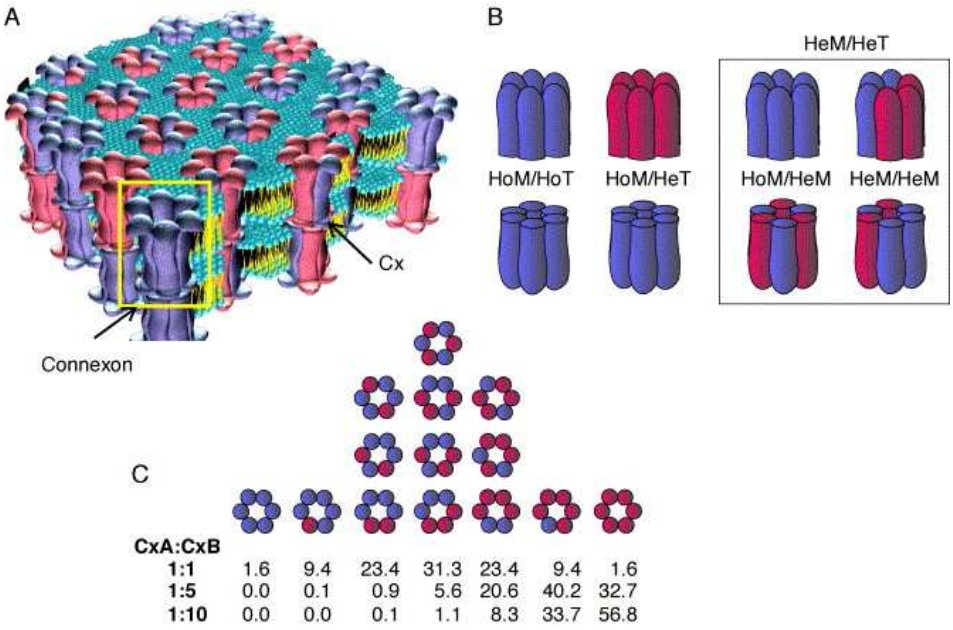

Figure 17 : Formation de canaux hétéromérique / hétérotypique. (A) Dessin illustrant les nombreuses possibilités de canaux à partir de cellules exprimant deux Cxs (CxA en bleu et CxB en rose). (B) Les connexons composés d'un seul isoforme de Cx sont appelés homomériques (HoM) tandis que les connexons composés de plusieurs isoformes sont dits hétéromériques (HeM). Lorsque deux connexons identiques s'associent, ils forment un canal homotypique (HoT) mais si les deux connexons sont différents, on parle alors de canal hétérotypique (HeT). Il existe deux types de canaux HeM/HeT : ceux contenant un connexon HoM et un connexon HeM (HoM/HeM) et ceux contenant deux HeM (HeM/HeM). (C) Représentation des 14 possibilités de connexons obtenues à partir de deux isoformes de Cx. Les valeurs associées correspondent à la fréquence des conformations en fonction du *ratio* des Cxs (Cottrell *et al.*, 2005).

Les études sur les associations de Cxs menées jusqu'à aujourd'hui ont permis de mettre en évidence des conformations possibles entre Cx comme décrit dans le tableau 1.

Tableau 1 : Compatibilité hétéromérique et hétérotypique entre Connexines de mammifères (Cottrell *et al.*, 2005).

	Cx26	Cx30	Cx30.3	Cx32	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx50
Cx50	+			+		-[b]	-[b]		+	+
Cx46	+			+		-[b]	+		+	+
Cx45	-[c]	-	-	-[b,c]	+	+		+		
Cx43[e]	-[b,c]	-	+[a]	-[b,c]	+	+	+	+	+	+[d]
Cx40	-[b,c]	+	+	-[b,c]	+	+	+			
Cx37[e]	-[c]	-	+[a]	-[b,c]	+		+			
Cx32	+	+[a]	-	+						
Cx30.3[e]		+	+							
Cx30	+[a]	+								
Cx26	+	+		+						

Les zones en jaunes correspondent à la compatibilité HeT, les zones en vert à la compatibilité HeM. Le + indique une compatibilité entre Cx, le –, une incompatibilité entre Cx. Les cases non remplies signifient que la compatibilité n'a pas encore été évaluée.

a données non publiées,
b la compatibilité a été étudiée à partir de pairs d'ovocytes, par conséquent elle ne peut pas s'appliquer à d'autres systèmes,
c la compatibilité HeT a été déterminée par le passage de traceur fluorescent et non par couplage électrique,
d la Cx de poulet (cCx56) homologue à la hCx50 a été utilisée,
e ces Cx forment également des canaux HeT avec la Cx38 de xénope.

- Topologie des connexines

L'analyse de l'hydropathie des séquences de plusieurs Cxs a montré la présence de 4 domaines hydrophobes comprenant chacun entre 20 et 28 résidus, référencés M1, M2, M3 et M4, depuis l'extrémité N- à l'extrémité C- terminale (Milks *et al.*, 1988). Deux boucles cytoplasmiques (E1 et E2), contenant chacune 3 résidus cystéines et une boucle cytoplasmique entre M2 et M3, sont caractéristiques. Les N- et C- *termini* sont cytoplasmiques (Yancey *et al.*, 1989) (Fig. 18).

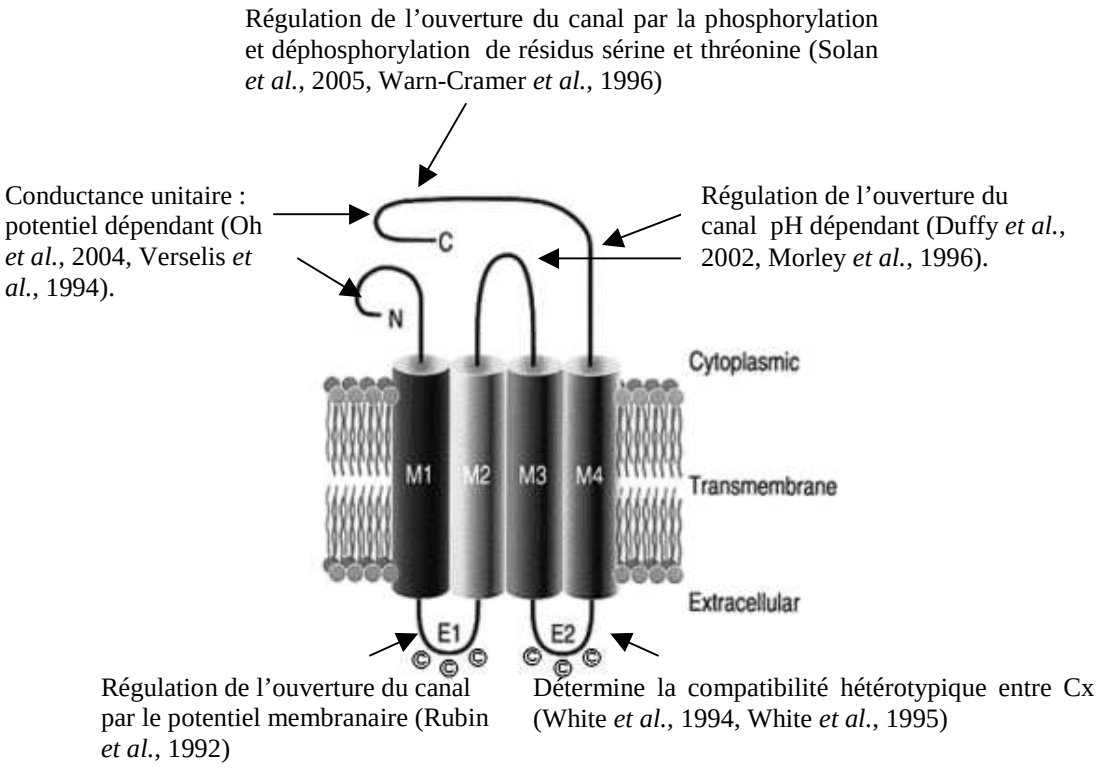

Figure 18 : Modèle topologique d'une connexine (Bruzzone *et al.*, 1996b, Söhl *et al.*, 2004). Les fonctions indiquées pour différents domaines sont des interprétations, parfois très hypothétiques.

Les quatre domaines transmembranaires et plus particulièrement les boucles E1 et E2 sont les régions les plus conservées entre les différentes Cxs (Kumar *et al.*, 1986, Beyer *et al.*, 1987). Les domaines les plus variables, à la fois en longueur et en séquence, sont le domaine C-terminal et la boucle cytoplasmique (Kovacs *et al.*, 2007). Ainsi, l'extrémité C-terminale comporte 18 acides aminés dans la Cx26 et 191 dans la Cx46, ce qui légitime les variations de poids des différentes protéines. Cette variabilité de l'extrémité C-terminale a permis la production d'anticorps spécifiques qui sont utilisés pour l'immunolocalisation des différentes Cx dans les tissus (Meda, 1996). La fixation bout à bout de deux connexons se produit *via* des interactions non covalentes entre les boucles extracellulaires des Cxs, qui par leur trois résidus cystéines forment des ponts disulfides intramoléculaires (Yeager *et al.*, 1996). Les trois régions transmembranaires M1, M2 et M4 sont composées principalement de résidus hydrophobes, tandis que M3 contient aussi un certain nombre de résidus chargés positivement et négativement. M3 est modélisée alors en une hélice α amphipatique dont la face hydrophile représenterait la paroi du pore du canal intercellulaire (Bennett *et al.*, 1991).

A partir de la topologie des Cxs, une seconde nomenclature utilisant les lettres grecques proposée par Hiesh (Hsieh *et al.*, 1991) est née. Elle est basée sur trois groupes de Cx : (i) le groupe α qui comprend les Cxs comportant une boucle cytoplasmique courte, (ii) le groupe ß comprenant les Cxs comportant une boucle cytoplasmique longue, (iii) le groupe γ créé récemment qui pourrait réunir des Cxs ayant une taille intermédiaire à cette boucle (Eiberger *et al.*, 2001), voir tableau 2.

Tableau 2 : Nomination des connexines murines et humaines selon les deux nomenclatures existantes (Eiberger *et al.*, 2001).

Groupe α		Groupe ß	
mCx30.2 mCx33 mCx37 mCx40 mCx43 mCx46 mCx50 mCx57	hCx31.9 hCx37 hCx40 hCx43 hCx46 hCx50 hCx62 hCx59	mCx26 mCx30 mCx30.3 mCx31 mCx31.1 mCx32	hCx25 hCx26 hCx30 hCx30.3 hCx31 hCx31.1 hCx32
Groupe γ		Cx non classées	
mCx45 mCx47	hCx45 hCx47	mCx23 mCx29 mCx36 mCx39	hCx23 hCx30.2 hCx36 hCx40.1

mCx : connexine murine

hCx : connexine humaine

On retrouve chaque type de Cx dans plusieurs tissus et la plupart des cellules synthétisent plusieurs Cx (Meda, 1996). Chaque isoforme produit des canaux ayant différentes propriétés de conductance unitaire, de perméabilité moléculaire et une sensibilité propre à la régulation chimique et électrique. Lorsqu'un canal est hétéromérique, les Cxs qui composent le connexon vont déterminer sa spécificité hétéromérique qui variera selon la composition de la jonction communicante (Harris, 2001). Du fait qu'il existe au moins 20 types de Cx, il existe 190 possibilités de conformation de jonctions *gap* hétérotypiques faisant ainsi varier la perméabilité de ces dernières (Cottrell *et al.*, 2005).

II.2.1.4 Synthèse, assemblage et dégradation

La translocation des protéines sur la membrane et leur transport intracellulaire constitue un processus fondamental dont les mécanismes apparaissent basiquement identiques pour toutes

les cellules eucaryotes. Les étapes de la synthèse, l'assemblage et la dégradation sont décrits sur la figure 19.

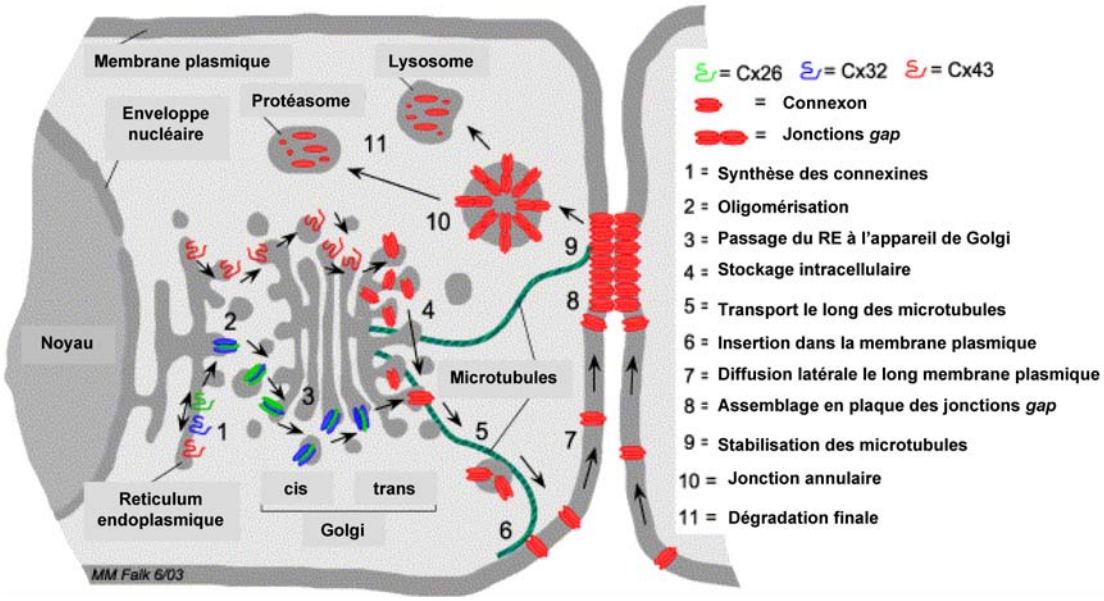

Figure 19 : Représentation schématique des étapes de la synthèse, de l'assemblage et de la dégradation des jonctions *gap* (Segretain *et al.*, 2004). La synthèse et la dégradation des canaux intercellulaires impliquent (1) la synthèse des connexines polypeptidiques dans les membranes du réticulum endoplasmique, (2) leur oligomérisation en connexon homo- ou hétéromérique, (3) le passage dans l'appareil de Golgi, (4) le stockage dans le réseau trans-golgien, (5) le transport le long des microtubules, (6) l'insertion des connexons dans la membrane plasmique, (7) la diffusion latérale des connexons le long de la membrane plasmique, (8) l'agrégation des canaux intercellulaires en plaques, (9) la stabilisation de l'extrémité des microtubules par liaison aux Cx43 des jonctions *gap*, (10) l'internalisation dans le cytoplasme des plaques sous la forme de jonctions annulaires et (11) la dégradation complète *via* les voies lysosomales et protéosomales.

- Synthèse

Les Cxs sont synthétisées et dégradées en continu. Comme les autres protéines membranaires intégrales, les Cxs sont co-traduites dans le réticulum endoplasmique *via* le translocon et les séquences de début et de fin de traduction. Bien que les Cxs ne soient pas glycosylées, on suppose qu'une ou plusieurs protéines chaperonnes, interviennent jusqu'à la fin de leur synthèse. Le fait que les résidus cystéines forment des ponts disulfures entre les boucles extracellulaires suggèrent que les Cxs sont au minimum sous la surveillance de protéines disulfides isomérases (Laird, 2006).

- Assemblages homo- et hétéromériques

Les jonctions communicantes, comme les autres canaux membranaires, sont oligomériques, leurs sous-unités devant s'assembler avant de fonctionner. La localisation de l'assemblage des Cxs suscite encore des controverses. La synthèse des Cxs, l'acquisition de la topologie transmembranaire ainsi que leur oligomérisation en demi-canal homomérique ou hétéromérique se déroulent dans le réticulum endoplasmique (RE). Lorsque l'oligomérisation de différents isoformes de Cx est étudiée *in vitro,* toutes les Cxs ne participent pas à la formation de connexons hétéro-oligomériques (Falk *et al.*, 1997). Cette observation suggère que l'interaction de différents isoformes est sélective, réduisant le nombre possible de connexons hétéro-oligomériques. Tous les connexons hétéro-oligomériques décrits à ce jour, sont composés de 2 membres du même sous-groupe. Ainsi, la Cx43 hétéro-oligomérise avec la Cx37, Cx40 et la Cx46 (toutes de types α), mais pas avec la Cx32 (un type β) (Falk, 2000). Par des méthodes biochimique et biophysique, des équipes ont observé l'assemblage de connexons composés de Cx43 ou Cx32 dans des microsomes après traduction/translocation membranaire dans un système de translation sans cellule (Falk *et al.*, 1997) suggérant que l'oligomérisation des Cxs se produit dans les membranes du RE. Cependant, en utilisant des cultures *in vitro,* Musil and Goodenough (Musil *et al.*, 1993) ont montré la formation des connexons après leur sortie du RE, probablement dans le réseau trans-golgien. Enfin, Diez *et al.* ont suggéré l'assemblage des connexons dans le compartiment intermédiaire RE-appareil de Golgi (REGIC) (Diez *et al.*, 1999). Récemment, en utilisant des Cxs modifiées génétiquement qui restent dans le RE, Das Sarma *et al.* (Sarma *et al.*, 2002) ont suggéré que le lieu de l'assemblage pourrait être spécifique de l'isoforme de la Cx. En effet, ils ont observé l'oligomérisation des Cx32 dans le RE/REGIC et des Cx43 dans le réseau trans-golgien (Segretain *et al.*, 2004). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la compatibilité sélective des différents isoformes : (i) Différentes Cxs peuvent être synthétisées dans des régions différentes du RE et par conséquent, n'auront pas de contact physique permettant l'hétéro-oligomérisation ; (ii) Des molécules chaperonnes spécifiques peuvent se lier à certaines Cxs pour prévenir leur interaction ; (iii) Des signaux spécifiques encodés dans la séquence polypeptidiques des Cxs pourraient réguler l'interaction des différents isoformes et permettre l'hétéro-oligomérisation d'isoformes compatibles (Segretain *et al.*, 2004). Le stockage des connexons a lieu dans le réseau trans-golgien.

- Transport

Lauf *et al*. ont étudié la distribution des connexons assemblés à partir de Cx43 couplées à la *green fluorescent protein* (GFP) dans des cellules HeLa transfectées (Lauf *et al.*, 2002). La microscopie temporelle en marquages multiples a permis d'observer le transport des connexons à l'intérieur de vésicules, le long des microtubules, depuis l'appareil de Golgi vers la membrane cytoplasmique. Martin *et al.* rapportent que la Cx26 et d'autres Cx peuvent circuler le long de microtubules non encore orientés vers la membrane plasmique (Martin *et al.*, 2001). Ces observations pourraient expliquer pourquoi des Cx peuvent être transportées vers la membrane plasmique malgré la désorganisation des microtubules et des membranes du Golgi. Les filaments d'actine semblent également impliqués dans le transport des Cxs, particulièrement de la Cx26 (Martin *et al.*, 2004).

- Localisation sur la membrane plasmique et formation d'une jonction communicante

Une fois insérée dans la membrane plasmique, les connexons diffusent librement le long de la bicouche lipidique sous le guidage de N et E –cadhérine (Laird, 2006). Le contact entre deux cellules provoque en quelques minutes une concentration des connexons qui s'associent bout à bout avec ceux de la cellule voisine pour donner naissance aux jonctions *gap* (Meda, 1996). Gaietta *et al.* ont démontré que les jonctions *gap* nouvellement formées se trouvent sur la couronne externe de la plaque tandis que les canaux les plus anciens sont eux au centre des plaques (Gaietta *et al.*, 2002). Les canaux sont donc distinctement localisés en fonction de leur âge (Lauf *et al.*, 2002). Actuellement, on suppose que les canaux au centre des plaques sont destinés à être internalisés puis dégradés (Laird, 2006).

- Internalisation et dégradation des canaux

En 1977, de larges structures vésiculaires à double membranes dites jonctions annulaires ont été identifiées par microscopie électronique (Laird, 2006). On suppose qu'elles correspondent aux produits de l'internalisation de plaques ou de fragments de celles-ci par une cellule. En 2001, Jordan *et al*. démontrent que ces jonctions annulaires sont des plaques de jonctions *gap* préexistantes aux interfaces de contact cellule-cellule par la microinjection d'anticorps anti-Cx43 associées à des Cx43 marquées à la GFP (Jordan, Chodock et al. 2001). La dégradation des jonctions *gap* ne correspond pas à la séparation des demi-canaux mais à l'internalisation

des jonctions communicantes en jonctions annulaires (Jordan *et al.*, 2001, Gaietta *et al.*, 2002). Ces dernières seront détruites par voie lysosomale et protéosomale ubiquitine dépendante (Segretain *et al.*, 2004, Qin *et al.*, 2003). Les jonctions annulaires se distinguent par une centaine de canaux quittant la surface cellulaire en une seule fois en déclenchant une brusque diminution de la communication intercellulaire. Laird précise que bien que les jonctions annulaires aient été identifiées dans une grande variété de types cellulaires, il est important de noter que ces structures sont difficiles à observer dans certaines cellules telles que les hépatocytes. Cette remarque sous entend la possibilité d'une internalisation des Cxs par des procédés plus classiques impliquant des mécanismes endosomaux (Laird, 2006).

La mise en place de la communication intercellulaire dépend donc de l'exécution coordonnée d'une série d'événements incluant (Bruzzone *et al.*, 1994) :

- La synthèse des Cxs ;
- L'oligomérisation des monomères de Cx en connexon ;
- La translocation des connexons sur la membrane plasmique et l'accumulation au site d'apposition cellule-cellule ;
- L'interaction avec le connexon « partenaire » de la cellule adjacente ;
- L'ouverture du canal intercellulaire formé.

II.2.1.5 Phosphorylation des connexines

De nombreuses Cxs ne contiennent pas seulement une séquence consensus de phosphorylation de type protéine kinase mais sont aussi phosphorylées par des protéines kinases *in vitro*. L'extrémité C-terminale des Cxs est la région primaire qui devient phosphorylée. Cependant, la Cx56 peut être aussi phosphorylée au niveau de la boucle cytoplasmique (Berthoud *et al.*, 1997). Aucune phosphorylation de l'extrémité N-terminale n'a été mise en évidence à ce jour (Lampe *et al.*, 2004). La Cx26 est la seule Cx à ne pas être phosphorylée (Traub *et al.*, 1989) en raison des quelques acides aminés de son extrémité C-terminale qui pourraient interagir avec des éléments de signalisation cytoplasmique. Puisque la Cx26 forme des canaux fonctionnels, la phosphorylation des Cxs n'est donc pas nécessairement indispensable à la formation de jonctions *gap*. Par analogie à la Cx26, des mutants de la Cx43 tronquée dont l'extrémité C-terminale est réduite, peuvent néanmoins former des canaux fonctionnels, mais ils présentent alors une perméabilité différente ainsi que des propriétés électrophysiologiques modifiées par rapport à la Cx43 sauvage (Fishman *et al.*, 1991). L'importance du domaine C-terminal dans la modulation de la fonctionnalité des

jonctions communicantes a pu être mise en évidence par de nombreuses approches (Lampe *et al.*, 2004).

II.2.1.6 Phosphorylation de la Connexine 43

Musil, Goodenough, Lau et d'autres équipes ont mis en évidence que la Cx43 est phosphorylée différemment tout au long de son « cycle de vie » (Musil *et al.*, 1990, Musil *et al.*, 1991a, Moreno *et al.*, 2007) (Figure 6). La Cx43 présentent de multiples isoformes électrophorétiques lorsqu'elle est analysée par électrophorèse (SDS-PAGE), avec une forme qui migre plus rapidement : la Cx43 non-phosphorylée (P0 ou NP) et deux formes qui migrent plus lentement, appelées communément P1 et P2. Ces 2 formes co-migrent avec P0 suite au prétraitement par une phosphatase alcaline, suggérant que la phosphorylation est la modification covalente primaire détectée par les analyses par SDS-PAGE (Musil *et al.*, 1990). L'analyse des acides phospho-aminés indique que la majorité des phosphorylations de la Cx43 se situe sur les résidus sérines (Warn-Cramer *et al.*, 1996, Lampe *et al.*, 1998), bien que la phosphorylation de la tyrosine ait été aussi décrite en présence de la protéine $pp60^{src}$ activée (Swenson *et al.*, 1990). La Cx43 ne contient pas de résidus sérine dans sa boucle intracellulaire pour des fibroblastes cultivés *in vitro*. La phosphorylation initiale de la Cx43 s'observe dans les 15 min suivant sa synthèse. La phosphorylation de la Cx43 peut donc se dérouler avant qu'elle n'atteigne la membrane cytoplasmique (Crow *et al.*, 1990). La pertinence fonctionnelle de ces événements de phosphorylation précoces doit encore être démontrée mais ils pourraient être impliqués dans le trafic de la Cx43 depuis le RE, l'oligomérisation de la Cx43 en connexon, ou la sortie des connexons composés de Cx43 depuis le réseau trans-Golgien. Aucune expérience n'a permis de mettre en évidence un lien direct entre la phosphorylation de la Cx43 et la régulation de l'oligomérisation de cette Cx en connexon. La coupure de la Cx43 à partir du résidu 251 (acides aminés 252 à 382 soit 20 sur 21 des résidus sérines de la région C- terminale) n'a aucun effet sur l'oligomérisation, mais la protéine tronquée apparait alors transportée vers la membrane plasmique avec moins d'efficacité (Martinez *et al.*, 2003). Puisque la Cx43 non phosphorylée peut être trouvée dans la membrane plasmique (Musil *et al.*, 1991a), les événements précoces de phosphorylation pourraient être transitoires ou simplement inutiles pour induire le transport vers la membrane plasmique (Solan *et al.*, 2005). En accord avec la dernière idée, la phosphorylation de seulement une ou deux sous-unités d'un connexon peut être suffisante pour permettre un trafic efficace dans l'appareil de Golgi ou pour le transport vers la membrane plasmique. Bien que la Cx43, dans les régions non jonctionnelles de la membrane plasmique, ne soit pas

nécessairement décrite comme étant phosphorylée, la Cx43 localisée dans les jonctions *gap* est principalement phosphorylée sous la forme P2 (Musil *et al.*, 1991a). Si les événements de phosphorylation causant la formation de P2 sont nécessaires ou non pour la formation ou la stabilisation des jonctions *gap*, ces événements de phosphorylation ne sont probablement pas sans conséquences (Solan *et al.*, 2005).

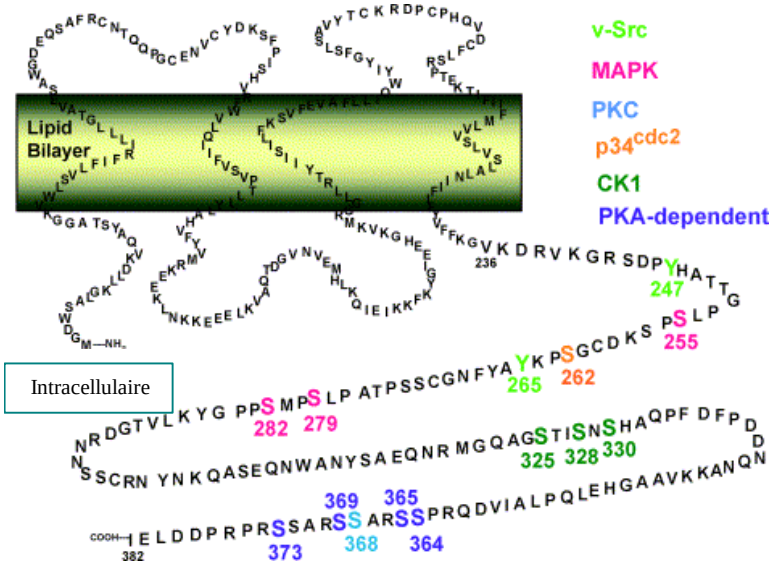

Figure 20 : Sites phosphorylés de la Cx43. Les sites de phosphorylation ciblés par les protéines kinases connues sont : Src, en vert clair ; MAPK, rose; PKC, bleu; p34^{cdc2}, orange; CK1, en vert foncé et PKA-dependante, violet (Solan *et al.*, 2005).

Basée sur plusieurs études, la Cx43 peut subir de multiples phosphorylations. En effet, au moins cinq résidus serines phosphorylés ont été découverts dans la Cx43 isolée de cellules non stimulées et davantage dans des cellules traitées avec un facteur de croissance ou un activateur de kinase (Cooper *et al.*, 2000). Ces événements de phosphorylation ont été corrélés avec des changements dans l'assemblage, l'acquisition de l'insolubilité au Triton X-100 et la dégradation des canaux composés de Cx43. Ils pourraient donc jouer des rôles critiques dans la régulation de la communication intercellulaire.

II.2.2 Ouverture et fermeture des jonctions *gap*

La fermeture des jonctions *gap* peut être observée dans plusieurs conditions physiologiques.

II.2.2.1 Concentration du calcium intracellulaire

L'ouverture des jonctions *gap* semble pouvoir être modulée par des événements calcium dépendants puisque une forte augmentation de la concentration intracellulaire de calcium

déclenche la fermeture des jonctions *gap* (Wei *et al.*, 2004). La calmoduline pouvant se lier à la Cx32, pourrait servir de médiateur à cet effet.

II.2.2.2 pH intracellulaire

Des sites de régulation de l'ouverture des canaux en fonction du pH ont été décrites pour les Cxs. Des études ont mis en évidence des variations de la sensibilité à l'acidification intracellulaire en fonction de la nature homotypique et hétérotypique des jonctions *gap* (Wei *et al.*, 2004).

II.2.2.3 Potentiel transjonctionnel

Les Cxs sont sensibles au potentiel trans-jonctionnel. Il est démontré aujourd'hui que la dépendance au potentiel des canaux intercellulaires est déterminée par la nature des Cxs qui les composent. Des études ont mis en évidence des variations de la sensibilité au potentiel trans-jonctionnel en fonction de la nature homotypique et hétérotypique des jonctions *gap* (Wei *et al.*, 2004). Basé sur la comparaison de la régulation de l'ouverture des jonctions *gap* qu'ils soient hétérotypique ou homotypique, les Cxs ont été provisoirement divisées en deux groupes en fonction de la polarité à laquelle le canal se ferme : positive pour les Cx26, Cx30, Cx37, Cx40, Cx46 et Cx50 ou négative pour les Cx32, Cx43, Cx45 ou Cx31 (González *et al.*, 2007).

II.2.3 Propriétés physiologiques des jonctions communicantes

II.2.3.1 Couplage électrique

Les jonctions *gap* permettent une communication électrique entre les cellules, démontrée dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire. Ce couplage a été détecté par un enregistrement effectué avec des microélectrodes de haute résistance placées entre des cellules cardiaques (Weidmann, 1952). En 1963, par microscopie électronique, une corrélation a été décrite entre le couplage électrique et la présence des jonctions communicantes (Robertson, 1963). Le couplage électrique, mis en évidence dans un premier temps dans des tissus excitables, fût ensuite démontré dans les tissus épithéliaux tels que les hépatocytes de souris (Penn, 1966). Le couplage électrique par échange d'ions est indispensable à certains types cellulaires dont les fonctions sont associées à une dépolarisation (neurones, cellules musculaires lisses,

cellules sécrétrices et sensorielles) (Meda, 1996). Cette forme de couplage génère une réponse synchronisée des cellules (Bruzzone *et al.*, 1996a). Le couplage électrique peut être évalué en mesurant la conductance des jonctions *gap* par la technique de *patch clamp* présentée dans la **partie II.4**

II.2.3.2 Couplage métabolique

En 1966, Kanno et Loewenstein observent l'échange de molécules cytoplasmiques entre cellules sans passer *via* le milieu extracellulaire. La diffusion de molécules hydrophiles par les jonctions communicantes venait d'être mise en évidence (Kanno *et al.*, 1966). Différentes approches ont montré que les jonctions communicantes sont perméables à des nucléotides, des acides aminés, des cofacteurs vitaminiques, de petits peptides, des sucres et des seconds messagers (AMPc, inositol triphosphate (IP_3)) (Meda, 1996). Cette propriété met en avant l'importance des jonctions communicantes pour certaines fonctions biologiques.

II.2.3.3 *Perméabilité sélective des jonctions gap*

Le passage des ions et des molécules se fait le long d'un gradient électrochimique. Alors que les jonctions *gap* sont perméables à la plupart des ions et à de très nombreuses molécules, la diversité de leur fonction est attribuée à la diversité des Cxs synthétisées dans une cellule. Les spécificités d'appariement des Cxs et de perméabilité qui en résultent, suggèrent des échanges sélectifs dans une direction préférentielle ou distincte selon les seconds messagers (Meda, 1996). Toutes les molécules de poids supérieurs à 1 kDa ne diffuseront pas par les jonctions communicantes quelque soit le type de Cx dont est composée la jonction communicante. Plusieurs approches ont été menées pour déterminer les propriétés de perméabilité des jonctions *gap.* Ces études comprennent la mesure de conductance unitaire ou la sélectivité en fonction de la charge ionique (e.g., K, Cl)(Harris, 2007). Des traceurs fluorescents de différents poids moléculaires et charges tels que le *Lucifer Yellow* (Stewart, 1978), l'iodure de propidium (Elfgang *et al.*, 1995) ou la neurobiotine ont été testés pour évaluer la sélectivité et la perméabilité des jonctions *gap* composées de différentes Cxs *in vitro* et *in vivo* (De Maio et al., 2002). De façon primordiale, les molécules plus petites qui diffèrent par leur dimension, forme et charge peuvent être incorporées ou effluées différemment en fonction des Cxs composant le canal entrainant ainsi, une grande variété de sélectivité moléculaire trans-jonctionelle (Laird, 2006). Le variation de la conductance unitaire est comprise entre 10

pSiemens et 300 pS (Harris, 2007). Les études de sélectivité et perméabilité portant sur des molécules cytoplasmiques ont montré dans les cas où les molécules ont été testées directement, des variations importantes de perméabilité de Cxs spécifiques concernant particulièrement les molécules qui médient directement la signalisation intracellulaire telles que l'AMPc ou l'IP_3 (Bevans *et al.*, 1998).
La perméabilité des jonctions *gap* est aussi fonction d'autres paramètres tels que le nombre de plaques jonctionnelles au niveau de la membrane de la cellule considérée (Nitsche *et al.*, 2004) et de la probabilité d'ouverture d'une jonction *gap* variant de 0,6 à 0,9 (Goldberg *et al.*, 2004).

II.2.3.4 Fonctions physiologiques dans un tissu sain

La distribution des Cxs quasiment à toutes les cellules montre la participation des jonctions *gap* à de multiples fonctions (Tableau 3). Certaines Cxs sont produites par de très nombreux types cellulaires comme la Cx43 alors que d'autres Cxs ont une distribution beaucoup plus restreinte telle que la Cx30.3 (Meda, 1996, Bruzzone *et al.*, 1996b, Bruzzone *et al.*, 1996a).

Tableau 3 : Connexines humaines et leur expression majeure dans un organe, un tissu ou un type cellulaire (Oyamada *et al.*, 2005, Willecke *et al.*, 2005)

Cx humaine	
hCx23	NI
hCx25	NI
hCx26	Sein, cochlée, placenta, hépatocytes, peau, pancréas, rein, intestin
hCx30	Cerveau, cochlée, peau
hCx30.2	Cerveau, moelle épinière, cellules de Schwann
hCx30.3	Peau, rein
hCx31	Cochlée, placenta, peau
hCx31.1	Peau
hCx31.9	Système de la conduction cardiaque, cellules du muscle lisse vasculaire
hCx32	Cellules de Schwann, hépatocytes, cellules acineuses sécrétrices
hCx36	Neurones, cellules β pancréatiques
hCx37	Endothélium, cellules granulosa, poumon, peau
hCx40	Système de la conduction cardiaque, endothélium, poumon
hCx40.1	Fibres du muscle strié en développement
hCx43	Nombreux types cellulaires
hCx45	Système de la conduction cardiaque, cellules musculaires lisses, neurones
hCx46	Cristallin
hCx47	Cerveau, moelle épinière
hCx50	Cristallin
hCx59	NI
hCx62	Cellules horizontales de la rétine

NI : non identifiée

Les canaux intercellulaires participent à la régulation de divers processus tels que :

- La contraction des muscles cardiaques et lisses (Risek *et al.*, 1990). Ainsi, juste avant l'accouchement, on observe une multiplication par cinq du nombre de jonctions *gap* en corrélation avec une hausse de l'expression des Cx43 dans le muscle utérin en réponse à la modification du taux d'hormones stéroïdiennes. L'augmentation brutale de la communication intercellulaire pourrait permettre à l'utérus d'effectuer des contractions synchrones pour développer la force nécessaire à la délivrance de l'enfant. Habituellement, l'activité du muscle utérin est relativement quiescente (Döring *et al.*, 2006).

- La transmission des signaux neuronaux aux synapses électriques (Furshpan *et al.*, 1957, Bennett, 1997). Les jonctions *gap* permettent le couplage électrique entre les neurones et pourraient réguler et/ou synchroniser le réseau d'activité neuronal.
- La compartimentation cellulaire lors du développement embryonnaire. Une subdivision fonctionnelle de la communication intercellulaire en plusieurs compartiments a été observée coïncidant avec des domaines en développement (Wei *et al.*, 2004). De tels compartiments de communication peuvent permettre la génération d'un gradient morphogène qui régule la prolifération, la migration et la différentiation cellulaire (Levin, 2007). Des études en embryologie ont également montré l'implication des jonctions communicantes dans le modelage droite-gauche (Esser *et al.*, 2006).
- Le contrôle de la croissance cellulaire (Loewenstein *et al.*, 1992). Les canaux intercellulaires sont considérés comme un mécanisme régulateur clé du contrôle de l'homéostasie par le couplage métabolique qu'ils opèrent.

II.2.3.5 Jonctions gap et pathologies

Les études actuelles basées sur l'utilisation de souris transgéniques ont clairement mis en évidence le rôle indispensable des Cxs dans le développement et la fonctionnalité des tissus et organes (Willecke *et al.*, 2002, Zaidan Dagli *et al.*, 2007) (voir Tableau 4). L'absence des Cxs majeures, Cx32 et Cx43, n'affecte pas le développement général de la souris (Reaume *et al.*, 1995, Anzini *et al.*, 1997). Ce constat sous-entend le remplacement probable de la Cx manquante par d'autres Cxs pour compenser en partie l'anomalie (Mesnil, 2002).

Des études cliniques ont permis l'identification d'un nombre croissant de maladies génétiques causées par des mutations des Cxs.

Trois classes majeures de mutations sont reconnues (Evans *et al.*, 2002) :

- La classe 1 correspond aux mutations qui n'ont pas d'effet discernables sur la fonctionnalité des jonctions communicantes que ce soit pour les propriétés électriques ou la diffusion de sondes fluorescentes.
- La classe 2 inclue les mutations entraînant des anomalies d'ouverture des canaux intercellulaires.

- La classe 3 symbolise les Cxs où les mutations déclenchent un échec du transport des Cxs vers la membrane cytoplasmique et de l'assemblage en jonctions *gap*. Les Cxs non assemblées restant concentrées principalement dans le RE.

L'analyse des conséquences fonctionnelles ou cliniques de ces maladies en fonction des Cxs touchées permet d'appréhender le rôle de la diversité des Cxs *in vivo*. Actuellement, huit maladies distinctes sont liées directement à des mutations germinales des Cxs (Laird, 2006) de la plus courante, la surdité neurosensorielle non syndromique (Liu *et al.*, 1997, Allagnat *et al.*, 2005) à la plus rare, la dysplasie Oculo-Dento-Digitale (Paznekas *et al.*, 2003) (Tableau 4).

Tableau 4 : Phénotypes des souris déficientes en Cx (souris *knock-out*) et maladies humaines héréditaires associées à des mutations des Cx correspondantes (Evans *et al.*, 2002, Allagnat *et al.*, 2005)

Cx murine	Phénotype des souris *knockout*	Maladie humaine héréditaire	Cx humaine
mCx26	Létal au 11ème jour de l'embryon	Surdité neurosensorielle non syndromique Hyperkeratose palmoplantaire	hCx26
mCx30	Affaiblissement de l'audition	Surdité neurosensorielle non syndromique Dysplasie ectodermique hydrotique Perte des cheveux Déficience mentale	hCx30
mCx30.3	ND	*Erythrokeratodermia variabilis*	hCx30.3
mCx31	Dysmorphogenèse placentaire transitoire	Baisse de l'audition *Erythrokeratodermia variabilis* Neuropathies périphériques	hCx31
mCx32	Diminution de la dégradation du glycogène, augmentation de l'incidence de cancer du foie	Syndrome de Charcot Marie Tooth lié au chromosome X	hCx32
mCx36	Déficit visuel	Epilepsie myoclonique juvénile	hCx36
mCx37	Stérilité des femelles, hémophilie	ND	hCx37
mCx40	Arythmie cardiaque	ND	hCx40
mCx43	Malformation cardiaque et arythmie ventriculaire	Dysplasie Oculo-Dento-Digitale Hétérotaxie viscéroatriale	hCx43
mCx45	Létal au 15ème jour de l'embryon	ND	hCx45
mCx46	Cataracte zonula nucléaire	Cataracte congénitale	hCx46
mCx50	Cataracte congénitale Microphtalmie	Cataracte héréditaire	hCx50

ND : Non Déterminé.

Les paragraphes ci-dessous sont des exemples non exhaustifs de mutations des Cxs impliquées dans des maladies héréditaires entraînant des modifications de la communication intercellulaire.

- Mutations de la Cx26

Une mutation de la Cx26 peut déclencher une surdité associée à une maladie dermatologique ou juste une surdité suggérant une relation complexe entre les modifications fonctionnelles dans le génotype codant la Cx et le phénotype qui en résulte (Kelsell *et al.*, 2001). La Cx26 est impliquée dans plus de 50% des cas de surdité héréditaire non syndromique (White *et al.*, 1999b, Allagnat *et al.*, 2005). Actuellement, jusqu'à cent mutations ont été identifiées comme étant liées à une surdité seule et douze mutations supplémentaires associant à la fois la surdité et des problèmes cutanés (Laird, 2006). Ces dernières se localisent sur le premier tiers du gène codant la Cx26 et sont typiquement des mutations autosomales dominantes. L'étude de certaines de ces mutations a permis de déterminer leurs conséquences sur la communication intercellulaire. Ainsi, les protéines mutantes peuvent rester localisées dans les organites intracellulaires ou entraîner la formation de jonctions *gap* non fonctionnelles au niveau de la membrane cytoplasmique.

- Mutations de la Cx32

Environ 270 mutations du gène codant la Cx32 sont décrites pour le syndrome de Charcot-Marie-Tooth lié au chromosome X (CMTX). La majorité de ces mutations entraînent une aberration du transport de la Cx32 vers la membrane cytoplasmique, des problèmes d'assemblage en jonction *gap* et des anomalies fonctionnelles (Zhou *et al.*, 2003). La CMTX est la première maladie héréditaire découverte liée à une mutation des Cxs (Bergoffen *et al.*, 1993). De la famille des neuropathies périphériques, elle se caractérise par une dégénérescence progressive de la gaine de myéline entourant les axones.

- Mutations de la Cx43

La Dysplasie Oculo-Dento-Digitale (ODDD) est liée à des mutations dominantes du gène codant la Cx43 (Paznekas *et al.*, 2003). Ving-huit mutations sont connues à ce jour dont une touchant l'extrémité C-terminale, ce qui entraîne une perte de certains sites de phosphorylation et des domaines de liaison aux autres protéines. L'ODDD est une maladie congénitale qui se caractérise par un développement anormal du visage, des yeux, de la dentition et des membres ainsi que par d'autres atteintes de type auditive, neurologique,

cardiaque et dermatologique (Laird, 2006). Ces symptômes correspondent aux nombreuses localisations tissulaires de la Cx43 (Allagnat *et al.*, 2005).

L'hétérotaxie viscéro-atriale ou syndrome d'Ivemark se caractérise par des mutations de la Cx43 entraînant généralement la substitution du résidu sérine 364 par un résidu proline ainsi que des anomalies aux sites de phosphorylation de la protéine (Britz-Cunningham *et al.*, 1995). Les études menées sur ces mutations ont montré une communication intercellulaire fonctionnelle mais régulée anormalement par des protéines kinases dépendantes de l'AMPc. Cliniquement, les malades présentent le plus souvent de sévères malformations cardiaques avec une absence de rate, associées à des formes plus ou moins complètes de *situs invertus* thoracique et abdominal (Meda, 1996).

II.3 JONCTIONS COMMUNICANTES ET CANCER

Etant donné le rôle clé des jonctions *gap* dans le contrôle de l'homéostasie, il n'est pas surprenant que les Cxs et les canaux qui en résultent soient fréquemment ciblés lors d'un déréglement de l'homéostasie comme pour le cancer.

II.3.1 Cancer et anomalie de l'expression des Connexines

II.3.1.1 Historique

En 1966, Loewenstein et Kanno observent, à l'inverse des hépatocytes normaux, un déficit du couplage électrique pour des hépatomes de rat (Loewenstein, 1966, Penn, 1966). Ce phénomène a été mis en évidence pour des hépatomes induits chimiquement et d'autres transplantés de Morris et Novikoff, modèles développés par les scientifiques du même nom (Novikoff, 1955, Morris *et al.*, 1960) chez le rat (Loewenstein *et al.*, 1966, Loewenstein *et al.*, 1967). Ils suggèrent pour la première fois une relation entre une anomalie de la communication intercellulaire et la croissance incontrôlée des cellules néoplasiques. Par la suite, les études par couplage électrique de tumeurs thyroïdiennes chez les rongeurs et de carcinomes de l'estomac issus de pièces opératoires d'homme, ont corroboré cette observation (Jamakosmanovic *et al.*, 1968, Kanno *et al.*, 1968). La même année, Borek et Sachs montrent que la perte de la propriété « d'inhibition de contact » pour des cellules cancéreuses est associée à une absence de communication intercellulaire (Borek *et al.*, 1966). Le défaut de couplage électrique apparaît alors être une caractéristique commune de tumeurs solides

induites par différents procédés (chimiques, transplantées ou spontanées), d'espèces variées (homme, rongeurs) et d'organes (foie, thyroïde, estomac) (Mesnil *et al.*, 2005).

II.3.1.2 Inhibition de la communication intercellulaire par les promoteurs de tumeur

En 1979, deux équipes montrent qu'un promoteur tumoral, le tétradécanoyl 12-13 phorbol acétate (TPA), extrait du Croton (une plante verte), inhibe la communication intercellulaire de cellules *in vitro* (Murray *et al.*, 1979, Yotti *et al.*, 1979). Ces données, établissant un lien concret entre les jonctions communicantes et la cancérogenèse furent confirmées à partir d'autres types cellulaires *in vitro* et permirent de considérer la plupart des promoteurs tumoraux comme étant des inhibiteurs de la communication intercellulaire à des doses subtoxiques (Mesnil, 2004, Budunova *et al.*, 1994). Les études menées *in vivo*, chez le rat, ont montré que les composés chimiques, tels que des pesticides ou le phénobarbital connus comme étant des promoteurs du cancer du foie, induisaient également une diminution du nombre et de la fonctionnalité des jonctions *gap*, une localisation cytoplasmique des Cxs ou l'expression de Cxs habituellement indétectables (Bager *et al.*, 1994, Krutovskikh *et al.*, 1995)

II.3.1.3 Caractéristiques

Le nombre de jonctions *gap*, l'expression des Cxs et le couplage jonctionnel ont fait l'objet d'études ultrastructurales, biochimiques, immunologiques grâce à l'introduction de traceurs fluorescents ou de sondes radioactives diffusant *via* les jonctions communicantes. La majorité des cellules cancéreuses se caractérisaient par une diminution du nombre et de la fonctionnalité des *gap junctions*, par comparaison à leurs homologues saines (Mesnil *et al.*, 2005), accompagnée d'un accroissement de la prolifération cellulaire. Ces anomalies de communication ont été observées dans de nombreuses lignées tumorigéniques et *in situ* (Tableau 5) mettant en avant l'implication des Cxs dans le processus de cancérogenèse.

Tableau 5 : Expression et caractéristiques des Cx révélées par des études *in situ* dans des tumeurs humaines (Mesnil, 2004)

Type de tumeur	Cx étudiées	Altérations répertoriées	Références
Dysplasie du col de l'utérus	Cx43	Expression réduite	(King *et al.*, 2000b)
Adénocarcinome du côlon	Cx43	Mutations de l'extrémité carboxylique cytoplasmique et expression du mutant dans les zones invasives	(Dubina *et al.*, 2002)
Carcinome de l'estomac	Non déterminé	Perte du couplage ionique	(Loewenstein, 1979)
Hépatocarcinome		Diminution du couplage	(Krutovskikh *et al.*, 1994)
	Cx32	Localisation cytoplasmique	
	Cx43	Expression anormale (absente dans tissu sain) Localisation cytoplasmique	
Carcinome du larynx	Cx26 Cx30 Cx43	Détection hétérogène (alternance de zones avec et sans expression)	(Schneider *et al.*, 2002)
Tumeur de prostate à différents grades histologiques	Cx32 et Cx43	Coexpression membranaire (tumeurs différenciées) ou cytoplasmique (tumeur indifférenciées)	(Mehta *et al.*, 1999)
		Perte d'expression d'une Cx, des deux isoformes	(Habermann *et al.*, 2002)
Carcinome du sein	Cx43	Perte d'expression des Cx43	(Laird *et al.*, 1999)
Carcinome de la tête et du cou	Cx31.1	Diminution d'expression des Cx31.1	(Al Moustafa *et al.*, 2002)

Wilgenbus *et al.* ont comparé l'expression des Cx26, Cx32 et Cx43 pour des tissus néoplasiques *versus* leurs homologues sains correspondant. Les tissus bénins ont montré une expression normale des Cxs tandis qu'une diminution ou une anomalie de leur expression étaient caractéristiques des tumeurs malignes (Wilgenbus *et al.*, 1992). De nombreux mécanismes interviennent dans la perte de la communication intercellulaire pendant le processus de cancérogenèse. Cependant, la mutation des gènes codant les Cxs est rare. Ce sont plutôt des modifications épigéniques telle qu'une hyperméthylation de l'ADN qui peut annihiler l'expression génique des Cxs (Vinken *et al.*, 2006). Une phosphorylation anormale par hyperphosphorylation ou déphosphorylation, une localisation anormale des protéines (dans le cytoplasme et autour du noyau) et un défaut d'assemblage des jonctions

communicantes sont fréquemment observés (Omori *et al.*, 2001). Ces observations sont répertoriées *in vivo* et *in vitro* indépendamment de la localisation de la tumeur. Pour certains types cellulaires, la relocalisation des Cxs peut être attribuée à une perte des protéines d'adhésion de E-cadhérine ou α caténine (Hernandez-Blazquez *et al.*, 2001, Leithe *et al.*, 2006, Govindarajan *et al.*, 2002).

Selon Trosko *et al.*, les cellules cancéreuses déficientes en communication intercellulaire pourraient être classées selon deux types (Trosko, 2007) : (i) Le type I, telles que les cellules HeLa et MCF-7, avec une transcription supprimée du gène codant les Cxs, (Momiyama *et al.*, 2003, King *et al.*, 2000a) (ii) ; Le type II présentant des Cxs devenues non fonctionnelles par l'activation d'oncogène ou par la mutation du gène codant la Cx ou encore par la mutation d'un gène régulateur de Cx (Trosko *et al.*, 2002).

Cependant, des cellules néoplasiques se caractérisent par une densité de jonctions *gap*, comparable à leurs homologues saines avec une fonctionnalité identique voire supérieure (Trosko *et al.*, 1998). Elles sont donc capables de communiquer entre elles, mais néanmoins, peu ou pas avec le tissu sain correspondant, par absence de communication hétérologue (Cesen-Cummings *et al.*, 1998, Garber *et al.*, 1997). De fait, ce n'est plus chaque cellule cancéreuse qui s'isole de la régulation du tissu environnant mais tout le tissu néoplasique (Ruch, 1994). L'incapacité des cellules tumorales à communiquer avec des cellules normales est décrit comme étant probablement liée à des différences surfaciques (glycosylation, molécules d'adhésion) qui empêchent un contact cellule-cellule adéquat pour permettre la formation de jonctions *gap* (Trosko *et al.*, 1998).

II.3.1.4 Caractérisation de l'expression des Connexines pour le cancer de la vessie

L'étude de lignées cancéreuses issues de tumeurs de vessie humaine a montré une perte de l'expression des Cx26 associée au phénotype malin contrairement au Cx43 où l'expression est sans relation avec la capacité ou non à établir une communication intercellulaire (Grossman *et al.*, 1994). L'expression des Cx26 diminue de façon hétérogène *in situ* sans distinction claire en fonction de grade de la tumeur (Gee *et al.*, 2003), (Tableau 6). D'autres équipes ont démontré qu'une exposition de la vessie aux agents carcinogènes du tabac de type nitrosamine, entrainait une inhibition réversible de l'expression de la Cx43 et de la communication intercellulaire. La Cx43 retrouve son niveau d'expression constitutif dans les 24 h qui suivent le retrait de contact avec l'agent cocarcinogène (Lyng *et al.*, 1996). Ces résultats montrent que la Cx43 pourrait jouer un rôle majeur dans les étapes précancéreuses

tandis que la Cx26 aurait un rôle prépondérant dans les étapes suivantes de la progression du cancer. Cependant, les données disponibles restent disparates pour confirmer cette hypothèse (Mesnil *et al.*, 2005).

Tableau 6 : Distribution des Connexines et fonctionnalité des jonctions *gap* dans la vessie chez l'homme (Mesnil *et al.*, 2005) :

Nature du tissu	Etudes	Fonctionnalité	Expression des Cxs	Références
Cellules urothéliales saines	Lignée cellulaire	Positive	Cx26 et Cx43 (Northern blot)	(Grossman *et al.*, 1994)
			↑ Cx26 (ARNm) dans des cultures à confluence	
Cellules cancéreuses	Lignées cellulaires	Négative	↓ Cx 26 (ARNm)	
Urothélium sain	Tissu	ND	Cx26 avec marquage ponctué dans la couche basale	(Gee *et al.*, 2003)
Carcinome à cellules transitionnelles	Tissu	ND	↓ Cx 26 (70% des tumeurs)	
Tumeur de Bas grade non invasif	Tissu	ND	Expression diffuse (28%)	
	Tissu	ND	Perte d'expression hétérogène (44%)	
	Tissu	ND	Perte d'expression étendue (28%)	
Tumeur de haut grade invasive	Tissu	ND	Expression diffuse (32%)	
	Tissu	ND	Perte d'expression hétérogène (41%)	
	Tissu	ND	Perte d'expression étendue (27%)	

ND : Non déterminé

Dans le cas de la vessie du rat, l'expression des Cx43 et Cx26 est discutée (Haefliger *et al.*, 2002, Asamoto *et al.*, 1998). Les lignées cellulaires qui expriment une meilleure communication intercellulaire, en corrélation avec une surexpression des transcrits de Cx43 et Cx26, sont les plus agressives (tumorigéniques) (Asamoto *et al.*, 1994). Asamoto *et al.* ont observé une distribution des Cx43 et une absence d'expression protéique de Cx26 malgré l'abondance de l'ARNm codant pour les Cx26 dans les cellules cancéreuses (Asamoto *et al.*, 1998). L'expression des Cx43 dans les cellules de carcinome transitionnel est particulièrement élevée dans les aires de différentiation de ces cellules (Asamoto *et al.*, 1998). Il conclut que l'augmentation de la communication intercellulaire, ou l'augmentation de l'expression des Cx43, peut participer à la prolifération cellulaire dans le processus de cancérogenèse dans la vessie de rat.

II.3.1.5 Gènes suppresseur de tumeur

De nombreuses études visant à mettre en évidence l'implication des Cxs dans la suppression tumorale ont été menées. Elles sont basées sur l'augmentation du nombre de jonctions communicantes par transfection, rétablissant ainsi l'expression des gènes codant les Cxs (Eghbali *et al.*, 1991). Ces gènes codant les Cxs pourraient potentiellement être référencés comme "régulateur du phénotype", voire comme gènes suppresseurs de tumeurs (Mesnil, 2002). L'induction de l'expression de Cxs, suite à une transfection génique, entraîne dans la plupart des cas un retard de la tumorigénicité (Mehta *et al.*, 1999). Dans certains cas, la réexpression des Cxs augmente le nombre de points de contact intercellulaires entre cellules saines et cancéreuses et par conséquent, réintroduit le contrôle de la croissance cellulaire (Mesnil, 2002) (Tableau 7).

Tableau 7 : Différents effets observés suite à la restauration de la communication intercellulaire pour des cellules cancéreuses transfectées (Mesnil, 2002)

Type de tumeur	**Lignée cellulaire**	**Cx transfectée**	**Effets**	**Références**
Carcinome Sein		Cx26/Cx43	Réduction de l'indice de prolifération *in vitro* et de la croissance i*n vivo.*	(Hirschi *et al.*, 1996)
Adénocarcinome Col de l'utérus	HeLa	Cx43	Réduction de la croissance indépendante de l'ancrage *in vitro*. Diminution de l'agressivité *in vivo*	(King *et al.*, 2000a)
Glioblastome	U251T98G	Cx43	Baisse de la prolifération cellulaire *in vitro*	(Huang *et al.*, 1998)
Hépatome	SKHep1	Cx32	Croissance tumorale retardée *in vivo*	(Eghbali *et al.*, 1991)
Carcinome Poumon	PG	Cx43	Réduction du taux de prolifération *in vitro* Inhibition de l'agressivité *in vivo*	(Zhang *et al.*, 1998b)
Mélanome	UACC903	Cx43	Croissance dépendante de l'ancrage	(Su *et al.*, 2000)
Adénocarcinome Prostate	LNCaP	Cx32/Cx43	Inhibition de la croissance	(Mehta *et al.*, 1999)

Le rôle des Cxs dans la suppression tumorale est renforcé par l'étude de souris *knock-out* en Cx32, qui sont plus susceptibles de développer des cancers du foie spontanément ou par induction chimique, par rapport à leur homologue sauvage (Temme *et al.*, 1997). Cependant, le rétablissement de la communication jonctionnelle n'induit pas systématiquement la perte du

phénotype néoplasique. La suppression du phénotype tumoral ne serait pas obtenue essentiellement par le rétablissement d'une communication intercellulaire mais également par l'expression de certaines Cxs, normalement présentes dans le tissu avant cancérisation (Mesnil *et al.*, 1995). L'implication du dysfonctionnement de la communication intercellulaire dans le processus de cancérogenèse semble se conforter mais le rôle précis des Cxs dans la suppression tumorale fait naître de nombreuses interrogations. En effet, ces sous-unités protéiques pourraient-elles posséder d'autres fonctions qui ne les limiteraient pas à la communication intercellulaire ? Le rôle possible de régulateur de la prolifération cellulaire est proposé car il existe une localisation des Cxs parfois incompatible avec un rôle de médiateur de la communication intercellulaire, mais pourtant observée dans des cas de suppression tumorale (glioblastomes) (Huang *et al.*, 1998). Les Cxs ne seraient donc plus exclusivement une "pièce" spécifique aux jonctions *gap* mais également des éléments pouvant être impliqués dans d'autres voies de signalisation (Mesnil, 2004, Zhang *et al.*, 2003). Dans le cas de cellules tumorales de sein, MDA-MB-231, l'introduction d'ADNc codant les Cx26 et Cx43 induit *in vivo* une croissance de la tumeur réduite, indépendamment de la communication intercellulaire. Qin *et al.* l'expliquent alors par une réduction de l'expression du récepteur-3 du facteur de croissance fibroblastique (FGF, *fibroblast growth factor*, facteur pro-angiogénique), consécutive à l'expression des Cxs. Ce phénomène indique un rôle possible des Cxs dans l'inhibition régulatrice paracrine impliquée dans l'angiogenése (Qin *et al.*, 2002).

II.3.2 Hypothèses de l'implication des Connexines dans le processus de cancérogenèse

Lors du processus de cancérogenèse, il y a une rupture de l'homéostasie et du contrôle de la croissance cellulaire. Un lien a été supposé entre une déficience possible de la communication intercellulaire *gap* jonctionnelle et la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses. Ce lien a donné naissance à la théorie suivante en 1979 : « le cancer est » en partie « le résultat d'un dysfonctionnement de la communication intercellulaire *gap* jonctionnelle » (Loewenstein, 1979). L'auteur de l'époque évoque notamment une participation des jonctions communicantes au dérèglement de la multiplication cellulaire dans une revue devenue une référence dans le domaine. Il propose que le manque de communication intercellulaire empêche la diffusion de cellule à cellule de facteurs de croissance. Il argumente que la hausse intracellulaire de la concentration de ces facteurs de croissance dans ces cellules pourrait

devenir si importante qu'elle déclencherait leur division cellulaire. Par ailleurs, pour les cellules qui communiquent, l'effet des facteurs de croissance serait limité et transitoire du fait de leur dispersion par les jonctions *gap* dans toute la population cellulaire (Mesnil, 2002).

Plus récemment, selon une autre étude (Trosko *et al.*, 1998), l'altération de la communication intercellulaire permettrait le passage de la phase d'initiation à la phase de promotion et donc l'expansion clonale des cellules cancéreuses, indépendamment du tissu sain homologue. La théorie de la cellule souche est un concept qui intègre les observations faites pour la théorie de l'initiation/promotion/progression du cancer. Ces cellules souches sont par définition immortelles jusqu'à l'induction d'une différentiation terminale qui les rend donc « mortelle ». Lorsque ces cellules souches n'entrent pas en différentiation terminale, elles sont « initiées ». Si ces cellules souches initiées sont stimulées pour proliférer, elles ne peuvent se différencier de manière terminale, comme le font des cellules souches normales. Elles s'accumulent alors dans le tissu, tels des clones normaux d'un tissu non différencié. Deux types de cellules cancéreuses peuvent résulter de cellules souches pluripotentes, des cellules défaillantes en expression de gènes codant les Cxs ou qui n'ont pas de communication intercellulaire ou des cellules transit qui expriment les gènes codant les Cxs et qui ont une communication intercellulaire fonctionnelle après exposition à un initiateur. L'initiation est le processus qui préviendrait les cellules souches ou transit de la différentiation terminale (perte de l'activité télomérase). Ces cellules souches ou transits initiées auraient leur croissance supprimées soit, par la sécrétion de régulateurs de croissance négatifs ou par une « inhibition de contact » jonctions *gap*-dépendantes. Si ces cellules sont exposées chroniquement à des agents cocarcinogénes, qui inhibent le régulateur négatif de croissance sécrété ou son récepteur dépendant (cellule souche initiée) ou qui sous-régule la communication intercellulaire (cellule transit initiée), elles pourraient proliférer, s'accumuler et acquérir des changements génétiques et épigéniques suffisants pour devenir « promoteur indépendant », invasif et métastatiques. A la fin, les deux types de tumeurs sont déficientes en jonctions *gap* fonctionnelles, dans un cas, du fait de la suppression de la transcription des gènes codant les Cxs (cellules souches), et dans l'autre cas, à cause de mutations oncogènes activées/désactivées/perte des gènes suppresseurs de tumeur déclenchant une sous régulation de l'expression des Cxs et des jonctions *gap* (Fig. 21).

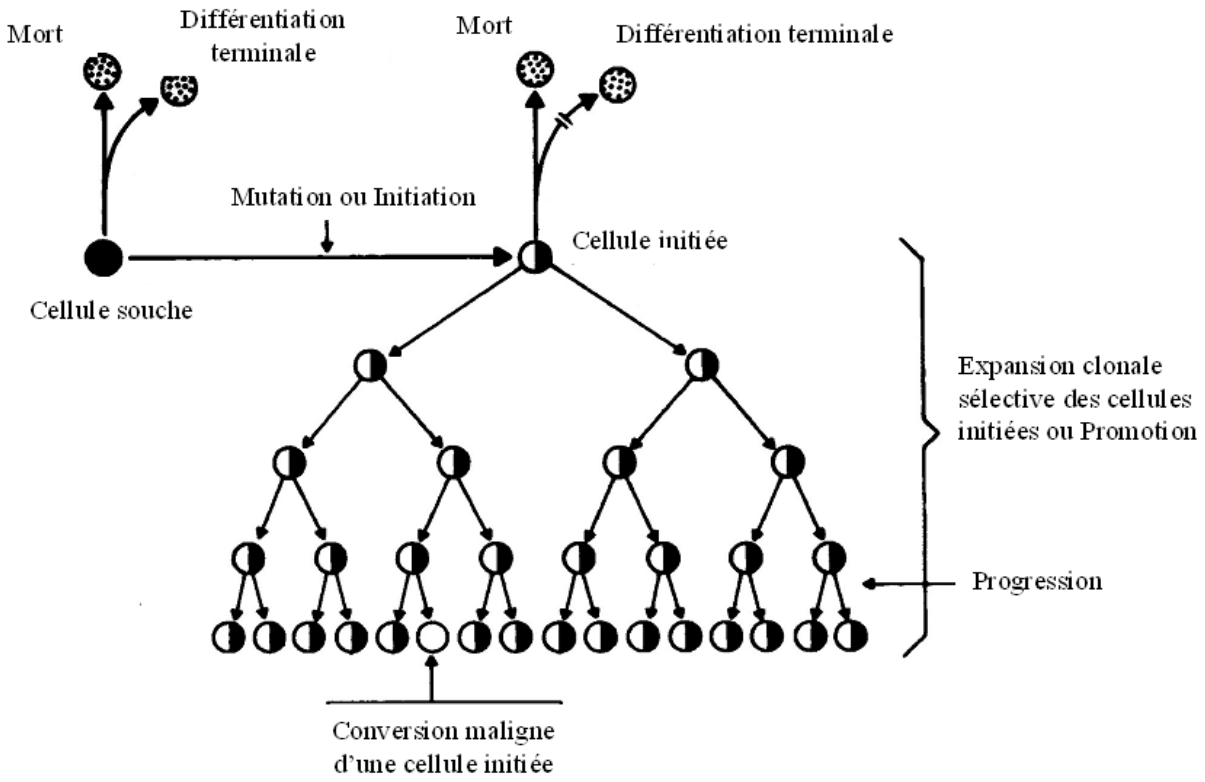

Figure 21 : Modèle d'initiation/promotion/progression de la carcinogenèse (Trosko *et al.*, 1998).

Cependant, l'intervention des Cxs aux différents stades du processus de cancérogenèse est une question qui divise les différentes équipes scientifiques. La véritable réflexion est de savoir si l'absence ou la diminution de fonctionnalité des jonctions *gap* est une conséquence du phénotype tumoral ou si celle-ci favorise l'agressivité tumorale.

II.3.3 Connexines, invasivité et métastases

II.3.3.1 Connexines et invasivité

La chute de la capacité de communication intercellulaire des cellules peut amener à une hétérogénéité tissulaire et contribuer à la transformation cellulaire. Nicolson a montré que la fonctionnalité des jonctions *gap* était inversement corrélée au haut potentiel métastasique de cellules d'adénocarcinome mammaire du rat (Nicolson *et al.*, 1988) ou encore, à une corrélation entre la baisse du potentiel métastatique et l'expression de la Cx43 pour une lignée de carcinome de sein à pouvoir métastatique (Saunders *et al.*, 2001). L'ARNm de la Cx43 n'a

également pas été détecté dans une lignée cellulaire humaine de carcinome de poumon hautement métastatique (Zhang *et al.*, 1998b). Toutefois, dans le cas des gliomes malins humains, les cellules formant des jonctions *gap* avec les cellules gliales *in vivo* sont plus invasives et infiltrantes que les gliomes malins ne formant pas de communication intercellulaire (Lin *et al.*, 2002). L'échange intercellulaire pourrait permettre une transformation phénotypique des cellules gliales, contribuant à la sensibilité de ces tissus voisins à l'invasion tumorale (Zhang *et al.*, 1999). Pour un autre cas, la transfection des Cx43 augmente les propriétés invasives des cellules HeLa dans un tissu sain, accompagnées d'une formation de canaux hétérotypiques entre les cellules HeLa et les cellules normales (Graeber *et al.*, 1998). Cependant, le processus complexe de l'invasion requiert des actions concertées et le couplage intercellulaire peut être nécessaire dans certains cas mais n'est pas un prérequis suffisant pour la réussite de l'invasion tissulaire. Selon Ito *et al*., lorsque la tumeur se développe, les Cxs peuvent participer à la progression de la tumeur vers des stades de plus haute malignité (Ito *et al.*, 2006).

II.3.3.2 Connexines et métastases

Le processus métastatique se déroule en plusieurs étapes qui impliquent la dissémination des cellules tumorales depuis la tumeur primitive, l'entrée des cellules dans la circulation sanguine et lymphatique, leur extravasation depuis le système vasculaire et leur prolifération en masse tumorale sur des sites tumoraux secondaires. La connaissance de l'expression des Cxs et de la fonctionnalité des jonctions communicantes dans les cellules tumorales, progressant vers les sites métastatiques, est encore limitée. En étudiant des cellules de mélanomes hautement métastatiques, Ito *et al.* ont proposé que les Cx26 pourraient être impliquées dans l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales par la formation de canaux intercellulaires hétérologues avec les cellules endothéliales. La Cx26 pourrait alors réguler le potentiel invasif ou métastatique des cellules tumorales (Ito *et al.*, 2000). Le même phénomène de communication hétérologue avec des Cx43 a pu également être observé dans le cas de cellules tumorales du sein et des cellules cancéreuses métastatiques du poumon avec des cellules endothéliales (Pollmann *et al.*, 2005, El-Sabban *et al.*, 1994). Ce couplage hétérocellulaire indique que la communication intercellulaire peut faciliter la diapédèse des cellules tumorales. L'augmentation de l'expression des Cxs dans des cellules faiblement invasives, peut aussi augmenter leur capacité à migrer à travers l'endothélium (Pollmann *et*

al., 2005). Dans le cas du mélanome, l'expression des Cx26 pourrait contribuer aux développement des métastases en facilitant la communication intercellulaire entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales voisines (Saito-Katsuragi *et al.*, 2007). Cependant, le phénomène d'extravasation est un phénomène complexe pouvant impliquer les jonctions *gap*, les protéines d'adhésion et la communication paracrine (Mesnil *et al.*, 2005). Le rôle des Cxs et des canaux intercellulaires peut donc différer selon le type de tumeur et les étapes de développement et de progression de la tumeur. Enfin, certains travaux suggèrent que les jonctions *gap* pourraient aussi favoriser l'établissement de cellules métastatiques dans certains tissus. La localisation préférentielle des métastases serait la conséquence de la formation de jonctions hétérotopiques avec le tissu cible. Ainsi, la formation de jonctions hétérotypiques entre des cellules de carcinome de sein et des cellules ostéoblastiques pourraient expliquer la localisation préférentielle des métastases issues du cancer du sein dans les os (Kapoor *et al.*, 2004, Mesnil *et al.*, 2005) .

II.3.4 Outils de pronostic d'évolution du cancer

Des études cliniques ont été menées pour déterminer si les Cxs pouvaient être utilisées comme un marqueur fiable de l'évolution de certains cancers tels que :

II.3.4.1 Sein

Suite à une étude déjà menée sur un échantillon de 27 prélèvements, Conklin *et al.* ont étudié la signification pronostique de l'expression des Cxs dans le cas du cancer du sein pour 438 cas de carcinomes invasifs (Jamieson *et al.*, 1998, Conklin *et al.*, 2007). Après avoir évalué par immunohistochimie la distribution des Cx26, Cx32 et Cx43 dans les prélèvements tissulaires, les analyses statistiques ont été corrélées à la survie du patient, le grade et la taille de la tumeur, la présence de ganglions envahis et l'expression des marqueurs tels que la p53, le statut des récepteurs à la progestérone (PR) et aux œstrogènes (ER) et c-erbB-2. Les résultats ont montré qu'aucune des Cx étudiées n'était corrélée aux autres résultats des patients atteints de cancer du sein (Conklin *et al.*, 2007). Pourtant, la même année, Naoi *et al.* ont comparé l'expression des Cx26 (rarement exprimées dans les cellules épithéliales saines) dans des carcinomes invasifs (152 échantillons) avec l'invasion des vaisseaux sanguins et lymphatiques, la taille de la tumeur et le grade histologique (Naoi *et al.*, 2007). Les auteurs ont mis en évidence un lien entre l'expression des Cx26 et l'invasion des vaisseaux

lymphatiques et la survenue de rechute. Ils concluent en proposant un suivi de l'expression de la Cx26 comme un nouveau facteur de pronostic de l'évolution du cancer du sein.

II.3.4.2 Colon et Rectum

Knösel *et al* ont étudié la Cx26 comme biomarqueur potentiel pour le pronostic des patients atteints de cancer colorectal avec une analyse menée sur 178 tumeurs positives et 124 négatives. La baisse de l'expression de la Cx26 a été corrélée à une diminution du temps de vie du patient associée et à une augmentation du grade de la tumeur (Knosel *et al.*, 2005). Mais plus récemment, une étude a abouti à des conclusions différentes. En effet, Ezumi *et al.* ont montré une expression élevée de la Cx26 associée à une invasion des vaisseaux sanguins, et à une histologie peu différenciée, concernant 154 résections curatives de cancer colorectal primaires analysées, une survie sans récidive limitée et une survie sans métastase pulmonaire plus courte (Ezumi *et al.*, 2008). Dans le cas du cancer colorectal, l'expression de la Cx26 ne s'avère pas un paramètre significativement prédictif de la récurrence de la maladie mais pourrait permettre de pronostiquer l'apparition potentielle de métastases pulmonaires.

II.3.4.3 Poumon

Dans le cas du cancer du poumon, Ito *et al.* ont montré une corrélation positive significative entre l'expression de la Cx26 et un mauvais pronostic pour 50 échantillons de carcinomes testés. L'expression de la Cx26 était significativement reliée à un décès spécifique par cancer même après résection curative à un stade précoce de la maladie. Des études sur des échantillons plus grands sont cependant recommandées, néanmoins l'utilisation de la Cx26 comme marqueur moléculaire potentiel, est proposée pour détecter les patients à haut taux de récurrence (Ito *et al.*, 2006).

II.3.4.4 Pancréas

Kyo et al. a évalué l'expression de la Cx26 dans les cas de cancer du pancréas (43 échantillons). Dans un pancréas sain, l'expression de la Cx26 est négligeable dans les cellules épithéliales des canaux et dans les cellules acinaires, et est modérée dans les îlots pancréatiques. Dans les carcinomes (30/43), une expression abondante des Cx26 a été mise en évidence, indépendamment du grade de la tumeur. Aucune corrélation n'a été démontrée entre l'expression des Cx26 et des paramètres associés à la progression de la tumeur tels que le

stade de la maladie, la taille de la tumeur et la présence de nodules lymphatiques (Kyo *et al.*, 2008).

II.3.4.5 Thyroïde

Naoi *et al.* ont étudié l'expression de la Cx26 dans les cancers de la thyroïde de type folliculaire (11 échantillons) et papillaire (69 échantillons) en les comparant à certains paramètres clinicopathologiques. Une relation statistiquement significative a pu être mise en évidence entre une expression positive de la Cx et l'augmentation de la taille de la tumeur ainsi qu'avec la présence de métastases ganglionnaires. La Cx26 s'avère donc associée à un phénotype biologiquement agressif. Cette étude préliminaire est à valider dans le futur sur un échantillon plus grand (Naoi *et al.*, 2008).

II.3.5 Outils thérapeutiques

II.3.5.1 Communication intercellulaire : chimioprévention et chimiothérapie

Prévenir la diminution de la communication intercellulaire pendant la phase de promotion de la tumeur ou, restaurer la fonctionnalité des jonctions communicantes après la transformation néoplasique pourraient être une base de la chimioprévention et de la chimiothérapie. Certaines molécules ayant pour propriété de réguler la communication intercellulaire, pourraient donc devenir des outils potentiels de la prévention ou de la thérapie du cancer (Tableau 8).

Tableau 8 : Modulateurs de la communication intercellulaire gap jonctionnelle pour une stratégie chimiopréventive ou chimiothérapeutique.

Actions	Agents	Effets	Références
Préventive	Caroténoide	Prévient la promotion de tumorale *in vivo* Inhibition de la communication intercellulaire *in vitro*	(Zhang *et al.*, 1992)
	Rétinoide		(Rogers *et al.*, 1990)
	Thé vert	Agent anti-tumoral *in vivo* Prévient la sous-régulation de la communication intercellulaire *in vitro* et *in vivo*	(Sigler *et al.*, 1993, Sai *et al.*, 2000)
	Sauce soja japonaise	Prévient la sous-régulation de la communication intercellulaire *in vitro*	(Takahashi *et al.*, 1995)
	Ginsenoside Rb2		(Kang *et al.*, 2000)
	Epicatechine		(Kang *et al.*, 2000)
	Lycophéne		(Krutovskikh *et al.*, 1997)
	Flavanoïde		(Chaumontet *et al.*, 1997)
	Theophylline		(Traub *et al.*, 1987)
	Irsogladine		(Ueda *et al.*, 1995)
	Resveratrol		(Nielsen *et al.*, 2000)
	L2 : mixture chinoise médicinale	Prévient l'inhibition de la GJIC	(Zhang *et al.*, 1994)
Curative	Lovastatine	Prévient la croissance des tumeurs Restaure la GJIC dans le cas de lignée cellulaire transformée par l'oncogène *ras*	(Ruch *et al.*, 1993)
	Ester phénethyléne d'acide caféique		(Na *et al.*, 2000)
	Glucocorticoïde	Sur-régule la communication intercellulaire	(Ren *et al.*, 1994)
	Hexaméthylène bisacétamide		(Ogawa *et al.*, 1999)
	Thalidomide		(Nicolai *et al.*, 1997)
	Vitamine D	Sur-régule la communication intercellulaire *in vitro*	(Clairmont *et al.*, 1996)

II.3.5.2 Thérapie génique anti-tumorale

L'effet *bystander* (effet de proximité) correspond à la capacité de cellules transfectées, ou mutantes, de moduler le comportement de cellules voisines. L'aptitude des cellules qui

communiquent, à transférer des métabolites létaux a été exploitée en chimiothérapie cancéreuse expérimentale ; malheureusement les essais cliniques ont eu un succès limité (Sandmair *et al.*, 2000). La thérapie génique, présentée ici, correspond à la capacité de vecteurs viraux à délivrer le gène *HSV-tk (herpés simplex virus - thymidine kinase)* dans des cellules tumorales suivi par le traitement du patient avec le ganciclovir (GCV), un médicament anti-viral. Habituellement, les cellules ne peuvent pas phosphoryler le GCV en un nucléotide cytotoxique mais les cellules transfectées avec le gène *HSV-tk* sont capables de phosphoryler le GCV par la thymidine kinase du virus de l'Herpès en un métabolite actif cytotoxique (King *et al.*, 2005). Il s'est avéré dans bien des cas que la toxicité ne se limitait pas à la cellule transduite mais atteignait aussi les cellules voisines d'où le terme d'effet de proximité ou effet *bystander* (Mesnil, 2004). Pour une cellule cancéreuse transfectée, dix cellules sont détruites (Uhl *et al.*, 2005). Ce phénomène est corrélé directement à la présence de jonctions communicantes fonctionnelles entre les cellules tumorales transfectées et non transfectées puisque les nucléotides cytotoxiques vont diffuser dans les autres cellules par coopération métabolique. L'échec clinique de ce type de thérapie est probablement du à l'inefficacité du transfert intratumoral des gènes suicides dans les tumeurs solides (King *et al.*, 2005). Une approche pour contourner ce problème est l'utilisation de cellules génétiquement modifiées pour exprimer le gène *HSV-tk* qui vont se distribuer partout dans la tumeur et délivrer par la suite des métabolites cytotoxiques (Rancourt, 2003). L'effet de proximité pourrait être aussi accru en augmentant la communication intercellulaire par des traitements chimiques. Selon Mesnil *et al*, la fonction aberrante des Cxs dans les cellules cancéreuses risque de s'opposer à la mise en place d'un effet de proximité conséquent. Si plus de données concernant les Cxs dans les tumeurs humaines étaient disponibles, les types de tumeurs pourvues en Cxs, seraient susceptibles d'être ciblées par la thérapie génique suicide du gène *HSV-tk* (Mesnil, 2004).

Une application thérapeutique des Cxs a été étudiée sur les gliblastomes humains. En cultivant *in vitro* ces cellules cancéreuses transfectées avec la Cx 43, elles sont devenues plus sensibles à des agents de chimiothérapies induisant l'apoptose tels que l'étoposide, le paclitaxel, et la doxorubicine. Les Cxs pourraient donc augmenter l'action de la chimiothérapie classique (Huang *et al.*, 2001).

II.4 MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE

Le rôle de la communication intercellulaire pour la régulation de la croissance et de la différentiation cellulaire est aujourd'hui reconnu comme une fonction cellulaire majeure. Elle consiste en l'échange intercellulaire de molécules de bas poids moléculaires par contact direct entre les cytoplasmes de cellules adjacentes. La perturbation de la fonctionnalité des jonctions *gap* est associée à des conditions pathologiques telles la cancérogénèse et les maladies héréditaires. L'estimation de la communication intercellulaire gap jonctionnelle par des approches fiables et précises s'avère très informatives en biologie cellulaire. Des méthodes utilisées avec succès par de nombreuses équipes, permettent d'évaluer la fonctionnalité des jonctions *gap* à la fois *in vitro* et *in vivo.* Notre revue décrit les techniques plus ou moins couramment appliquées, telles que les mesures par transfert de sondes fluorescente (microinjection, *scrape loading*, *gap*-FRAP, pré-marquage, activation locale d'une molécule fluorescente (*local activation of a molecular fluorescent probe* LAMP)) par conductance électrique et par coopération métabolique. Comme nous l'avons discuté dans cette revue, ces approches et les informations qui en découlent ne sont pas équivalentes mais complémentaires. Nous nous sommes focalisés sur les avantages et limitations majeures de ces méthodes. Bien que les applications biologiques guident le choix des techniques à utiliser, nous avons mis en exergue les points et les finalités pris en considération avant de sélectionner une approche méthodologique pour le suivi de la fonctionnalité gap jonctionnelle.

Ce travail, publié dans *Biotechniques,* est présenté dans les pages suivantes sous forme d'article.

Review

Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication

Muriel Abbaci[1,2], Muriel Barberi-Heyob[2,3], Walter Blondel[1,2], François Guillemin[1,2,3], and Jacques Didelon[3]

BioTechniques 45:33-62 (July 2008)
doi 10.2144/000112810

The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) in regulation of normal growth and differentiation is becoming increasingly recognized as a major cellular function. GJIC consists of intercellular exchange of low molecular weight molecules, and is the only means for direct contact between cytoplasms of adjacent animal cells. Disturbances of GJIC have been associated with many pathological conditions, such as carcinogenesis or hereditary illness. Reliable and accurate methods for the determination of GJIC are therefore important in cell biology studies. There are several methods used successfully in numerous laboratories to measure GJIC both in vitro and in vivo. This review comments on techniques currently used to study cell-to-cell communication, either by measuring dye transfer, as in methods like microinjection, scrape loading, gap-fluorescence recovery after photobleaching (gap-FRAP), the preloading assay, and local activation of a molecular fluorescent probe (LAMP), or by measuring electrical conductance and metabolic cooperation. As we will discuss in this review, these techniques are not equivalent but instead provide complementary information. We will focus on their main advantages and limitations. Although biological applications guide the choice of techniques we describe, we also review points that must be taken into consideration before using a methodology, such as the number of cells to analyze.

INTRODUCTION

Most cells in multicellular organisms perform gap junctional intercellular communication (GJIC). This is the well-known form for direct contact between cytoplasms of adjacent animal cells. The juxtaposition of two half-channels, called connexons, constitutes this junction (Figure 1). Each connexon is inserted into the cytoplasmic membrane of two neighboring cells. It is made of six protein subunits called connexins (Cx) and can be homomeric or heteromeric (1). Connexons are absent from spermatocytes, erythrocytes, thrombocytes, adult skeletal muscle, and some neuronal subpopulations (2). The Cx subunit is a four-transmembrane spanning protein, harboring two extracellular loops, a cytoplasmic loop, and a cytoplasmatic N- as well as C-terminal region (Figure 1). The Cx family in humans is composed of 21 types of proteins classified according to their molecular weight. One cell type can express more than one Cx isoform (3). The flux of molecules through these channels includes the passive diffusion of small (<1 kDa) and hydrophilic molecules, such as metabolites (e.g., ATP), nutrients (e.g., glucose), and second messengers (e.g., triphosphate inositol, ionic coupling, and Ca^{2+}) (4). GJIC was for a long time regarded as a relatively passive way of intercellular signaling through cell-to-cell tunnels; however, it was finally recognized that the degree of intercellular coupling is finely regulated in three main aspects: (*i*) the number of channels present in the membrane, (*ii*) their functional state, and (*iii*) their permeability (5). These channels are critical to several physiological roles, such as impulse propagation in the heart and neurons (6), response of tissues to hormones (7), regulation of embryonic development (8), homeostasis (9), and regulation of cellular proliferation (10).

Gap junction channels can be regulated by several agents, including voltage, phosphorylation, intracellular calcium and pH, adhesion proteins, extracellular matrix, and hormones (11).

Studies of cell-to-cell communication are carried out either by measuring dye transfer using techniques such as microinjection, scrape loading, electroporation, gap-FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), preloading assays, local activation of molecular fluorescent probe (LAMP), or by measuring electrical conductance and metabolic cooperation.

In this paper, we describe fluorescent dye transfer techniques and other methods commonly used to study GJIC capacity in vitro and in vivo. Currently, all of these techniques are widely used to understand the physiology of gap junctions; for instance, to study the modifications to their normal function by chemicals, carcinogenesis, cell growth, and embryogenes, or to study the permeability and ion selectivity of Cx isoforms. Knowledge of reliable and accurate methods for the determination of GJIC functionality and permeability is therefore important in studies of cell biology.

[1]*Faculté de Médecine,* [2]*Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre Alexis Vautrin, and* [3]*Centre Alexis Vautrin, Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France*

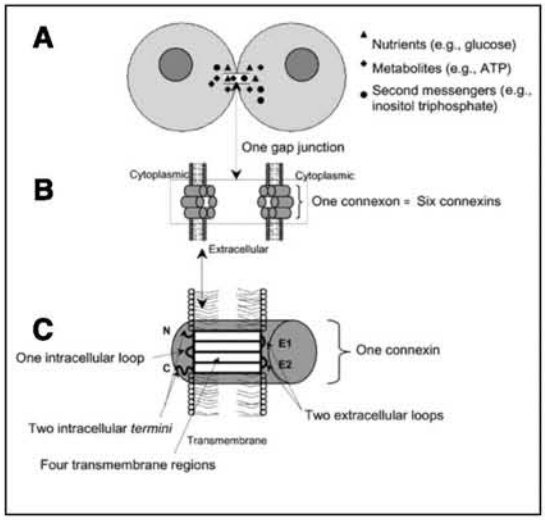

Figure 1. Basic intercellular communication topology and gap junction structure. (A) Two cells are coupled by a variable number of gap junction channels that allow the passage of small molecules as described in the introduction. (B) Six protein subunits called connexins oligomerize into a hexameric structure called the connexon. Two connexons constitute one gap junction. (C) Transmembrane topology of a connexin protein, including four transmembrane regions, two extracellular loops, an intracellular loop, and two intracellular *termini*.

DYE TRANSFER

Most of the methods available for investigating intercellular communication mediated by Cx channels are dependent on the introduction into living cells of nontoxic dyes that are traced in their eventual intercellular movements. Molecules suitable for such experiments should be small enough to cross gap junction channels, whose cutoff size is around 900 Da, and should not leak across a normal nonjunctional membrane. Most Cx channels are permeable to several tracers and until now, no dye has been shown to permeate only one type of gap junction channel, that is, to be specific for any Cx species. However, it is also clear that different Cx form channels with distinct permeabilities and that these specific properties may allow for subtle discrimination between molecules that differ only in size and/or electrical charge (12).

Microinjection

Principle. Microinjection of membrane-impermeable, nontoxic tracers has been the first technique used to identify and map the communication network of a wide variety of cell systems. Indeed, the existence of functional cell-to-cell channels can be verified by intercellular transfer of tracers, which requires intracellular injection of membrane-impermeable but gap junction– permeable dye (13).

The first cell-to-cell spread of a fluorescent diffusion tracer introduced into one cell by microinjection was demonstrated by Kanno and Loewenstein in 1964. A fluorescent dye within the micropipette (with a tip diameter about 0.2 µm) is injected intracellularly by an electrical or pressure pulse (Figure 2A). This technique introduces macromolecules into cells by a transient perturbation of the cell membrane, which does not affect cell viability (Table 1). If the adjacent cells are coupled by gap junctions, the dye will diffuse and label them. Fluorescein was the first fluorescent dye extensively used to characterize direct intercellular coupling (14). However, nonjunctional membrane was found to be permeable to this dye (15) and thus fluorescein was gradually replaced by Lucifer yellow (LY) (16). The choice of the most adequate tracer is dependent on several factors, including the scope of the experiment and the conditions under which the study is conducted.

Advantages. Because it enables a selective loading of dyes, microinjection permits the correlation of morphological and functional data from individual cells. Furthermore, because the duration of the tracer injection can be accurately controlled, the technique is also instrumental in kinetic studies aimed at evaluating the rate of transfer from one cell to another. Moreover, the microinjection method has the advantage that the level of cell communication is expressed as number of dye-coupled cells, which gives a basis for direct comparison of cell communication in different cell types (17). This approach is still widely used to study cell coupling in cultures and is the main technique available to extend such studies to intact tissues.

Limitations. The main limitation of microinjection is that it requires specialized equipment and technical skill to prevent cell damage, or at least to detect damage during injection of the dye. Also, performing intracellular microinjection requires some dexterity, and the amount of microinjected tracer is difficult to standardize (18). As is often mentioned, results obtained by this method vary with the investigator's experience in impaling cells without causing too much damage and also in discriminating stained from unstained (autofluorescent) cells (19). Cell impalement causes sudden and dramatic changes in intracellular homeostasis, including changes in membrane potential or intercellular ionic concentration, which in turn can alter GJIC (20,21).

A simulation, for instance a mechanical stretch, cannot be applied simultaneously with microinjection. Microinjection is thus unsuitable for detecting effects that are either very rapid or require a continuous application of the stimulus (20).

The technique is not convenient when a large number of cells need to be assessed simultaneously for intercellular communication. In practice, only a few cells may be microinjected, usually not at the same time (13). Quantitation of dye transfer is mainly based on visual observation and manual counting of dye-coupled cells. Manual cell counting is however both time-consuming and inaccurate. Cell counting has inherent problems because it is dependent on cell density and cell morphology. Also, the more cells the dye passes to, the more dilute it gets. Therefore, it is important to make sure that inter-experimental conditions are identical. Because of these considerations, some experimenters look only at dye passage to first-generation cells or nearest neighbors. When a dye injection assay is used, it is difficult to determine subtle differences in gap junction coupling as a consequence of treatment (22); thus, other methods are needed to evaluate more subtle effects.

Significant studies and applications. Dye transfer is a relatively crude but widely used method for demonstrating

intercellular communication through gap junctions in monolayer cells (23,24) and tissue in various biological circumstances (Table 2).

A selection of different fluorescent dyes with divergent molecular masses and charges is available (Table 1) and therefore, this technique appears appropriate to study junctional permeabilities and exclusion limits of channels (25–27). Several diffusion models have been developed in monolayer cultured cells or in *Xenopus* oocytes (28–30). Different Cx form channels with distinct permeabilities, allowing a subtle discrimination between molecules that are only slightly different in size and/or electrical charge. Hence, some Cx channels may allow for the passage of some, but not all, available tracers (31). Dyes that bind strongly to DNA, such as propidium iodide, ethidium bromide, and DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) dihydrochloride, are limited in their utility as diffusible tracers (32).

The liver is an organ frequently used to study GJIC by the dye transfer assay (33). Krutovskikh et al. developed a

Table 1. General Features of Gap Junction–permeable Dyes Used for Intercellular Communication Assessment

Name	Abbreviations	Absorption Wave-length (nm)	Emission (nm)	Net Charge[a]	Molecular Weight (Da)	Methods	Ref.
hydroxycoumarin carboxylic acid	HCCA	386	448	- 6	206	MI	(123)
calcein blue	-	360	449	0	321	MI	(123)
N-2[aminoethyl]-biotinamide hydrochloride	Neurobiotin	Nonfluorescent		+1	287[b]	SL, IL	(47,124)
4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	DAPI dihydro-chloride	358	461	+1	279[b]	MI	(32)
ε-biotinoyl-L-lysine	Biocytin	Nonfluorescent		0	372.5	SL, MI	(125,126)
5-(and 6)- carboxyfluorescein diacetate	CFDA	Nonfluorescent		0	376 (CF)	Gap-FRAP	(60)
carboxyfluorescein	CF	492	517	-2		MI	(127)
ethidium iodide(bromide)	EthBr	518	605	+1	314[b]	SL, MI	(32)
2′,7′- dichlorofluorescein	diCl-F	504	529	-1	401	MI	(128)
1-(2-nitrophenyl)ethyl -hydroxy-6-chloro-coumarin 3-carbox-amide acetoxymethyl ester	NPE-HCCC2/AM	Nonfluorescent		ND	450 (HCCC2)	LAMP	(40)
7 hydroxy-6-chloro-coumarin 3-carboxamide	HCCC2	408	448				
dicarboxy-dichlorofluorescein diacetate	CDCFDA	Nonfluorescent		-2	445 (CDCF)	Gap-FRAP, PA	(129,130)
dicarboxy-dichlorofluorescein	CDCF	504	529	ND			
Lucifer yellow CH	LY	428	536	-2	443[b]	SL, MI	(131)
2′,7′-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxy-methyl ester	BCECF-AM	Nonfluorescent		0	520 (BCECF)	FC, Gap-FRAP	(132)
2′,7′-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein	BCECF	503	528	-4,-5			
alexa fluor 488	-	495	519	-1	570.5	MI	(35)
cascade blue	-	400	420	ND	607	MI	(133)
calcein acetoxymethyl ester	Calcein-AM	Nonfluorescent		0	622 (calcein)	Gap-FRAP, PA, FC	(58)
calcein	-	494	517	-4		MI	(134)
propidium iodide	PI	535	617	+2	414[b]	MI	(32)
lissamine rhodamine B200	LB200	575	595	0	559	MI	(135)

[a]At neutral pH.
[b]Molecular mass of permeating ion analyzed (without counter ion) from Elfang et al. (32).
FC, flow cytometry; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; IL, incision loading; LAMP, local activation of molecular fluorescent probe; MI, microinjection; PA, parachute assay; SL, scrape loading; ND, not determined.

Review

simple method to measure GJIC in liver slices freshly removed from the rat to study sequential change of GJIC during chemical hepatocarcinogenesis (34). In brief, injections of LY were performed with a handmade glass needle into a fresh thin slice of rat liver. Injected slices were quickly washed in phosphate-buffered saline, embedded in gelatin, frozen, and cut into cryosections. Each spot of LY dye spread on serial sections was photographed under a fluorescence microscope. With this approach, it could not be strictly ruled out that the slices varied in thickness and, therefore, hepatocytes in the center of the sections could be damaged due to a restricted supply of oxygen or nutrients (35).

In the field of embryogenesis, Levin and colleagues suggested that endogenous dorsoventral differences in GJIC within the early embryo are needed to consistently orient left-right asymmetry (36). The authors used 8- or 16-cell *Xenopus* embryos fixed in paraformaldehyde in which LY was microinjected into one cell.

Scrape Loading

Scrape loading is a simple alternative to microinjection for introduction into cultured cells of tracers that cannot cross the cell membrane.

Principle. In this approach, monolayers of adherent cells are scraped or scratched in the presence of a gap junction permeable tracer, which becomes incorporated by cells along the scrape, presumably as a result of some mechanical perturbation of the membrane (Figure 2B). As normal membrane permeability is re-established, the tracer becomes trapped within the cytoplasm and, with time, may move from the loaded cells into adjacent ones connected by functional Cx channels (37). The distance at which the fluorescent dye diffuses during a certain period away from the scrape line is indicative of GJIC level (38). The optimal incubation time may vary between different cell types, depending on the level of communication and attachment properties of the cells (39). For a set experiment duration, different rates of dye diffusion through homotypic channels between different cell types is correlated to the number of gap junction channels (19). Other fluorescent dyes, such as rhodamine-dextran (RhD) or dialkylcarbocyanine (Di-I), which are larger than the gap junction channel limit, are used as a control to label the initially loaded cells and to show that dye transfer from cell to cell is not by other means, such as cytoplasmic membrane fusions or cytoplasmic bridge formation, or due to leaky membranes, which can occur under cytotoxic conditions (38).

Advantages. The major advantages of the scrape-loading approach are that (*i*) it does not necessitate most of the special equipment and skills that are needed for microinjection, and (*ii*) it is possible to conduct a rapid and simultaneous assessment of junctional communication in a large number of cells.

It is the fastest and simplest technique to measure GJIC because a straight scrape made by a scalpel (or a needle) on monolayer cultured cells efficiently allows fluorescent dye to enter through this wound. It is therefore particularly useful when a large screen of multiple conditions is required or when different regions of a cell monolayer have to be compared within the same culture dish. Scrape loading can measure dye transfer in multiple cells almost simultaneously, and it is the only visual method available to assess the overall GJIC of a population of cells (38). The scrape-loading technique can be effectively used as a tool to determine the qualitative presence or absence of GJIC.

Limitations. The approach is inappropriate to investigate small cells or cell assemblies (such as pairs), as well as low-density cultures. It is complicated when the extent of junctional coupling is small or when selected cells have to be individually screened for coupling. It is not well suited to three-dimensional (3-D) systems because this invasive method may introduce uncertainties in quantifying dye transfer rates due to variations in cell-staining intensity after scrape loading (40).

The scrape-loading technique is not useful for Cx channels that exclude molecules such as LY (38). For example, Cx45 channels cannot be assessed using LY (41). If the Cx channels of a particular cell are unknown, then the scrape-loading technique using LY as the transfer dye does not necessarily represent an accurate portrayal of the GJIC "competency" of that cell population. Dye coupling should be interpreted with caution because two different tracers may not be detected equivalently (42). For channels that exclude LY, smaller dyes such as biotin conjugates have been used (Table 1).

The GJIC levels of some cell types of irregular shape are not easily quantified using the scrape-loading assay. For example, gap junction function of neuronal cells with extensive processes or long spindly fibroblasts cannot be easily quantified because the distance dye travels is not easily "trackable" (38). The problem of nonuniform labeling with LY or variation in the intensity after scrape loading has been reported previously (43).

As a result, techniques of microinjection and scrape loading are widely used to qualitatively demonstrate intercellular communication, although the use of image analysis in combination with scrape loading was reported to produce quantitative information and to reduce considerably the statistical variation in the data (39).

Significant studies and applications. Scrape loading has been used to assess the GJIC status of many cell types in various biological circumstances (Table 2). Sai et al. reported an in vivo GJIC assay, the incision loading/dye transfer method (IL/DT) using LY and RhD (44). RhD, which does not pass through the channels, is used

to identify the incision sites or damaged cells. With this double dye transfer, authors examined whether drinking green tea might prevent GJIC inhibition by a tumorigenic compound, pentachlorophenol, in the liver of mice. Romualdi et al. described an improvement to this dye transfer method in which precision-cut slices (250 µm cross-section) from mouse liver were used to quantify GJIC after iontophoretic injection of the fluorescent dye Alexa Fluor 488 directly into hepatocytes (35). Dye injection and spreading were monitored in real time and quantified by fluorescence microscopy. The integrity and viability of the cells were controlled by monitoring the membrane potential.

The IL/DT method illustrates the potential benefit of detecting and predicting effective doses for tumorigenesis. This method has many advantages for studying tumor-promoting activity in vivo, because even though the Cx expression level recovered at an early stage after treatment with the tested compound, a low level of GJIC persisted for a longer time, indicating that an analysis of the expression level of Cx, such as for protein, mRNA, or its localization, does not always reflect gap junction function in vivo. With respect to devising a much simpler and quicker procedure compared with the microinjection method, IL/DT may be useful for rapidly screening tumorigenic compounds for setting doses for studies of carcinogenesis (44).

The analysis of GJIC by microinjection or scrape loading can also be used with sections of other tissues, such as skin (45), testis (46), and central nervous system tissue (47). An exhaustive protocol was described by Meda's group in primary tissues (13).

Electroporation

Principle. Raptis et al. proposed a new way to introduce nonpermeable fluorescent dye into adherent cells on a partly conductive slide, called electroporation. (48). Cells are grown on a glass slide, half of which is coated with electrically conductive, optically transparent, indium-tin oxide. An electric pulse that opens transient pores on the plasma membrane is applied in the presence of the fluorescent dye LY, causing the dye's penetration into the cells that are growing on the conductive part of the slide. Cells growing on the nonconductive slide are not permeabilized as it does not receive any current (Figure 2C). Migration of the dye through gap junctions to nonelectroporated cells is then microscopically observed under fluorescence illumination (49). To quantitate gap junctional coupling, the number of cells into which dye transferred through gap junctions per electroporated border cells was calculated by dividing the total number of labeled cells on the nonconductive slide by the number of cells growing at the border with the conductive coating (Figure 2C) (50).

Advantages. Lucifer yellow can enter simultaneously into large numbers of cells with minimal disturbance to cellular metabolism (45). This technique can be applied to a large variety of adherent cell types (50). According to De Vuyst et al., electroporation loading and dye transfer (ELDT) is a robust technique to investigate gap junctional coupling that combines minimal cell damage with accurate probing of the degree of cell-to-cell communication. It is a satisfactory method for loading a narrow longitudinal strip of cells for subsequent studies on the temporal and spatial spread of fluorescent dyes via gap junctions (51).

Limitations. This technique is not recommended to examine cell types that do not adhere well to their solid support. If cells are grown to high confluence, they may detach due to the turbulence and suction forces created as the top electrode is removed after electroporation and GJIC study becomes impracticable. GJIC evaluation is also difficult when a small part of the cell layer is separated during removal of the electrode because the dye will diffuse under the cell sheet (52). An accurate determination of optimal voltage is important to not induce damage of the electroporated cells at the border with the nonconductive area (50).

Significant studies and applications. Recently, Raptis et al. have described a slide configuration that eliminates the upper electrode, which can induce cell detachment when it is removed. Cells are grown on two co-planar electrodes, an approach that is valuable for the examination of cells that do not adhere closely to their solid support (52). To investigate the extent of dye spread between C6 glioma cells wild-type and transfected with Cx43 and Cx32 coupled by gap junctions, De Vuyst et al. proposed bipolar-pulsed high frequency electroporation by a small two-wire electrode positioned close to the cells (51).

Gap-FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)

Principle. The irreversible photochemical bleaching reaction of fluorescent molecules exposed to a light beam of sufficient intensity and of wavelength within the absorption spectrum of the fluorochrome forms the basis of the FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) techniques. FRAP experiments started in the 1970s using lipophilic or hydrophilic fluorophores such as fluorescein coupled to protein and lipid (53,54). The FRAP method has been devised for measuring the two-dimensional diffusion of fluorescently labeled macromolecules in membranes, cytoplasm, and organelles. Fluorescent molecules in a small region of the cell are irreversibly photobleached using a high-powered laser beam, and subsequent movement of surrounding nonbleached fluorescent molecules into the photobleached area is recorded at low laser power (55). FRAP data requires that the bleach event is much shorter than the recovery time and preferably as short as possible (56). Fluorescence recovery occurs in the bleached area. Corresponding diffusion constants or flow velocities are determined by analysis of the spatial and temporal kinetics of fluorescence recovery. The gap-FRAP technique enlarges the FRAP technique to study the functionality of gap junctional intercellular communication channels (57). In the gap-FRAP technique, the size and the chemical and biophysical properties of the fluorescent molecules define the communication capacity, allowing quantification of this functionality even if the tracers have no metabolic role (57). A fluorescent diffusion tracer is first introduced at uniform concentration into all the cells in a tissue culture dish, and a concentration gradient is created by photobleaching the fluorescence in one cell. If the bleached cell communicates with neighbor cells by means of functional gap junction channels, resolution of this concentration gradient is detected by monitoring the fluorescence signal, using low-intensity excitation (Figure 2D) (18). Typically, cells are loaded with

lipophilic tracers such as 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) or calcein acetoxymethyl ester (AM) (Table 1), and dyes are retained inside the cells due to the hydrolysis by cytoplasmic esterases into carboxyfluorescein (CF) or calcein, respectively. According to their low molecular weights (376 Da and 622 Da, respectively, Table 1), they have been shown to permeate gap junction channels (58–60). After the loading process, the cell culture slides are washed several times to remove the fluorochrome-ester and to prevent further dye loading during subsequent measurements. This is followed by a light irradiation, leading to dye photobleaching in the targeted cell. If the tracer is hydrophilic and its molecular weight lower than 1 kDa, recovery of fluorescence in the bleached area is the result of an influx of unbleached dye from neighboring cells via gap junctions. The degree of fluorescence recovery is directly proportional to the degree of functional gap junction coupling. Assuming that the fluorescence signal measured under constant experimental conditions is proportional to dye concentrations, the equation can be written as:

$$F(t) = F_o + (F_\infty - F_o)(1 - e^{-t/\tau}) \ ,$$

[Eq. 1]

where $F(t)$ is the normalized fluorescence intensity at time t after photobleaching; F_∞ is the asymptotic value to which the fluorescence intensity tends; F_o is the theoretical fluorescence intensity estimated at t = 0 s after photobleaching, which is close to its experimental value; and τ is the time constant.

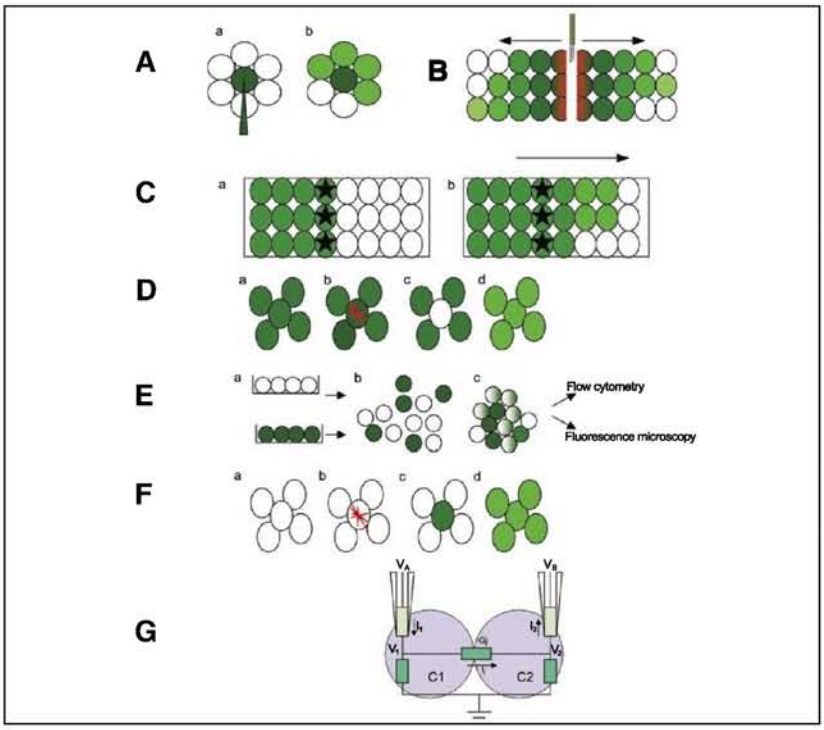

Figure 2. Methods to study gap junctional intercellular communication (GJIC). (A) Microinjection: (a) injection of fluorescent membrane–impermeable but gap junction–permeable dye (green) is performed in the targeted cell; (b) if the adjacent cells are coupled by gap junctions, dye will diffuse and label them, otherwise the adjacent cells remain unlabeled. (B) Scrape loading: Cells along the scraped line are loaded with fluorescent dye (green) and a nonpermeable fluorescent dye (red). The tracer diffuses to the neighboring cells in a few minutes through gap junctions. The distance the fluorescent dye travels within a designated period away from the scrape line is indicative of GJIC. (C) Electroporation: (a) an electric pulse is applied, causing the dye's penetration (green) into the cells growing on the conductive part of the slide; (b) migration of the dye through gap junctions to nonelectroporated cells is observed. Border cells on conductive slide are represented by black stars. (D) Gap-FRAP (fluorescence recovery after photobleaching): (a) cells after dye exposure; (b) cells during photobleaching of the targeted cell; (c) cells just after the photobleaching time; (d) end of fluorescence recoveries through gap junctions in the targeted cell. (E) Preloading assay: (a) green cells are "donor" cells, preloaded with gap junction–permeable dye and white cells are "acceptor" cells, unloaded with gap junction–impermeable dye; (b) "donor" and "acceptor" cells plated together to form confluent monolayer cells; (c) after a short time the fluorescent dye will pass from the "donor" cells to "acceptor" cells. This transfer characterizes efficient gap junction channels and is analyzed either by flow cytometry or fluorescence microscopy. (F) LAMP (local activation of molecular fluorescent probe): (a) cells after dye exposure; (b) cells during photoactivation of the targeted cell; (c) cells just after the illuminating time; (d) fluorescence diffusion through gap junctions to neighboring cells. (G) Dual whole-cell patch clamp applied on equivalent circuit for a pair of cells C1 and C2. Voltage is imposed by source V_A and V_H into cells through electrodes V_1 and V_2, respectively. When a voltage command step is applied to C1, an incremental current is required to maintain the voltage of C1. Electric current (I_1) flows from the C1 to the C2 and to earth, through junctional and nonjunctional pathways, respectively. Since C2 is voltage-clamped, the patch clamp amplifier produces the electric current (I_2) in order to maintain a constant cell potential. I_2 is equal in magnitude and opposite sign to I_j (junctional current). The junctional conductance (G_j) can be calculated by simply dividing the junctional current by the voltage step applied to C1 (109,122).

Advantages. To follow the functionality of GJIC, the gap-FRAP technique shows advantages compared with other strategies, being noninvasive, easier, and faster than approaches such as dye transfer by microinjection. Moreover, as it was demonstrated by the cell-to-cell spread of a fluorescent diffusion tracer introduced into a cell by microinjection or scrape loading, the permeability of the gap junctions is not restricted to the small intracellular electrolytes that carry the junctional currents (14,37). Quantitative data on the permeability of the gap junctions for larger solutes, which include second messengers and other signaling molecules, contribute to the understanding of their function. Microinjection and scrape-loading methods provide information on the expression of functional gap junctions and on the size of the permeating molecules, but permeability coefficients have usually not been obtained with these techniques (18).

The gap-FRAP approach enables users to quantify and compare GJIC capacity between characterized cell types. Kinetic curves can be established to precisely measure the functionality of GJIC. Gap-FRAP is useful to study individual cells within a population. With the gap-FRAP method, the initial and boundary conditions of the diffusion system can usually be reduced, with a precision sufficient for practical purposes, to those of a simple system of two compartments separated by a permeable membrane. The first compartment comprises the cell or the set of cells connected by gap junctions to the

photobleached cell, which constitutes the second compartment. Furthermore, with appropriate caution, the risk of cell injury, which in microinjection or scrape-loading experiments requires constant attention and may be difficult to recognize, is usually negligible with the gap-FRAP method. A further advantage of the gap-FRAP technique is the possibility to obtain paired data in control and test conditions and to perform relatively long-term observation on the same cells (18).

Limitations. The gap-FRAP technique requires a laser beam coupled with an epifluorescence microscope or, commonly, a confocal laser-scanning microscope, all of which are sophisticated and expensive instruments. To avoid photochemical and/or thermal cell injury, a highly sensitive light detector should be used; the minimization of illumination thereby reduces the amount of energy absorbed by the specimen. Excessive dye loading and/or fluence rate (fluence rate is identical to irradiance; that is, the flux density crossing the irradiated surface) may also cause cell damage or impairment of gap junctional communication by increasing the release of acids during intracellular hydrolysis of the ester, or of free radicals and reactive oxygen species during photobleaching. Cell-permeable dyes such as 2′, 7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM, Table 1) have been used in the gap-FRAP technique; however, as very strong laser light is required to rapidly photobleach fluorophores in a whole cell, the possible photodamage due to such intense laser illumination on cells needs to be assessed (40). Decreasing the bleach time, acquisition time, or the excitation beam intensity could avoid cell damage (56). In addition, the FRAP technique may be incompatible with multicolor imaging when other biochemical changes inside the cells need to be monitored by fluorescent sensors (40). In fact, an identical photobleaching protocol can lead to different photobleaching percentages as a function of cell type, resulting from either variability in optimal esterase activity or leakage of fluorescent dye by active transport (61). To apply Equation 1 to analyze dye transfer rates across gap junctions, it would be required that dyes diffuse much more rapidly in the cytosol than across Cx channels, so the rate-limiting step for intercellular dye passage is gap junction permeation. Whatever the gain in speed of the apparatus, the gap-FRAP method is not appropriate for measuring fast changes of the gap junction properties during application of a chemical or physical agent, as can be done by recording the electrical conductance (18).

Significant studies and applications. Gap-FRAP has been widely used for in vitro studies since 1986 (Table 2). As recently described by Zündorf et al.,

Table 2. Comparison of Methods for Studying Intercellular Communication

Properties	Micro-injection	Scrape Loading/ Electroporation	Gap-FRAP	Preloading Assay	LAMP	Radiolabeled Nucleotides Transfer	ICW	Dual Whole-cell Patch Clamp
Invasiveness	Invasive	Invasive	Noninvasive Possible photo-damage	Noninvasive	Noninvasive	Noninvasive	Invasive	Invasive
Cell integrity	Broken	Broken	Maintained	Maintained	Maintained	Maintained	Depends on stimulus intensity	Broken
Number of cells analyzed	Limited	High	Limited	Limited High (by FC analysis)	Limited	Limited	Limited	Limited to two cells
Temporal resolution	Low	Low	Good	Low	Good	Low	Good	High
Simplicity of set up	Time-consuming	Easy	Easy Requires high-power laser	Easy	Easy	Easy	Technically demanding and time-consuming	Technically demanding and time-consuming
Quantification of molecular transfer rate	Number of dye-coupled cells	Distance of diffusion from scrape line	Kinetic of dye recovery	Number of dye-coupled cells	Kinetic of dye diffusion	Autoradiographic labeling	Amplitude, velocity	Junctional conductance
Multicolor imaging	Feasible	Feasible	Not described	Feasible	Feasible	Feasible	Feasible	Feasible
Experiments	In vitro Ex vivo	In vitro Ex vivo (by scrape loading)	In vitro Ex vivo Potentially in vivo	In vitro	In vitro Potentially ex vivo and in vivo	In vitro	In vitro Ex vivo	In vitro
Main applications	Carcino-genesis Embryo-genesis Growth control Physiology	Carcinogenesis Embryogenesis Growth control	Carcinogenesis Embryogenesis Growth control	Carcinogenesis Embryogenesis Growth control Immunology (by FC analysis)	Metabolism	Metabolism	Physiology (e.g., astrocytes)	Physiology (cardiovas-cular system)

FC, flow cytometry; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; ICW, intercellular calcium waves; LAMP, local activation of molecular fluorescent probe.

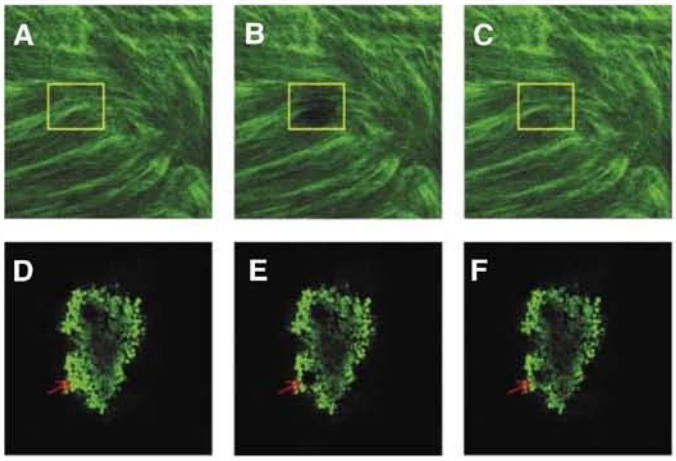

Figure 3. Representative images of dye transfer by gap-FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) technique on multicellular three-dimensional model exposed to calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) as smooth muscle from mouse (A, B, C) and as head and neck squamous cell carcinoma spheroid (D, E, F). The bleached carboxyfluorescein molecules from a targeted area are indicated by a yellow rectangle or a red arrow, respectively. Each column introduces the three specific steps of the gap-FRAP technique: the left column shows recordings before photobleaching; the middle column, acquisitions just after the photobleaching time, and the right part shows fluorescence recoveries. A noticeable fluorescent gradient can be observed in the targeted area indicating functional gap junctions. Scale bars: 150 µm.

the gap-FRAP technique also permits detection of heterocellular dye transfer and analysis of the existence of functional heterocellular gap junctions between astrocytes and neurons in vitro (62).

Our group used the gap-FRAP technique to compare fluorescence recovery parameters after photobleaching in three cell types characterized by different patterns of phosphorylated Cx43, leading to different GJIC capacities being measured by two fluorescent tracers, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and calcein-AM (Table 1). We demonstrated that the choice of the dye did not significantly influence the fluorescence recovery percentages despite a cell line–dependent CFDA release, contrary to the fluorescence kinetic profiles. Calcein-AM seemed appropriate to allow discrimination in short duration experiments and to assess relative transfer constants not limited to one targeted cell but to a targeted surface in tissue analysis. However, the development of a sophisticated device to apply gap-FRAP on biopsies or in situ could be partly limited by the choice of the fluorescent dye. Due to its high spontaneous release, CFDA would not induce a clear delineation between the loading cells and the extracellular environment (60).

We have evaluated the potential of gap-FRAP to measure GJIC on a spheroid 3-D model with a confocal laser-scanning microscope as illustrated in Figure 3. In order to assess quantitative parameters characterizing spatial distribution of FRAP in three dimensions, the development of adapted behavioral models appears to be an essential condition. In fact, very few studies were reported in the literature concerning GJIC studies performed by gap-FRAP assays for a 3-D analysis from tissue organotypic slices (63,64), medial collateral ligament, and cartilage (59,65).

Preloading Assay or Parachute Assay: Incorporation of Membrane-permeable Fluorogenic Molecules

Principle. The preloading assay is a direct method developed by Goldberg et al. in 1995 to study functionality of GJIC (66). This method consists of preloading cells with a gap junction–permeable dye, such as calcein-AM, and then letting suspended loaded and unloaded cells form a confluent monolayer together. The principle of the parachute assay can be considered as similar, except that the loaded cells adhere to a monolayer of unloaded cells. As suspended loaded cells are added to the monolayer, the parachute assay requires formation of gap junction channels in order to measure subsequent intercellular communication. The parachute assay was described by Ziambaras et al. in 1998 to study whether stretch, an anabolic stimulus for osteoblasts, modulated direct intercellular communication in these cells (20). After a short time, the fluorescent dye passes from the "donor" cells to "acceptor" cells. Second, third, and higher order cells also take the dye, depending upon the degree of coupling (Figure 2E). Depending on the technique used, loaded cells make contact with unloaded cells within 15 min to 3 h, and the intercellular spreading of calcein can be observed and documented with, for instance, an epifluorescence microscope (20,66). The intercellular passage of calcein through gap junction channels results in the progressive increase of green fluorescent recipient cells (Figure 2E [c]). Under an epifluorescence microscope, intercellular communication is assayed as the number of unlabeled cells receiving fluorescent dye from a donor cell. This procedure is one way to visually quantify a large number of cells (66). Donor and recipient cells can also be assayed by flow cytometry (67). In this case, ester-loaded or unloaded cell populations can be labeled with a marker such as Di-I, which permanently labels cell membranes and makes cytometric identification of donor and recipient cells possible, even when both are of the same cell type (22).

Coupling time is defined as the time leading to the strongest coupling efficiency. Thus, the time course of the dye spreading depends not only on the intrinsic ability of recipient cells to allow the spreading of the dye, but also on the coupling of donor cells with recipient cells. Ultimately, the time course depends on the number of active gap junctions and on their permeability for the selected dye. In some experiments, carbenoxolone, a specific gap junction blocker, was added to ascertain whether the intercellular transfer assay was effectively dependent on GJIC (68).

Advantages. Using an AM ester, the parachute technique is a noninvasive method since integrity of the cells is maintained.

Flow cytometry enables simultaneous analysis of a large number of cells (at least 10^4 cells) (22). It ensures objectivity and statistically reliable data. Moreover, the accuracy and the high sensitivity to discriminate variation in fluorescence intensity have further advantages, especially when applied to measurements

of the effects of chemicals on junctional communications. The high sensitivity of the flow cytometry assay of dye transfer, too, allows a precise evaluation of the amount of transferred dye in recipient cells by analyzing their mean fluorescence intensity, using the appropriate detector (22). It resolves both the dynamics of initial cell-to-cell contact and the saturation state of coupling in monolayer cells (19). Finally, flow cytometry allows evaluation of multiple parameters at the same time (22). The quantitative end point, where the measurement of dye transfer concerns a large number of cells, gives a solid basis for a reliable result. The flow cytometer method may therefore be an interesting supplement to other dye transfer methods as a screening assay for substances with possible teratogenic and embryotoxic properties (17).

Limitations. This method is not applicable to the vast majority of adherent cell types in culture (31). By flow cytometry, nonspecific dye transfer of calcein has been observed in many studies (69,70). The preloading assay is also a time-consuming method that is influenced by the section studied (cells in different areas of the dish can behave differently), the resolution, and sensitivity of the microscope equipment (19). This technique cannot be used to investigate coupling within intact tissue.

Significant studies and applications. Flow cytometry is a useful approach to study GJIC of circulating cells (Table 2). To determine whether the changes in Cx43 expression produced by treatment with angiotensin II and ethanol are associated with functional changes, Bokkala et al. used the parachute assay to measure GJIC in white blood cells subjected to various treatment conditions (71). Assembly of Cx into gap junctions providing direct intercellular channels that link attached lymphocytes subpopulations (T, B, and natural killer lymphocytes) was demonstrated by using this dye transfer technique (72). By monitoring the calcein dye transfer from the stroma to leukemic cells, Paraguassu-Braga and colleagues described, using flow cytometry, the effect of GJIC on leukemic cell growth and death (73). Flow cytometry is widely used to study intercellular communication in different cell types, including endothelial cells, tumor cells, fibroblasts, and stromal cells (22,72,74,75) and enables comparison of dye transfer efficiency by different Cx isoforms (76).

LAMP (Local Activation of Molecular Fluorescent Probe)

Principle. Local activation of molecular fluorescent probe (LAMP) is an imaging assay of gap junctional communication based on a new generation of caged fluorophores (40). This noninvasive method is able to provide quantification of a permeable dye by multiple measurements. Photocaged fluorescent dyes have wide applications in tracking the spatiotemporal dynamics of molecular movements in biological systems. These caged tracers are weakly or nonfluorescent when key functional groups of fluorophores are masked by photolabile protecting groups (cages). Photoactivation removes the protecting group (uncaging) and abruptly switches on the fluorescence of parent dyes (Figure 2F).

A class of photoactivable fluorophores was developed and tested (40). An esterified nonfluorescent coumarin derivative can diffuse into cells, remaining nonfluorescent. The dyes are retained inside the cells due to their hydrolysis by cytoplasmic esterases, thus they can diffuse across cellular gap junctions. A brief illumination of a single cell or cell region efficiently photoconverts the trapped molecule into a fluorescent, gap junction–permeable species, and fluorescence is followed as a function of time in the coupled neighbor (77). Subsequent fluorescence imaging provides dynamic information of dye transfer from the donor cell to the receptor cell.

Advantages. Under ideal conditions, the technique is noninvasive, offering dynamic and quantitative information of dye transfer as well as multiple measurements of dye transfer in the same coupled cell pair to find changes of molecular permeability of Cx channels. The nonfluorescent 1-(2-nitrophenyl)ethyl (NPE)-caged coumarins/AM can be loaded into fully intact cells, and NPE-caged coumarins can be photolysed with a small dose of ultraviolet (UV) light. In contrast, techniques such as microinjection or patch clamping breach cell membranes and may cause loss or dilution of cytosolic factors involved in the gating of Cx channels. Maintaining cell membrane integrity is especially important for studying the regulation of gap junction communication by cellular biochemical changes.

The second advantage is that the LAMP assay can reliably detect changes in molecular permeability of Cx channels in coupled cell pairs. This crucial feature mainly results from two desirable properties of the newly developed caged fluorophore: the cell-loading efficiency of NPE-caged coumarins/AM and the small molecular size of caged coumarins. As NPE-caged coumarins/AM can be loaded into cells to fairly high concentrations, the LAMP technique can be applied several times in a coupled cell pair once the previous episodes of dye diffusion reach equilibrium. This allows multiple measurements of kinetics of dye transfer in cell pairs and thus detects changes in cell coupling. The small molecular size of caged coumarins ensures that the fluorophore can quickly diffuse across Cx channels to reach equilibrium in coupled cells. This rapid dye transfer facilitates quantitative analysis of kinetics of junctional diffusion using Fick's equation, and it improves the sensitivity of the detection when there are changes in the permeability of Cx channels. The last major advantage is that the LAMP assay can be used in conjunction with other fluorescent sensors for multicolor imaging. Because caged coumarins emit blue fluorescence, it spectrally complements a variety of fluorescence indicators that emit green or red light (40).

Applications. This technique is mainly applied to study the dynamic regulation of gap junction coupling by intracellular Ca^{2+} in individual cell pairs of human primary fibroblasts, for instance, and also to assess how Ca^{2+} influx affects junctional coupling on HeLa cells expressing Cx26 (77,78). LAMP is limited to examination of changes in coupling in individual cell pairs, although it is likely to be useful in multiwell plate assays with confluent cell monolayers as well. Furthermore, the combined use of the patch clamp method and LAMP would make it possible to correlate junctional conductance with permeability in cell pairs expressing different Cx, although cell volumes would still need to be taken into account (77).

ENDOGENOUS COMPOUNDS TRANSFER

Radiolabeled Nucleotides Transfer

Principle. Many molecules that are expected to be exchanged in vivo by

coupled cells have various dimensions and charges and hence may be restricted or facilitated in their passage through gap junction channels, depending on the type of Cx (12,31). Some investigators have examined the transfer of endogenous compounds by metabolic cooperation, fluorescent detection methods, or indirectly through induced metabolic effect (79–81). Major investigations have used the transfer of synthetic tracer molecules rather than endogenous metabolites. In the metabolic cooperation approach, a population of donor cells is incubated in the presence of an excess of a radiolabeled precursor (typically uridine) and then co-cultured with unlabeled recipient cells. Under such conditions, quantitative autoradiography enables evaluation of the transfer of the resulting metabolites from loaded to unloaded cells as a function of time. In this type of experiment, coupling is demonstrated by the autoradiographic labeling of the cytoplasm of recipient cells due to the incorporation in their ribonucleic acid of radiolabeled nucleotide synthesized within donor cells and transferred across Cx channels (31).

Advantages. Radioactive nucleotide transfer allows for a direct evaluation of the permeability of Cx channels to endogenous molecules. This technique is a highly sensitive method to appreciate transfer of molecules. Contrary to synthetic dyes, radioactive nucleotide transfer may accurately represent the ability of gap junction to mediate the transfer of biological endogenous metabolites (82).

Limitations. It is possible that incorporation by recipient cells of labeled nucleotides and nucleic acids lost by damaged donor cells may also be observed (31). Safety must be rigorously adhered to, particularly to deal with aerosol produced during cell sorting procedures, incubation, and metabolic labeling (83). While studies of metabolic cooperation can be used to garner information about transjunctional metabolites, they are not very quantitative, nor very specific, and are limited to the specific system they are used to investigate (4).

Significant studies and applications. Goldberg et al. developed a quantitative method to identify, by high-performance liquid chromatography screening, the entire set of native molecules that is exchanged between coupled cells using [^{14}C]-glucose as a radiolabeled precursor (84,85). Donor cells are labeled with a fluorescent marker larger than the gap junction channel limit to permit separation and, with radioisotope, to metabolically label transjunctional molecules. Goldberg et al. used this method to capture, identify, and quantify the junctional transfer of endogenous metabolites between C6 glioma cells transfected with Cx43 and Cx32 (84,86).

Intercellular Calcium Waves

Principle. Cytoplasmic calcium increases that propogate from cell to cell, which are called intercellular calcium waves (ICW), have been described in many different cell types by a number of investigators. This technique can measure gap junctional communication efficacy indirectly. Mechanical, chemical, or electrical stimulation of an individual cell initiates an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration that spreads across the cell. At the cell border this intracellular Ca^{2+} wave is arrested but, after a brief delay, similar Ca^{2+} waves occur in adjacent cells. The repetition of this process results in the propagation of an intercellular Ca^{2+} wave through a limited number of cells (87). The distance the wave propagates appears to depend on the magnitude of the initial stimulus (88). The propagation of intercellular Ca^{2+} waves correlates with the presence of functional gap junctions and occurs in the absence of extracellular Ca^{2+} or following the microinjection of inositol triphosphate (IP_3) (87). Models for the propagation of ICW have been proposed (88,89).

In the technique, cells are loaded with a calcium-sensitive fluorescent dye. Two calcium indicators are mainly used, fura-2 (5-oxazolecarboxylic acid, 2-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl) with two wavelengths of excitation (340 and 380 nm) and one of emission (90) or fluo-3 (glycine, N-[2-[[[[2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenoxy]methyl]methyl]oxy]-4-methylphenyl]-N-(carboxymethyl), with one wavelength of excitation (490 nm) and one of emission (91). After loading, cells can be mechanically stimulated by manually or automatically moving a glass pipette onto the single-cell surface to transiently depress the apical membrane, or chemically stimulated by introducing an agent (92). Stimulation generates IP_3, which diffuses to neighboring cells through gap junction channels, and then triggers calcium release from IP_3-sensitive intracellular calcium stores (93). A variation in dye fluorescence intensity is measured in correlation with the propagation of ICW from cell to cell. Different parameters may be measured, such as velocity, amplitude, and efficacy of calcium wave spread (94).

Advantages. Fura-2 binding with calcium involves a shift of the excitation wavelength from 380 to 340 nm. The ratio of fluorescence signals measured during a response gives an accurate measure of ionic concentration independently of concentration of the fluorochrome or photobleaching caused by exposure of the whole field to the excitation light source (90). For fluo-3, one excitation wavelength leads to rapid kinetic measures. Fluo-3 can be used commonly with a confocal microscope associated with a 488 nm argon laser, which minimizes cell injury. Mechanical stimulation to induce ICW with a fine micropipette is an accurate protocol for single-cell stimulation (95).

Limitations. The mechanism whereby Ca^{2+} waves pass between cells is not completely elucidated: both intracellular and extracellular pathways were observed in some cell types under some conditions. Calcium waves may propagate from cell to cell by the secretion of a Ca^{2+} mobilizing agonist, potentially ATP, as a diffusible extracellular messenger (96,97). In fact, ICW depend not only upon the composition and distribution of gap junction channels but also the tissue expression of purinergic receptor subtype (96).

Measurements with fura-2 require equipment capable of fast switching between excitation filters or monochromators in order to perform both excitations successively. Acquisitions will be speed limited and, moreover, UV irradiation can induce cell injury. An accurate calibration of Ca^{2+} concentration is not convenient with fluo-3. Although both chemical and electrical stimulation trigger ICW, these methods have the disadvantage of simultaneously stimulating adjacent cells. Mechanical stimulation may induce microleaks in the plasma membrane and a reproducible stimulus strength is difficult to attain (95). A signaling cascade is

induced at the time ICW are stimulated; in addition to increased IP_3, other second messengers that may influence cellular response are produced (95).

Applications. Intercellular calcium waves were measured in a wide variety of primary cultured cells, including astrocytes (98,99), epithelial cells (100,101), hepatocytes (102,103), and endothelial cells (104). These observations have been extended to more integrated systems (105,106) and in perfused organs (107,108). A more sophisticated approach was proposed by Leybaert and Sanderson to stimulate single cells: the liberation of a cellular second messenger by flash photolysis of a caged compound to induce ICW (95). This method is based on the increase of cytoplasmic IP_3 by flash photolysis of caged IP_3 to activate the intracellular gap junctional pathway. They showed that flash photolysis of caged IP_3, and the resulting modulation of ICW, is a very sensitive technique to study cell-to-cell coupling. An exhaustive protocol was described by Leybaert and Sanderson's group in Reference 95.

CONDUCTANCE MEASUREMENT BY DUAL PATCH CLAMP

Principle. For the gap junction channels studied thus far, permeability and conductance are linearly related, so that measurement of conductance reliability reports the number of open gap junction channels (109). The first quantitative recordings of the single-channel current from an intercellular junction, presumably a gap junction, was made by Neyton et al., using the dual whole-cell patch clamp method in pairs of cells isolated from rat lacrimal gland (110). This sensitive method is of high temporal resolution for monitoring junctional conductance. The dual patch clamp technique is a powerful method for quantitative determination of junctional conductance (111). In the first applications of this method, each cell of a cell pair was impaled with two microelectrodes, allowing independent injection and voltage control. Currently, the most widely used dual-voltage clamp method is the double whole-cell voltage clamp technique with one suction pipette on each cell of a cell pair (109). Although at first, two-electrode voltage-clamp amplifiers were used (i.e., each cell had to be impaled by two microelectrodes), single-electrode voltage-clamp amplifiers have been used ever since the tight seal whole-cell recording technique became available (112).

The dual whole-cell patch clamp method is the most sensitive technique to detect functional gap junctions: a single gap junction channel can be recorded, in contrast to dye transfer. The method consists of separately controlling the membrane potential of each cell and measuring the corresponding currents. Figure 2G shows the equivalent circuit for a pair of cells.

Advantages. In contrast to dye transfer, evaluation of electrical conductance between cells is exquisitely sensitive. This is the most common method to assay the electrical properties of gap junctions. The technique has been used to study ionic permeability and selectivity of Cx channels. Measurements of electrical conductance between cells can be used to determine the number of gap junction channels that are open within a given period of time (4).

Limitations. Intercellular current measurements do not necessarily correlate with the kinetics of molecular transfer through gap junctions (113), and quantification of junctional conductance can be especially problematic in well-coupled cells where contributions of series resistance can outweigh junctional resistance (109). Permeability of the gap junctions is a measure of the cell-to-cell exchange of molecules driven by their kinetic energy and should not be confused with the electrical conductance that describes the ionic currents driven by a gradient of electrical potential. The information acquired by these two kinds of data are therefore not equivalent in the sense that knowledge of the conductance of a unit junctional channel for a particular ion cannot be used to predict the permeability of a given molecule (18).

In addition, analysis of electrical conductance is a slow, labor-intensive, and expensive technique. Measurement of junctional conductance (G_j) with patch clamp amplifiers can, due to series resistance problems, be subject to considerable errors when large currents are measured. Series resistance is a problem mainly in situations in which gap junction resistance (R_j) and/or membrane resistance is low, because large currents will flow (Figure 2G), and, according to Ohm's law, this will result in large voltage drops across the series resistance. In those situations, errors in the measurement of G_j can become as large as 70%. To correct for the errors introduced by series resistance, several correction formulas were proposed that take into account either series resistance alone or a combination of series resistance and cell input resistance (114). All these formulas depend critically on an exact estimate of the series resistance, which is not always easy to obtain (112). Under conditions of low membrane resistance, it is necessary to use a correction method that takes both membrane and series resistance into account (31). Thus, dual patch clamp recording is a quantitative technique to determine static and dynamic electrical characteristics of gap junction channels; however, as with most experimental techniques, the dual patch clamp has several drawbacks, which vary from quantitative errors in measured conductance or underestimation of voltage dependence to unwanted perfusion of the cytoplasm (111). The pipette solution is brought into contact with the cytoplasm by rupturing with gentle suction, the membrane under the tip of the pipette. The small tip becomes partially clogged with an access resistance to the cell interior that is considerably larger than resistance of the pipette alone. The pipette series resistance has been reported to increase during an experiment, probably due to an increase in pipette clogging or a slight drift of the cell surface away from the pipette (109).

Significant studies. As cell dissociation and culture procedures have been improved, the dual whole-cell recording technique has been applied to a wide variety of tissue (115). Dürig et al. showed that functional Cx43-type gap junctions exist between stromal cells and immature hematopoietic progenitor cells and may provide an important regulatory pathway in hematopoiesis (116). The authors used electrophysiological methods to assess cell-to-cell communication that have been shown to be superior to dye-coupling experiments in terms of sensitivity and their applicability to different gap junction subtypes. Junctional conductance measurements can be used to quantitate and compare the transfer of specific molecules through gap junctions formed by one type of Cx; moreover, substituting ions in the patch clamp electrodes can reveal the preferential transfer of specific ions that travel through different gap junction isoforms (4,117–119). The size

permeability for small molecules and the connected electrophysiological properties of a gap junction are dependent on the gap junction pore size as generated by the respective Cx isoforms (120). In experiments described by Bukauskas et al., communication-incompetent cell lines transfected with Cx43 fused to enhanced green fluorescent protein were examined in order to compare Cx43 distribution determined by fluorescence microscopy and electrical coupling measured at single-channel resolution in living cell pairs (121). Dual whole-cell patch recording was combined with imaging microscopy to show that only gap junction channels assembled into junctional plaque are functional.

CONCLUSION

Here, we have reviewed several techniques allowing the characterization of GJIC. These methods are not equivalent but provide complementary information (Table 2). Dye transfer methods have been considered to be the reference technique for 40 years. LAMP, the more recent imaging method, based on a newly described photoactivatable fluorophore, promises to illuminate how gap junctions mediate intercellular coupling. The scrape-loading technique and microinjection can be effectively used as tools to determine the qualitative presence or absence of GJIC. Quantitative methods such as gap-FRAP and LAMP facilitate measurement of kinetics through gap junction channels to determine, for example, the permeability constant. Conductance measurement by dual patch clamp is considered the most sensitive method to precisely measure and follow modifications in GJIC; nevertheless, in order to appreciate the transfer of endogenous molecules, the transfer of radioactive nucleotides appears to be a sensitive method.

The methods described in this review are mainly used for in vitro applications. Some of them have been extended successfully to ex vivo studies (Table 2). Dye transfer by microinjection, scrape loading, and gap-FRAP can be used today for ex vivo measurements, and the LAMP technique seems appropriate to perform future 3-D studies.

In the coming years, the major challenge for the intercellular communication field will be to further investigate the functionality of gap junction channels in situ, under both physiological and pathological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. **Bruzzone, R., T.W. White, and D.A. Goodenough.** 1996. The cellular Internet: on-line with connexins. Bioessays *18*:709-718.
2. **Leithe, E., S. Sirnes, Y. Omori, and E. Rivedal.** 2006. Downregulation of gap junctions in cancer cells. Crit. Rev. Oncog. *12*:225-256.
3. **Söhl, G. and K. Willecke.** 2004. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc. Res. *62*:228-232.
4. **Alexander, D.B. and G.S. Goldberg.** 2003. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. Curr. Med. Chem. *10*:2045-2058.
5. **Hervé, J.C., N. Bourmeyster, and D. Sarrouilhe.** 2004. Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. Biochim. Biophys. Acta *1662*:22-41.
6. **Brink, P.R., K. Cronin, and S.V. Ramanan.** 1996. Gap junctions in excitable cells. J. Bioenerg. Biomembr. *28*:351-358.
7. **Murray, S.A. and W.H. Fletcher.** 1984. Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. J. Cell Biol. *98*:1710-1719.
8. **Kalimi, G.H. and C.W. Lo.** 1989. Gap junctional communication in the extraembryonic tissues of the gastrulating mouse embryo. J. Cell Biol. *109*:3015-3026.
9. **Loewenstein, W.R.** 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev. *61*:829-913.
10. **Loewenstein, W.R. and Y. Kanno.** 1964. Studies on an epithelial (gland). Cell junction. I. Modifications of surface membrane permeability. J. Cell Biol. *22*:565-586.
11. **Bruzzone, R., T.W. White, and D.L. Paul.** 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. Eur. J. Biochem. *238*:1-27.
12. **Bevans, C.G., M. Kordel, S.K. Rhee, and A.L. Harris.** 1998. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. J. Biol. Chem. *273*:2808-2816.
13. **Meda, P.** 2000. Probing the function of connexin channels in primary tissues. Methods *20*:232-244.
14. **Kanno, Y. and W.R. Loewenstein.** 1964. Intercellular diffusion. Science *143*:959-960.
15. **Peracchia, C.** 1980. Structural correlates of gap junction permeation. Int. Rev. Cytol. *66*:81-146.
16. **Stewart, W.W.** 1978. Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. Cell *14*:741-759.
17. **Juul, M.H., E. Rivedal, T. Stokke, and T. Sanner.** 2000. Quantitative determination of gap junction intercellular communication using flow cytometric measurement of fluorescent dye transfer. Cell Adhes. Commun. *7*:501-512.
18. **Délèze, J., B. Delage, O. Hentati-Ksibi, F. Verrecchia, and J.C. Hervé.** 2001. Fluorescence recovery after photobleaching. Methods Mol. Biol. *154*:313-327.
19. **Czyz, J., U. Irmer, G. Schulz, A. Mindermann, and D.F. Hulser.** 2000. Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. Exp. Cell Res. *255*:40-46.
20. **Ziambaras, K., F. Lecanda, T.H. Steinberg, and R. Civitelli.** 1998. Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. J. Bone Miner. Res. *13*:218-228.
21. **Jongen, W.M., D.J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T.J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi, and H. Yamasaki.** 1991. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca2+ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. J. Cell Biol. *114*:545-555.
22. **Fonseca, P.C., O.K. Nihei, W. Savino, D.C. Spray, and L.A. Alves.** 2006. Flow cytometry analysis of gap junction-mediated cell-cell communication: advantages and pitfalls. Cytometry A *69A*:487-493.
23. **Frank, D.K., B. Szymkowiak, O. Josifovska-Chopra, T. Nakashima, and K.W. Kinnally.** 2005. Single-cell microinjection of cytochrome *c* can result in gap junction-mediated apoptotic cell death of bystander cells in head and neck cancer. Head & Neck *27*:794-800.
24. **Imaizumi, K., Y. Hasegawa, T. Kawabe, N. Emi, H. Saito, K. Naruse, and K. Shimokata.** 1998. Bystander tumoricidal effect and gap junctional communication in lung cancer cell lines. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *18*:205-212.
25. **Nicholson, B.J., P.A. Weber, F. Cao, H. Chang, P. Lampe, and G. Goldberg.** 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.
26. **Martinez, A.D., V. Hayrapetyan, A.P. Moreno, and E.C. Beyer.** 2002. Connexin43 and Connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. Circ. Res. 90:1100-1107.
27. **Risley, M.S., I.P. Tan, and J. Farrell.** 2002. Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium. Biol. Reprod. *67*:945-952.
28. **Nitsche, J.M., H.C. Chang, P.A. Weber, and B.J. Nicholson.** 2004. A transient diffusion model yields unitary gap junctional permeabili-

ties from images of cell-to-cell fluorescent dye transfer between *Xenopus* oocytes. Biophys. J. *86*:2058-2077.
29. **Eckert, R.** 2006. Gap-junctional single-channel permeability for fluorescent tracers in mammalian cell cultures. Biophys. J. *91*:565-579.
30. **Ramanan, S.V. and P.R. Brink.** 1990. Exact solution of a model of diffusion in an infinite chain or monolayer of cells coupled by gap junctions. Biophys. J. *58*:631-639.
31. **Meda, P.** 2001. Assaying the molecular permeability of connexin channels. Methods Mol. Biol. *154*:201-224.
32. **Elfgang, C., R. Eckert, H. Lichtenberg-Frate, A. Butterweck, O. Traub, R.A. Klein, D.F. Hulser, and K. Willecke.** 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. J. Cell Biol. *129*:805-817.
33. **Dagli, M.L., H. Yamasaki, V. Krutovskikh, and Y. Omori.** 2004. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. Carcinogenesis *25*:483-492.
34. **Krutovskikh, V.A., M. Oyamada, and H. Yamasaki.** 1991. Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo. Carcinogenesis *12*:1701-1706.
35. **Romualdi, A., H. Niessen, F. Dombrowski, K. Willecke, and T. Ott.** 2002. Quantitative analysis of gap-junctional intercellular communication in precision-cut mouse liver slices. Cell Tissue Res. *307*:315-320.
36. **Levin, M. and M. Mercola.** 1998. Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry. Dev. Biol. *203*:90-105.
37. **el-Fouly, M.H., J.E. Trosko, and C.C. Chang.** 1987. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. Exp. Cell Res. *168*:422-430.
38. **Trosko, J.E., C.-C. Chang, M.R. Wilson, B. Upham, T. Hayashi, and M. Wade.** 2000. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. Methods *20*:245-264.
39. **Opsahl, H. and E. Rivedal.** 2000. Quantitative determination of gap junction intercellular communication by scrape loading and image analysis. Cell Adhes. Commun. *7*:367-375.
40. **Dakin, K., Y. Zhao, and W.H. Li.** 2005. LAMP, a new imaging assay of gap junctional communication unveils that Ca2+ influx inhibits cell coupling. Nat. Methods *2*:55-62.
41. **Pastor, A., M. Kremer, T. Moller, H. Kettenmann, and R. Dermietzel.** 1998. Dye coupling between spinal cord oligodendrocytes: differences in coupling efficiency between gray and white matter. Glia *24*:108-120.
42. **Risley, M.S., I.P. Tan, and J. Farrell.** 2002. Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium. Biol. Reprod. *67*:945-952.
43. **McKarns, S.C. and D.J. Doolittle.** 1992. Limitations of the scrape-loading/dye transfer technique to quantify inhibition of gap junctional intercellular communication. Cell Biol. Toxicol. *8*:89-103.
44. **Sai, K., J. Kanno, R. Hasegawa, J.E. Trosko, and T. Inoue.** 2000. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. Carcinogenesis *21*:1671-1676.
45. **Djalilian, A.R., D. McGaughey, S. Patel, E.Y. Seo, C. Yang, J. Cheng, M. Tomic, S. Sinha, et al.** 2006. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. J. Clin. Invest. *116*:1243-1253.
46. **Decrouy, X., J.M. Gasc, G. Pointis, and D. Segretain.** 2004. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. J. Cell. Physiol. *200*:146-154.
47. **Bittman, K., D.L. Becker, F. Cicirata, and J.G. Parnavelas.** 2002. Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex. J. Comp. Neurol. *443*:201-212.
48. **Raptis, L.H., H.L. Brownell, K.L. Firth, and L.W. Mackenzie.** 1994. A novel technique for the study of intercellular, junctional communication: electroporation of adherent cells on a partly conductive slide. DNA Cell Biol. *13*:963-975.
49. **Vultur, A., E. Tomai, K. Peebles, A.M. Malkinson, N. Grammatikakis, P.-G. Forkert, and L. Raptis.** 2003. Gap junctional intercellular communication in cells isolated from urethane-induced tumors in A/J mice. DNA Cell Biol. *22*:33-40.
50. **Raptis, L., A. Vultur, H.L. Brownell, and K.L. Firth.** 2006. Dissecting pathways; in situ electroporation for the study of signal transduction and gap junctional communication., p. 341-354. *In* J.Celis (Ed.), Cell Biology: A Laboratory Handbook, 3rd ed. Elsevier Academic, San Diego.
51. **De Vuyst, E., M. De Bock, E. Decrock, M. Van Moorhem, C. Naus, C. Mabilde, and L. Leybaert.** 2008. In situ bipolar electroporation for localized cell loading with reporter dyes and investigating gap junctional coupling. Biophys. J. *94*:469-479.
52. **Anagnostopoulou, A., J. Cao, A. Vultur, K. Firth, and L. Raptis.** 2007. Examination of gap junctional, intercellular communication by *in situ* electroporation on two co-planar indium-tin oxide electrodes. Molecular Oncology *1*:226-231.
53. **Reits, E.A. and J.J. Neefjes.** 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. Nat. Cell Biol. *3*:E145-E147.
54. **Edidin, M., Y. Zagyansky, and T.J. Lardner.** 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. Science *191*:466-468.
55. **Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy.** 2001. Studying protein dynamics in living cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*:444-456.
56. **Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet, and G.H. Patterson.** 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. Nat. Cell Biol. *(Suppl)*: S7-S14.
57. **Wade, M.H., J.E. Trosko, and M. Schindler.** 1986. A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. Science *232*:525-528.
58. **Quesada, I., E. Fuentes, E. Andreu, P. Meda, A. Nadal, and B. Soria.** 2003. On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *284*:E980-E987.
59. **Chi, S.S., J.B. Rattner, and J.R. Matyas.** 2004. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. J. Anat. *205*:363-370.
60. **Abbaci, M., M. Barberi-Heyob, J.R. Stines, W. Blondel, D. Dumas, F. Guillemin, and J. Didelon.** 2007. Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: a comparative study. Biotechnol. J. *2*:50-61.
61. **Dive, C., H. Cox, J.V. Watson, and P. Workman.** 1988. Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. Mol. Cell. Probes *2*:131-145.
62. **Zündorf, G., S. Kahlert, and G. Reiser.** 2007. Gap-junction blocker carbenoxolone differentially enhances NMDA-induced cell death in hippocampal neurons and astrocytes in co-culture. J. Neurochem. *102*:508-521.
63. **Frantseva, M.V., L. Kokarovtseva, C.G. Naus, P.L. Carlen, D. MacFabe, and J.L. Perez Velazquez.** 2002. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. J. Neurosci. *22*:644-653.
64. **Wentlandt, K., M. Samoilova, P.L. Carlen, and H. El Beheiry.** 2006. General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices. Anesth. Analg. *102*:1692-1698.
65. **Chi, S.S., J.B. Rattner, P. Sciore, R. Boorman, and I.K. Lo.** 2005. Gap junctions of the medial collateral ligament: structure, distribution, associations and function. J. Anat. *207*:145-154.
66. **Goldberg, G.S., J.F. Bechberger, and C.C. Naus.** 1995. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. BioTechniques *18*:490-497.
67. **Guinan, E.C., B.R. Smith, P.F. Davies, and J.S. Pober.** 1988. Cytoplasmic transfer between endothelium and lymphocytes: quantitation by flow cytometry. Am. J. Pathol. *132*:406-409.
68. **Trovato-Salinaro, A., E. Trovato-Salinaro, M. Failla, C. Mastruzzo, V. Tomaselli, E. Gili, N. Crimi, D.F. Condorelli, and C. Vancheri.** 2006. Altered intercellular communication in lung fibroblast cultures from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir. Res. *7*:122.
69. **Fonseca, P.C., O.K. Nihei, M. Urban-Maldonado, S. Abreu, A.C. de Carvalho, D.C. Spray, W. Savino, and L.A. Alves.** 2004. Characterization of connexin 30.3 and 43 in thymocytes. Immunol. Lett. *94*:65-75.
70. **Koval, M., S.T. Geist, E.M. Westphale, A.E. Kemendy, R. Civitelli, E.C. Beyer, and T.H. Steinberg.** 1995. Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. J. Cell Biol. *130*:987-995.
71. **Bokkala, S., H.M. Reis, E. Rubin, and S.K. Joseph.** 2001. Effect of angiotensin II and ethanol on the expression of connexin 43 in WB rat liver epithelial cells. Biochem. J. *357*:769-777.
72. **Oviedo-orta, E., T. Hoy, and W.H. Evans.** 2000. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood

and tonsil human lymphocyte subpopulations. Immunology *99*:578-590.

73. **Paraguassu-Braga, F.H., R. Borojevic, L.F. Bouzas, M.A. Barcinski, and A. Bonomo.** 2003. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. Cell Death Differ. *10*:1101-1108.
74. **Fick, J., F.G. Barker II, P. Dazin, E.M. Westphale, E.C. Beyer, and M.A. Israel.** 1995. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*:11071-11075.
75. **Ko, K., P. Arora, W. Lee, and C. McCulloch.** 2000. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *279*: C147-C157.
76. **Hulser, D.F., M.L. Rutz, R. Eckert, and O. Traub.** 2001. Functional rescue of defective mutant connexons by pairing with wild-type connexons. Pflugers Arch. *441*:521-528.
77. **Spray, D.C.** 2005. Illuminating gap junctions. Nat. Methods *2*:12-14.
78. **Dakin, K. and W.H. Li.** 2006. Local Ca2+ rise near store operated Ca2+ channels inhibits cell coupling during capacitative Ca2+ influx. Cell Commun. Adhes. *13*:29-39.
79. **Charles, A.C., C.C. Naus, D. Zhu, G.M. Kidder, E.R. Dirksen, and M.J. Sanderson.** 1992. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. J. Cell Biol. *118*:195-201.
80. **Larson, D.M. and J.D. Sheridan.** 1985. Junctional transfer in cultured vascular endothelium: II. Dye and nucleotide transfer. J. Membr. Biol. *83*:157-167.
81. **Saez, J.C., J.A. Connor, D.C. Spray, and M.V. Bennett.** 1989. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*:2708-2712.
82. **Goldberg, G.S., J.F. Bechberger, Y. Tajima, M. Merritt, Y. Omori, M.A. Gawinowicz, R. Narayanan, Y. Tan, et al.** 2000. Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. Cancer Res. *60*:6018-6026.
83. **Goldberg, G.S. and P.D. Lampe.** 2001. Capture of transjunctional metabolites. Methods Mol. Biol. *154*:329-340.
84. **Goldberg, G.S., P.D. Lampe, D. Sheedy, C.C. Stewart, B.J. Nicholson, and C.C.G. Naus.** 1998. Direct isolation and analysis of endogenous transjunctional ADP from Cx43 transfected C6 glioma cells. Exp. Cell Res. *239*:82-92.
85. **Goldberg, G.S., V. Valiunas, and P.R. Brink.** 2004. Selective permeability of gap junction channels. Biochim. Biophys. Acta *1662*:96-101.
86. **Goldberg, G.S., P.D. Lampe, and B.J. Nicholson.** 1999. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. Nat. Cell Biol. *1*:457-459.
87. **Sanderson, M.J.** 1995. Intercellular calcium waves mediated by inositol trisphosphate. Ciba Found. Symp. *188*:175-189.
88. **Sneyd, J., B.T. Wetton, A.C. Charles, and M.J. Sanderson.** 1995. Intercellular calcium waves mediated by diffusion of inositol trisphosphate: a two-dimensional model. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *268*:C1537-C1545.
89. **Sneyd, J., A.C. Charles, and M.J. Sanderson.** 1994. A model for the propagation of intercellular calcium waves. Am. J. Physiol. *266*:C293-C302.
90. **Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien.** 1985. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. *260*:3440-3450.
91. **Minta, A., J.P. Kao, and R.Y. Tsien.** 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J. Biol. Chem. *264*:8171-8178.
92. **Koukoui, O., S. Boucherie, A. Sezan, S. Prigent, and L. Combettes.** 2006. Effects of the prostaglandins PGF2alpha and PGE2 on calcium signaling in rat hepatocyte doublets. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *290*:G66-G73.
93. **Jorgensen, N.R., S.T. Geist, R. Civitelli, and T.H. Steinberg.** 1997. ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. J. Cell Biol. *139*:497-506.
94. **Scemes, E., R. Dermietzel, and D.C. Spray.** 1998. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. Glia *24*:65-73.
95. **Leybaert, L. and M.J. Sanderson.** 2001. Intercellular calcium signaling and flash photolysis of caged compounds. A sensitive method to evaluate gap junctional coupling. Methods Mol. Biol. *154*:407-430.
96. **Gaspers, L.D. and A.P. Thomas.** 2005. Calcium signaling in liver. Cell Calcium *38*:329-342.
97. **Hassinger, T.D., P.B. Guthrie, P.B. Atkinson, M.V.L. Bennett, and S.B. Kater.** 1996. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *93*:13268-13273.
98. **Haydon, P.G. and G. Carmignoto.** 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol. Rev. *86*:1009-1031.
99. **Scemes, E. and C. Giaumes.** 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. Glia *54*:716-725.
100. **Sanderson, M.J., A.C. Charles, and E.R. Dirksen.** 1990. Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca2+ in epithelial cells. Cell Regul. *1*:585-596.
101. **Leinonen, P., V. Aaltonen, S. Koskela, P. Lehenkari, T. Korkiamäki, and J. Peltonen.** 2007. Impaired gap junction formation and intercellular calcium signaling in urinary bladder cancer cells can be improved by Gö6976. Cell Commun. Adhes. *14*:125-136.
102. **Tordjmann, T., B. Berthon, M. Claret, and L. Combettes.** 1997. Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: dual control by gap junction permeability and agonist. EMBO J. *16*:5398-5407.
103. **Clair, C., C. Chalumeau, T. Tordjmann, J. Poggioli, C. Erneux, G. Dupont, and L. Combettes.** 2001. Investigation of the roles of Ca2+ and InsP3 diffusion in the coordination of Ca2+ signals between connected hepatocytes. J. Cell Sci. *114*:1999-2007.
104. **Leybaert, L., K. Paemeleire, A. Strahonja, and M.J. Sanderson.** 1998. Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells. Glia *24*:398-407.
105. **Stauffer, P.L., H. Zhao, K. Luby-Phelps, R.L. Moss, R.A. Star, and S. Muallem.** 1993. Gap junction communication modulates [Ca2+]i oscillations and enzyme secretion in pancreatic acini. J. Biol. Chem. *268*:19769-19775.
106. **Harris-White, M.E., S.A. Zanotti, S.A. Frautschy, and A.C. Charles.** 1998. Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures. J. Neurophysiol. *79*:1045-1052.
107. **Ying, X., Y. Minamiya, C. Fu, and J. Bhattacharya.** 1996. Ca2+ waves in lung capillary endothelium. Circ. Res. *79*:898-908.
108. **Patel, S., L.D. Robb-Gaspers, K.A. Stellato, M. Shon, and A.P. Thomas.** 1999. Coordination of calcium signalling by endothelial-derived nitric oxide in the intact liver. Nat. Cell Biol. *1*:467-471.
109. **Wilders, R. and H.J. Jongsma.** 1992. Limitations of the dual voltage clamp method in assaying conductance and kinetics of gap junction channels. Biophys. J. *63*:942-953.
110. **Neyton, J. and A. Trautmann.** 1985. Single-channel currents of an intercellular junction. Nature *317*:331-335.
111. **Van Rijen, H.V., R. Wilders, M.B. Rook, and H.J. Jongsma.** 2001. Dual patch clamp. Methods Mol. Biol. *154*:269-292.
112. **Muller, A., M. Lauven, R. Berkels, S. Dhein, H.R. Polder, and W. Klaus.** 1999. Switched single-electrode voltage-clamp amplifiers allow precise measurement of gap junction conductance. Am. J. Physiol. *276*:C980-C987.
113. **Harris, A.L.** 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. Q. Rev. Biophys. *34*:325-472.
114. **Veenstra, R.D.** 2001. Voltage clamp limitations of dual whole-cell gap junction current and voltage recordings. I. Conductance measurements. Biophys. J. *80*:2231-2247.
115. **Veenstra, R.D.** 1996. Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. J. Bioenerg. Biomembr. *28*:327-337.
116. **Dürig, J., C. Rosenthal, K. Halfmeyer, M. Wiemann, J. Novotny, D. Bingmann, U. Dührsen, and K. Schirrmacher.** 2000. Intercellular communication between bone marrow stromal cells and CD34+ haematopoietic progenitor cells is mediated by connexin 43-type gap junctions. Br. J. Haematol. *111*:416-425.
117. **Ahammer, H., T.T. DeVaney, M. Hartbauer, and H.A. Tritthart.** 1999. Cross-talk reduction in confocal images of dual fluorescence labelled cell spheroids. Micron *30*:309-317.
118. **Beblo, D.A., H.Z. Wang, E.C. Beyer, E.M. Westphale, and R.D. Veenstra.** 1995. Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin40. Circ. Res. *77*:813-822.
119. **Rackauskas, M., M.M. Kreuzberg, M. Pranevicius, K. Willecke, V.K. Verselis, and F.F. Bukauskas.** 2007. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. Biophys. J. *92*:1952-1965.
120. **Weber, P.A., H.C. Chang, K.E. Spaeth, J.M. Nitsche, and B.J. Nicholson.** 2004. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin compo-

sition and permeant-pore affinities. Biophys. J. *87*:958-973.
121. **Bukauskas, F.F., K. Jordan, A. Bukauskiene, M.V.L. Bennett, P.D. Lampe, D.W. Laird, and V.K. Verselis.** 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *97*:2556-2561.
122. **Alves, L.A., A.C. de Carvalho, and W. Savino.** 1998. Gap junctions: a novel route for direct cell-cell communication in the immune system? Immunol. Today *19*:269-275.
123. **Koval, M., S.T. Geist, E.M. Westphale, A.E. Kemendy, R. Civitelli, E.C. Beyer, and T.H. Steinberg.** 1995. Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. J. Cell Biol. *130*:987-995.
124. **Goliger, J.A. and D.L. Paul.** 1995. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. Mol. Biol. Cell *6*:1491-1501.
125. **Simon, A.M. and A.R. McWhorter.** 2003. Decreased intercellular dye-transfer and down-regulation of non-ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin37 or connexin40. J. Cell Sci. *116*:2223-2236.
126. **Rouach, N., M. Segal, A. Koulakoff, C. Giaume, and E. Avignone.** 2003. Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. J. Physiol. *553*:729-745.
127. **Imanaga, I., M. Kameyama, and H. Irisawa.** 1987. Cell-to-cell diffusion of fluorescent dyes in paired ventricular cells. Am. J. Physiol. *252*: H223-H232.
128. **Veenstra, R.D., H.-Z. Wang, D.A. Beblo, M.G. Chilton, A.L. Harris, E.C. Beyer, and P.R. Brink.** 1995. Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. Circ. Res. *77*:1156-1165.
129. **Cotrina, M.L., J. Kang, J.H. Lin, E. Bueno, T.W. Hansen, L. He, Y. Liu, and M. Nedergaard.** 1998. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. J. Neurosci. *18*:2520-2537.
130. **Zhang, W., W.T. Couldwell, M.F. Simard, H. Song, J.H.C. Lin, and M. Nedergaard.** 1999. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. Cancer Res. *59*:1994-2003.
131. **Yi, Z.C., H. Wang, G.Y. Zhang, and B. Xia.** 2007. Downregulation of connexin 43 in nasopharyngeal carcinoma cells is related to promoter methylation. Oral Oncol. *43*:898-904.
132. **el-Sabban, M.E. and B.U. Pauli.** 1991. Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. J. Cell Biol. *115*:1375-1382.
133. **Marziano, N.K., S.O. Casalotti, A.E. Portelli, D.L. Becker, and A. Forge.** 2003. Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. Hum. Mol. Genet. *12*:805-812.
134. **Gittens, J.E., A.A. Mhawi, D. Lidington, Y. Ouellette, and G.M. Kidder.** 2003. Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *284*:C880-C887.
135. **Safranyos, R.G., S. Caveney, J.G. Miller, and N.O. Petersen.** 1987. Relative roles of gap junction channels and cytoplasm in cell-to-cell diffusion of fluorescent tracers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *84*:2272-2276.

Received 10 October 2007; accepted 29 January 2008.

Address correspondence to Muriel Barberi-Heyob, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. e-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

To purchase reprints of this article, contact: Reprints@BioTechniques.com

III OBJECTIFS

Notre programme de recherche vise à développer la méthode de *gap*-FRAP pour une utilisation *ex vivo*. Le but étant d'utiliser cette technique non invasive pour suivre la fonctionnalité des jonctions *gap* et *in fine* pouvoir discriminer des tissus avec un degré de communication intercellulaire modifié.

Dans une **première étape,** afin de rationaliser le choix de notre traceur pour la technique de *gap*-FRAP, nous présentons une étude comparée de deux sondes fluorescentes, la calcéine acetoxymethylester (calcéine-AM) et le 5.6 carboxyfluorescéine diacétate (5.6 CFDA), sur des cultures en monocouche par microscopie confocale. Le traceur le plus approprié, la calcéine-AM, pour des expérimentations sur tissus est sélectionné à partir des résultats obtenus.

Afin de développer une méthode adaptée à l'exploitation des données obtenues à partir d'un modèle 3D, nous comparons les résultats obtenus pour des mêmes protocoles de photoblanchiment et de recouvrement appliqués *in vitro*, soit à une culture en monocouche, soit en trois dimensions de type sphéroïde (KB et FaDu). Cette **seconde étape** propose un modèle physique macroscopique, prenant en compte la contribution des cellules périphériques voisines et sous jacentes, déduisant des paramètres significatifs traduisant la fonctionnalité des jonctions *gap*.

La **troisième étape**, correspond à la transposition des conditions préalablement définies de la technique de *gap*-FRAP sur un organe entier, la vessie de rat. Cette partie consiste en l'optimisation des conditions de mesure *in vivo*, puis en l'étude du recouvrement de fluorescence selon le degré de fonctionnalité des jonctions *gap*, sur un modèle de vessie saine et tumorale (AY27). Cette étude nous a permis d'évaluer la capacité de discrimination de la méthode en fonction de la variation de la communication intercellulaire dans un tissu.

IV RESULTATS

IV.1 ETUDE COMPARATIVE DU CFDA ET DE LA CALCEINE-AM EN TANT QUE TRACEUR DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE PAR LA TECHNIQUE DE GAP FRAP

Principalement cité dans la littérature, le **5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA)** est utilisé pour l'étude de la communication intercellulaire malgré un efflux de la sonde souvent décrit comme étant lignée et temps dépendant. Dans le cas de la technique de *gap*-FRAP, la taille, les propriétés physiques chimiques et biophysiques des sondes fluorescentes, définissent la capacité de communication et permettent de quantifier la fonctionnalité des jonctions *gap* même si la sonde n'a pas de rôle métabolique. Néanmoins, pour distinguer sans ambiguïté les cellules montrant des profils cinétiques différents, la sonde doit être appropriée.

Pour suivre la fonctionnalité des jonctions *gap* dans des cultures en monocouche, nous avons sélectionné différentes lignées, caractérisées par un statut différent en Cx43 phosphorylés. Nous avons comparé deux sondes fluorescentes, le 5(6)-CFDA et la **calcéine acetoxymethylester (AM)**. Nous avons quantifié la communication intercellulaire en estimant des paramètres de redistribution de fluorescence tels que le recouvrement de fluorescence, la fraction mobile et les constantes de perméabilité relative.

Nous avons mis en évidence que la fonctionnalité des jonctions communicantes était en relation avec la localisation des Cx43 au niveau des zones de contact entre cellules, correspondant à la présence de jonctions *gap*. Pour contrôler l'implication des jonctions communicantes dans le recouvrement de fluorescence, nous avons inhibé la fonctionnalité des jonctions communicantes. La communication intercellulaire a été significativement réduite à plus de 85% dans les cellules ayant des jonctions *gap* fonctionnelles. Ensuite, nous avons démontré que le choix de la sonde fluorescente n'influençait pas significativement les pourcentages de recouvrement de fluorescence malgré une libération extracellulaire du CFDA lignée-dépendante. Les profils des cinétiques de recouvrement de fluorescence étaient, quant à eux significativement modifiés selon le traceur utilisé.

Cette étude a renforcé l'intérêt de l'approche *gap*-FRAP pour quantifier les modifications de la fonctionnalité des jonctions *gap* et, a présenté les limites du CFDA pour une utilisation ultérieure sur des modèles tissulaires.

Cette étude a été publiée dans *Biotechnology Journal* et, est présentée dans les pages suivantes sous forme d'article

Biotechnology Journal

DOI 10.1002/biot.200600092

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

Technical Report

Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: A comparative study

Muriel Abbaci[1, 2, 3], Muriel Barberi-Heyob[2, 3], Jean-René Stines[1, 2, 3], Walter Blondel[1, 2], Dominique Dumas[1, 4], François Guillemin[1, 2, 3] and Jacques Didelon[3]

[1]Faculté de Médecine, Nancy University, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[2]Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN-UMR 7039), Nancy University, CNRS-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[3]CRAN-UMR 7039, Nancy University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[4]LEMTA-UMR 7563, Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire-Service Imagerie Cellulaire, Nancy University, CNRS-INPL, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

Gap junctions play an important role in vital functions, including the regulation of cell growth and cell differentiation. Connexins 43 (Cx43) are the most widely expressed gap junction proteins. Cellular localization of phosphorylated Cx43 has been implicated in the capacity of gap junctional intercellular communication (GJIC). To follow the functionality of GJIC of different cell types, in monolayer cultures, characterized by different patterns of phosphorylated Cx43, we used a fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique, and compared two tracers, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and calcein acetoxymethylester (AM). The GJIC capacity was quantified by estimating fluorescence redistribution parameters. The functionality of GJIC was in relation with the staining localization of phosphorylated Cx43 to the cell–cell contact areas, corresponding to gap junctions between contacting cells. GJIC involvement in fluorescence restitution after photobleaching was checked by a gap junction channel inhibition assay. We demonstrated that the choice of the dye did not significantly influence the fluorescence recovery percentages despite a cell line-dependent CFDA release, whereas it had an important impact on fluorescence kinetic profiles. This study reinforces the interest of the gap-FRAP approach to quantify modifications in the functionality of gap junctions and, above all, argues about the limits of CFDA for 3-D future approaches.

Received 26 June 2006
Revised 4 October 2006
Accepted 6 October 2006

Keywords: Cancer cell types · Confocal microscopy · Connexin 43 · Gap-FRAP

1 Introduction

Most cells in multicellular organisms perform gap junctional intercellular communication (GJIC). This is the only form of direct contact between the cytoplasm of adjacent cells. The juxtaposition of two half-channels, called connexons, constitutes this junction. Each connexon is inserted into the cytoplasmic membrane of two neighboring cells. It is made up of six protein subunits called connexins (Cx) that can be homomeric or heteromeric [1]. The Cx family is composed of 21 types of proteins classified according to their molecular weight. One cell type can express more than one Cx isoform [1]. For example, Cx32 is found in the salivary gland [2], Cx26 in cochlea [3] and larynx [4], and Cx43 is the most extensively expressed subunit in human tissues, *e.g.*, larynx [5, 6].

Correspondence: Dr. Muriel Barberi-Heyob, Nancy Université, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Brabois, Avenue de Bourgogne, 54311 Vandœuvre les Nancy, France
E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr
Fax: +33-3-83-59-83-78

Abbreviations: AM, acetoxymethylester; **CFDA,** 5(6)-carboxyfluorescein diacetate; **Cx,** connexins; **FCS,** fetal calf serum; **FRAP,** fluorescence recovery after photobleaching; **GA,** glycyrrhetinic acid; **GJIC,** gap junctional intercellular communication; **HUVEC,** human umbilical vein endothelial cells; **MTT,** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61 www.biotechnology-journal.com

Phosphorylation of Cx43 may be coupled to the assembly of gap junction plaques, the generation of functional channels [7], the regulation of channel pore size, and open-state probability [8]. Phosphorylation is thought to occur when nonphosphorylated Cx43 arrives at the cell membrane [9]. Thus, changes in phosphorylation patterns of Cx43 have been correlated with alterations in GJIC [10]. It is assumed that GJIC is of great importance in the regulation of development, differentiation, and growth. Actually, several physiological roles characterize them, including electrical coupling [11], response of tissues to hormones [12], regulation of embryonic development [13], homeostasis [11], and regulation of cellular proliferation [14]. A link between an impairment of intercellular communication and the process of carcinogenesis also seems to exist. Anomalies of communication have been observed in numerous cancers *in situ*, showing the implication of Cx in the process of cancerogenesis [15]. The large amount of *in vitro* and *in vivo* data which have been accumulated shows that GJIC is frequently altered in cancer cells irrespective of their tissue and species origins. Hormones such as estrogens and progesterones have been shown to regulate the expression of the Cx43 gene [16], and the expression of Cx43 gap junctions in breast cancer decreased with the stage of progression [17]. Previous studies indicated that the restoration of Cx43 can reverse the transformed phenotype [18], suggesting that a quantitative strategy to assess the GJIC functionality between different cell types may be of biological value.

GJIC can have different meanings depending on the technical approach used to estimate its functionality, *e.g.*, electrical coupling or dye-transfer assay. In the case of gap-fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique, the size as well as the chemical and biophysical properties of the tracers define the communication capacity and allow us to quantify this functionality even if the tracers have no metabolic role. Nevertheless, in order to distinguish with no doubt cells showing different kinetic profiles of fluorescence recovery after photobleaching, the dye used must be highly relevant. Because of the absence of any comparative study, it was assumed that the choice of the dye did not influence fluorescence redistribution parameters. The present study reinforces the interest of the gap-FRAP approach to quantify modifications in the functionality of GJIC *in vitro* (in monolayer cultured cells) by comparing, for the first time, the results obtained using two tracers. Calcein acetoxymethylester (AM) and 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) were chosen due to their differences, *i.e.*, molecular weight, pK_a, and the nature of the fluorochrome produced [19–21]. We compared fluorescence recovery parameters after photobleaching in three cell types (human skin fibroblasts and two human head and neck carcinoma cell lines, FaDu and KB cells) characterized by different patterns of phosphorylated Cx43, leading to different GJIC capacities.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Cell culture materials and fetal calf serum (FCS) were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Other culture media and additives were obtained from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). CFDA was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and calcein AM from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). The mouse monoclonal antiCx43 antibodies were obtained from BD transduction laboratories (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). AntiCx32 mouse mAb (reference 13-8200), antiCx43, and antiCx26 rabbit polyclonal antibodies (71-0700, 71-0500) were provided from Zymed Laboratories Inc. (Clinisciences, Montrouge, France). FITC-conjugated goat antirabbit immunoglobulin (Ig) serum was purchased from BD Biosciences. Antimouse and antirabbit IgG linked to horseradish peroxidase were provided by Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). All other chemicals were purchased from Sigma and were of molecular biology grade.

2.2 Cell lines and culture

The human head and neck carcinoma cell lines (FaDu and KB) were obtained from Professor A. Hanauske as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. CCD-1137Sk cells (human skin fibroblasts) were provided from ATCC (CRL 2703). These three cell lines were grown in RPMI 1640 complemented with 9% of FCS, 1% of L-glutamine, and 1% of penicilline/streptomycine in a 37°C, 5% CO_2 atmosphere. The human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) pooled from several donors, used as positive controls of Cx43 expression, were from Cambrex (Verviers, Belgium). HUVEC were routinely grown in endothelial growth medium (EGM-2), containing 2% FCS, growth factors, and supplements, and maintained according to the manufacturer's instructions. Cancer cells and HUVEC were grown in 75 cm^2 plastic tissue culture flasks and fibroblasts in 175 cm^2 flasks.

2.3 Expression of Cx43, Cx32, and Cx26 by Western blot

Protein separation by SDS-PAGE gel, and subsequent Western blot analysis were performed to assess the expression of Cx43, Cx26, and Cx32 proteins. FaDu, KB, HUVEC, and fibroblast monolayer cells were collected by scraping, washed with ice-cold PBS and put at –80°C for 30 min. Cells were then treated with lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 1% 3-[(3-cholamido-propyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and further centrifuged at 15 000 × *g* for 20 min. Total protein concentration was de-

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnology Journal

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

termined using DC protein assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Protein samples (7.5 µg) were heated to 95°C for 7 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, chilled on ice, and subjected to SDS-PAGE analysis, followed by electrophoretic transfer to PVDF membranes. Membranes were blocked with 1% Western blocking reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France) in TBS for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with an antiCx43 rabbit mAb (1:1000) that reacts with both phosphorylated and nonphosphorylated forms, an antiCx26 rabbit polyclonal antibody (1:500) or antiCx32 mouse mAb (1:500) in 0.5% Western blocking reagent in TBS. After several washes, the blots were incubated for 1 h at room temperature with a secondary antirabbit antibody IgG or an antimouse antibody IgG linked to horseradish peroxidase (1:2000) in 5% w/v nonfat dry milk in TBS containing Tween 20 (0.05%). Bound antibody was detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Orsay, France) and visualized by autoradiography. Membranes were stained with CBB R-250 (BioRad) to check equal loading in each lane.

2.4 Localization of Cx43 by immunocytochemistry

We performed immunocytochemical analysis in order to determine and compare the intracellular localization of phosphorylated Cx43. Cells were plated on eight-well glass chamber slides (Nunc, Dominique Dutscher, France) at 3×10^4 cells/mL. After fixation in 5% paraformaldehyde, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (15 min, at room temperature for both steps). Cells were blocked for 30 min in PBS containing 1% BSA and then incubated with (1:50) dilution of antiCx43 mouse mAb for 45 min, specific for the nonphosphorylated form, followed by Cy5-conjugated goat antimouse Ig serum exposure or with antiCx43 rabbit polyclonal antibody (1:50), overnight at 4°C, followed by incubation with FITC-conjugated goat antirabbit IgG. In control slides, BSA replaced the primary antibody. Cells were visualized with a Leica confocal microscope (SP2-AOBS Leica, TCS SP2-AOBS, Germany). Images were obtained in XYZ planes, with axial and lateral resolutions equal to 285.8 and 159.5 nm, respectively. The global immunofluorescent signal was analyzed and quantified using Matlab® software from MathWorks Inc. (Sèvres, France).

2.5 Estimation of CFDA and calcein AM usable concentrations and loadingtimes

The loading times varied with the cell type, depending on its surface/volume ratio and the amount of intracellular esterases. Since excessive loading may result in incomplete hydrolysis, compartmentalization in organelles, cytotoxicity and phototoxicity, CFDA, and calcein AM concentrations and loading times need to be adapted for each cell line.

The stock solutions of CFDA and calcein AM were prepared in dry DMSO at 6 and 2 mg/mL, respectively. These solutions were protected from light. CFDA stock solution was diluted to 1:1000 v/v with RPMI medium to obtain a final concentration of 6 µg/mL and to 1:4000 v/v for calcein AM for a final concentration of 0.5 µg/mL. The diluted solutions were used immediately. At 37°C, different loading times with CFDA or with calcein AM were investigated. CFDA and calcein AM cytotoxicity were measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay. Briefly, cells were seeded at an initial density of 5×10^4 cells/mL in 96-well microtitration plates. Forty-eight hours after plating, cells were exposed for 1 h to CFDA or calcein AM at concentrations varying from 4.0 to 32.5 µM or 0.5 to 10.0 µM, respectively. After a 24-h incubation at 37°C, the medium was removed, cells were washed three times with cold PBS, and fresh RPMI was added. Each concentration was tested in sextuplicate. As described previously [22], cell survival was measured 24 h later by MTT test; 50 µL of 0.5% MTT solution was added in each well and incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolism. The formed formazan crystals were dissolved by adding 50 µL of 25% sodium dodecylsulfate solution *per* well and vigorous pipetting was performed. Absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan MCC/340 plate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Results were expressed as relative absorbance to untreated controls.

2.6 Gap-FRAP

GJIC was quantitatively assessed in living cells by gap-FRAP assay as previously described [23]. Cell lines were plated on eight-well glass chamber slides at 3×10^4 cells/mL, 72 h before performing FRAP experiments. The cells were then loaded at 37°C with CFDA (13 µM, 15 min) or with calcein AM (0.5 µM, 30 min). The dyes were retained inside the cells due to their hydrolysis by cytoplasmic esterases into carboxyfluorescein (CF) or calcein, respectively. Due to their low molecular weights (376 and 622 Da, respectively), these have been shown to permeate gap junction channels [24, 25]. After the loading process, the cell culture slides were washed several times with RPMI medium to remove the fluorochrome-ester and prevent further dye loading during subsequent measurements.

FRAP was achieved using a confocal laser scanning microscope, constituted by a reversed microscope equipped with an argon laser source at 488 nm. The intensity of the fluorescence signal was measured between 500 and 560 nm (emission band-pass filter) with a 63X objective (oil/1.32 NA). The laser output power was adjusted to 13 µW for a prebleaching period of 150 s, then to 65 µW for 45 s to achieve sufficient photobleaching for fluorescence recovery observations, without causing visible damage. Fluorescence recovery analysis was performed for 900 s with a measure every 15 s, with the laser output

 © 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61 www.biotechnology-journal.com

power being adjusted to 13 µW, as controlled using a power meter (Newport models 2835-C).

2.7 Gap-FRAP analysis

The processing of the fluorescence recovery kinetics was divided into several steps. First, a value was assigned to the intensity of fluorescence measured in the target cell before photobleaching and served as the reference value to express the recovery of fluorescence. Then, for each time point, the fluorescence intensity value measured on the photobleached target cell was divided by the intensity value of the reference cell. For each experiment, a reference cell was chosen at the edge of the microscopic field to account for the photodegradation caused by the successive acquisitions and the leakage of the fluorescent dye. Since the reference cell was unaffected by the laser bleach, this ratio allowed us to correct for artifactual changes in fluorescence intensity due primarily to photobleaching caused by exposure of the whole field to the excitation light source [26]. These ratios were plotted *versus* time to display fluorescence recovery curves. These curves were then fitted using a single exponential function. The exponential fluorescence recovery for the bleached cells was analyzed by the following perturbation–relaxation equation [27]:

$$F(t) = F_0 + (F_\infty - F_0)(1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

where t is the time (s) after photobleaching; $F(t)$ is the normalized fluorescence intensity (AU); F_∞ is the asymptotic value to which the fluorescence intensity tends (AU); F_0 is the theoretical fluorescence intensity estimated immediately (t = 0 s) after photobleaching. F_0 is close to the experimental value (AU), according to the good fitting quality (R^2>0.98); τ is a time constant (s). A typical example of such a curve is given in Fig. 1.

The transfer constant $k = 1/\tau$ was also calculated, and then corrected by dividing by the number of cells connected to the target cell.

Knowing the initial fluorescence intensity before photobleaching F_i, the mobile fraction (R) can be calculated [28] according to the equation:

$$R = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0} \times 100 \quad (2)$$

Likewise, the percentages of recovery at 15 min [25] and at t_∞ [29] are as follows:

$$\%_{15} = \frac{(F_{15} - F_0)}{F_i} \times 100 \quad (3)$$

$$\%_\infty = \frac{(F_\infty - F_0)}{F_i} \times 100 \quad (4)$$

2.8 Gap junction channel inhibition assay

Several reagents, particularly derivatives of the saponin glycyrrhetinic acid (GA) appear to modulate GJIC by altering the basal pattern of Cx phosphorylation [30]. To validate the involvement of gap junctions in the phenomenon of fluorescence recovery observed, we inhibited their functionality. We tested the effect of 18 α-GA, which has been shown to inhibit gap junctions coupling in many cell types [31, 32]. 18 α-GA was added to the culture medium at 100 µM [31] after CFDA or calcein AM exposure. Gap-FRAP measurements were initiated 20 min after the treatment with 18 α-GA. Measurements were done without washing the medium. Control was performed on cells marked with fluorescent dyes, without the addition of inhibitor.

2.9 Statistical analysis

Mann and Whitney U-test was used to check for the significant level between independent variables. The level of significance was set to p<0.05.

3 Results

3.1 Cx expression

First, we assessed, by Western blot analysis the expression of Cx26, Cx32, and Cx43 proteins in FaDu, KB, and fibroblasts and in HUVEC used as positive control for Cx43 expression [33] (Fig. 1G). We observed no expression of Cx26 and Cx32 (molecular weight of about 27–30 kDa as previously described by Nagy *et al.* [34]) (data not shown). Western blot of whole-cell extracts revealed the presence of three immunoreactive isoforms of Cx43. These isoforms slightly differed in molecular weight and migrated as one smaller, nonphosphorylated isoform (P0) and two larger, phosphorylated isoforms (P1–P2) (Fig. 1G). Cx43 expression levels varied between cell lines with a high expression for fibroblasts and HUVEC compared to KB and FaDu cells. Changes in phosphorylation patterns of Cx43 have often been correlated with alterations in GJIC. To precise the intracellular localization of the Cx43 phosphorylated forms, Cx43 expression patterns were detected by immunocytochemistry. Representative immunofluorescent staining images are given in Fig. 1. Using a polyclonal antibody identifying both nonphosphorylated and phosphorylated forms, pictures showed fluorescent green spots at the cell–cell borders in fibroblasts (Figs. 1A and B) and KB cells (Figs. 1C and D), contrary to FaDu cells that displayed spots only around the nucleus (Figs. 1E and F). Using Matlab software, fluorescent-staining analysis of the cell distribution for the phosphorylated Cx43 form was related to a membrane localization for KB (76%) compared to a cytoplasmic localization for FaDu (*vs.* 3%). Due to their

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnology Journal

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

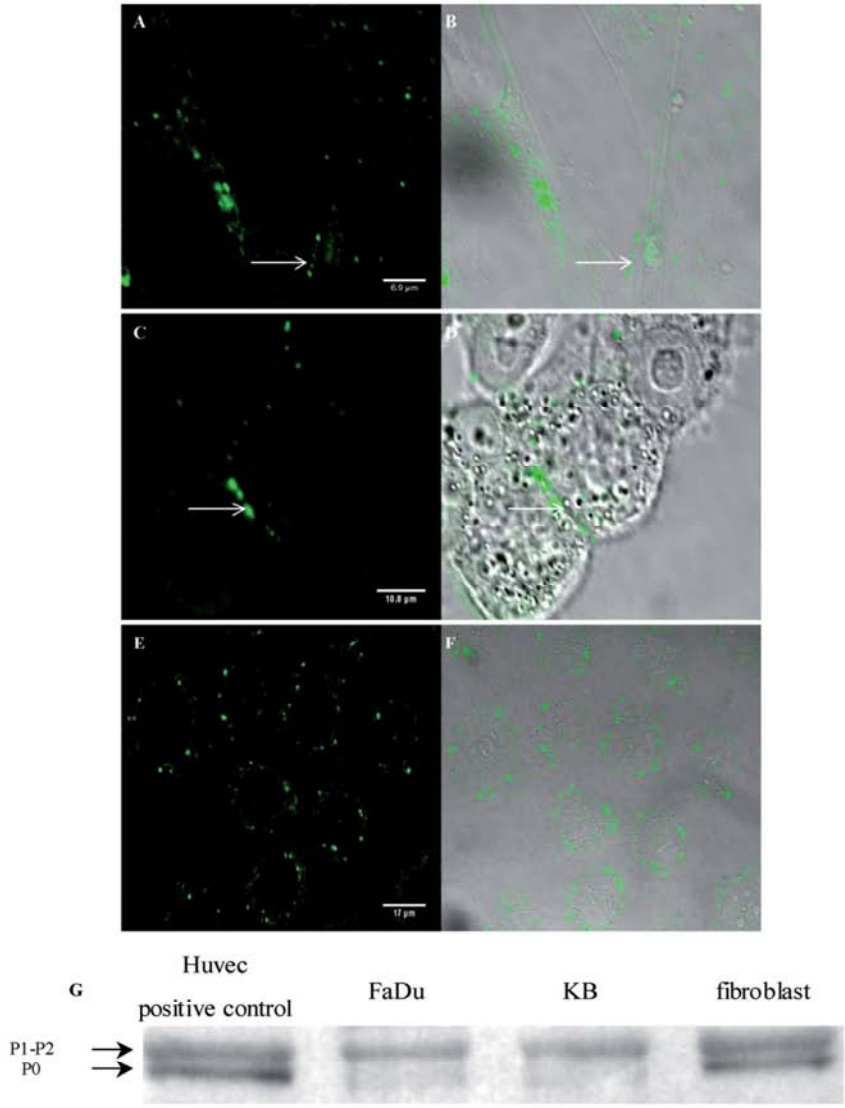

Figure 1. Cell distribution of Cx43 proteins by immunocytochemistry in fibroblasts (A, B), KB (C, D), and FaDu cells (E, F). Immunofluorescent staining conditions are described in Section 2. Light transmitted (right column) and the corresponding fluorescence image (left column). Fluorescent green spots were observed at the cell–cell borders in fibroblast and KB cells indicated by white arrows (A, C), contrary to FaDu cells displaying fluorescent spots only around nucleus (E, F). Western blot analysis of Cx43 expression (G). Nonphosphorylated (P0) and phosphorylated isoforms (P1–P2) were expressed in fibroblasts and HUVEC used as positive control.

morphology, this approach was not feasible with fibroblasts. Taking into account these different patterns of phosphorylated Cx43 distribution (to the cell–cell contact for fibroblasts and KB and in the cytoplasm for FaDu), we assessed the functionality of GJIC.

3.2 Functionality of GJIC: FRAP results

Experiments yielding surviving cell fractions higher than 85% demonstrated that incubation of fibroblasts, KB, and FaDu cells with CFDA concentrations up to 32.5 µM induced no cytotoxicity for 24 h (data not shown). In contrast, calcein AM was cytotoxic at concentrations higher than 1.0 µM. Therefore, nontoxic concentrations were used for further studies. Incubation of the three cell lines with CFDA (13 µM; 15 min) or calcein AM (0.5 µM; 30 min) led to the appropriate amount of each ester within cells (Figs. 2 and 3). Once inside the cells, the tracer is hydrolyzed and the hydrophilic fluorescent derivative formed is described as being retained by the cells. Gap-FRAP experiments were then carried out. A labeled target cell was photobleached by the scanning argon laser beam. Fluorescence recovery was due to dye transport across gap junctions. Fluorescence intensity according to time was represented for a characteristic recording of the intercellular communication for each cell type (Figs. 2 and 3). Unbleached dye molecules were redistributed to the target cell from contacting cells junctions, in fibroblasts

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61 www.biotechnology-journal.com

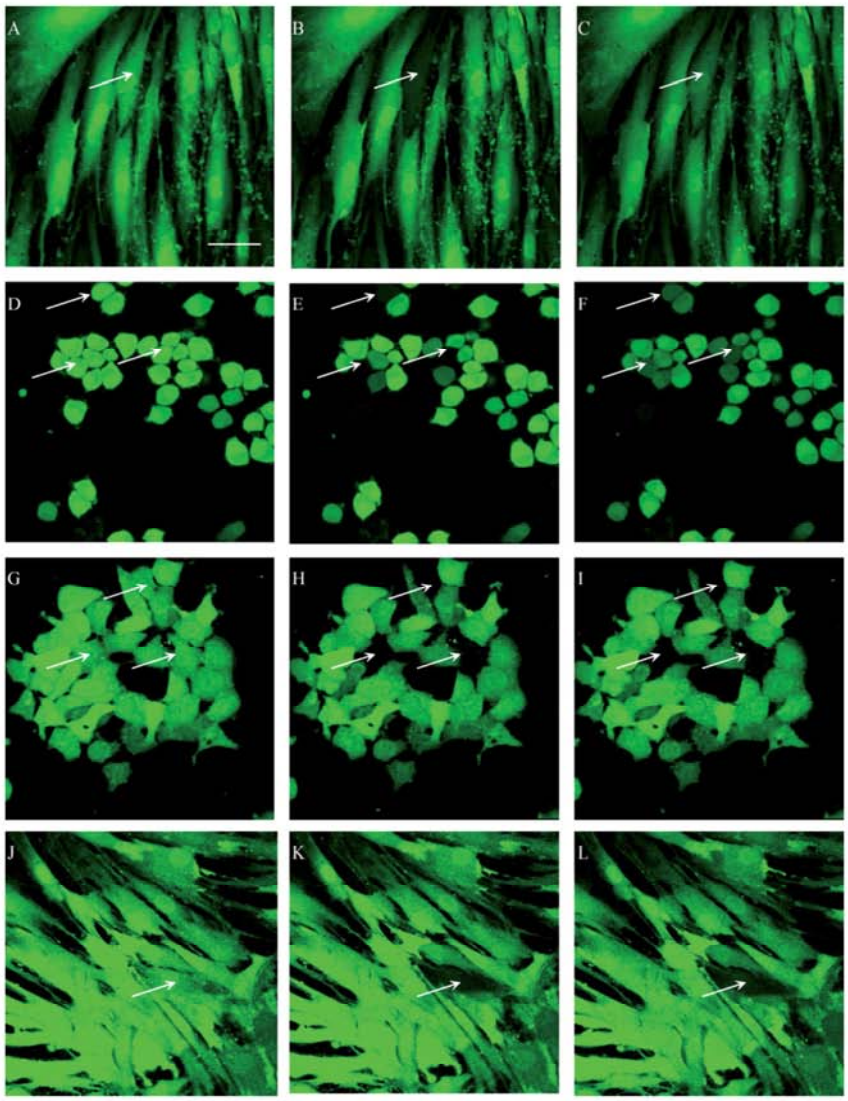

Figure 2. Representative images of fluorescence restoration in fibroblasts (A–C), KB (D–F), FaDu (G–I), and fibroblasts treated with a gap junction inhibitor (J–L). Each column introduces the three specific steps: left column shows recordings before photobleaching after CFDA exposure; the middle column, acquisitions just after the photobleaching time; and the right part, fluorescence recoveries after 900 s. The bleached CF molecules from one targeted cell are indicated by a white arrow. FRAP was achieved using a confocal laser scanning microscope, constituted by a reversed microscope equipped with an argon laser source at 488 nm. The laser output power was adjusted to 65 μW for 45 s. Scale bars: 40 μm.

(Figs. 2C and 3C) and in KB cells (Figs. 2F and 3F). In contrast, only a weak probe recovery could be observed in the target cell, in the case of the FaDu cell line (Figs. 2I and 3I). Curves representing fluorescence within the target cell as a function of time were normalized, in order to account for any heterogeneous dye loading, and to compare measurements performed in the different cell types. Figure 4 shows typical kinetics of fluorescence recovery obtained for each cell line with their corresponding fittings. FaDu cells are characterized by a weak and slow fluorescence recovery compared to the two other cell types (Fig. 4). Fibroblasts and KB cells showed fluorescence recovery and mobile fraction values that were comparable but definitely higher than for FaDu cells, whatever the tracer (CFDA or calcein AM) used (Table 1). In accordance with the visualized gap junction plaques, fibroblasts and KB cells were therefore validated as positive GJIC cells. Despite a cell line-dependent CFDA release, the choice of the tracer did not significantly influence the fluorescence recovery percentages. Nevertheless, the fluorescence kinetic profiles after photobleaching were quite different depending on the tracer used (Fig. 4). Actually, to compare transfer constants for each cell type, k values were normalized by the number of cells. For the same cell line, normalized k values measured with calcein AM were significantly two-fold higher than those obtained with CFDA ($p<0.05$, Table 1).

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnology Journal

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

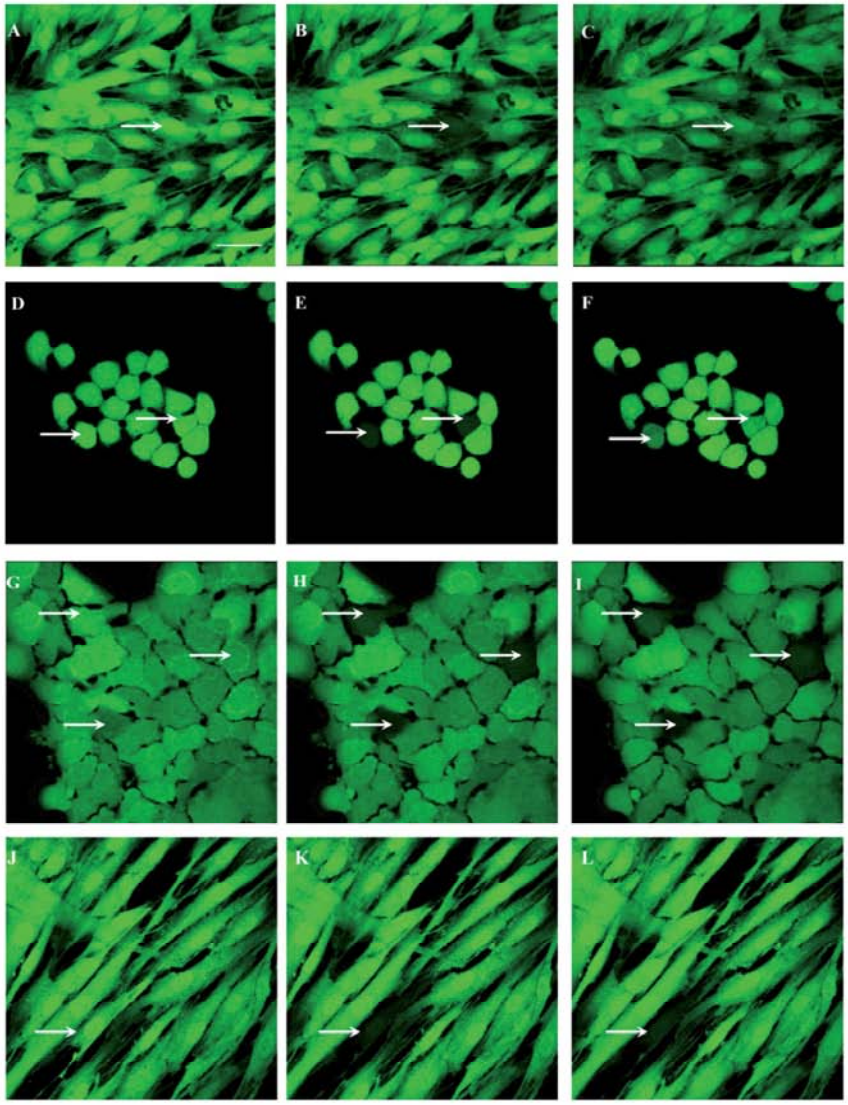

Figure 3. Representative images of fluorescence restoration in fibroblasts (A–C), KB (D–F), FaDu (G–I), and fibroblasts treated with the gap junction inhibitor (J–L). Each column introduces the three specific steps: left column shows recordings before photobleaching after calcein AM exposure; the middle column, acquisitions just after the photobleaching time; and the right part, fluorescence recoveries. The bleached calcein molecules from one targeted cell are indicated by a white arrow. FRAP experiments as described for Fig. 2. Scale bars: 40 µm.

Table 1. GJIC activity of FaDu, KB, and fibroblast cell types loaded with CFDA (A) and calcein AM (B). Fluorescence intensity values were normalized (see *materials and methods*). Normalized *k* values correspond to the rate of molecules exchanged *per* minute between two connected cells.

(A)	Cell type	$\%_{15}$	$\%_{\infty}$	*R*	*k* (min^{-1})	*k* Normalized (min^{-1})
	Fibroblast ($n = 9$)[a]	34 ± 11[b]	51 ± 17	69 ± 18	0.075 ± 0.034	0.023 ± 0.011
	KB ($n = 8$)	31 ± 20	48 ± 10	70 ± 16	0.068 ± 0.038	0.017 ± 0.011
	FaDu ($n = 12$)	5 ± 4	7 ± 5	11 ± 3	[c]	[c]
(B)	**Cell type**	$\%_{15}$	$\%_{\infty}$	*R*	*k* (min^{-1})	*k* Normalized (min^{-1})
	Fibroblast ($n = 7$)	48 ± 16	50 ± 18	83 ± 22	0.22 ± 0.12	0.047 ± 0.02
	KB ($n = 6$)	45 ± 19	48 ± 19	74 ± 11	0.20 ± 0.08	0.036 ± 0.02
	FaDu ($n = 8$)	3 ± 4	3 ± 5	5 ± 10	[c]	[c]

a) Number of experiments.
b) SD.
c) Not determinable.

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61 www.biotechnology-journal.com

3.3 18 α-glycyrrhetinic acid (18 α-ga) inhibits GJIC

In order to validate the functionality of Cx and their involvement in the restitution of fluorescence after photobleaching, we used a gap junction channel inhibition assay with 18 α-GA (Figs. 2 and 3J–L). GA derivatives inhibit GJIC in a variety of cell types, offering the possibility to manipulate cell-to-cell communication. Whatever the dye tested, a significant inhibition of GJIC by more than 85% was measured for the positive cells (fibroblasts and KB cells), but no statistically significant decrease for FaDu cells could be seen (Figs. 5A and B).

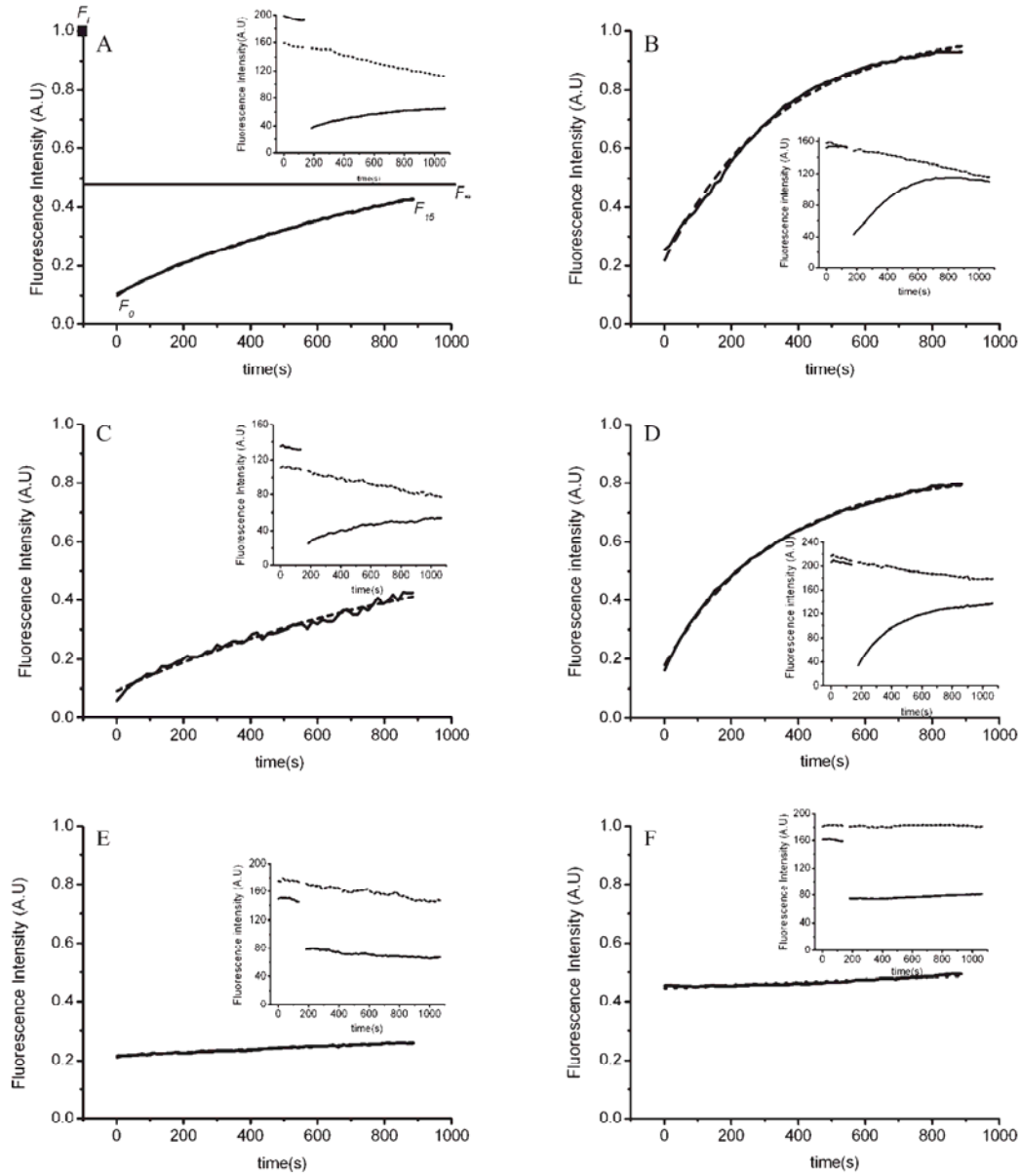

Figure 4. Kinetic profiles of raw and corrected fluorescence data. Typical fluorescence recovery curves with CFDA (left column) and calcein AM (right column) for fibroblasts (A, B), KB (C, D), and FaDu (E, F). Fluorescence recovery quantified with the following parameters (A): F_i, initial fluorescence intensity value measured before photobleaching; F_∞, asymptotic value to which the fluorescence intensity tends; F_0, theoretical fluorescence intensity estimated at $t = 0$ s after photobleaching, and F_{15}, fluorescence intensity value measured at the end of the experiment ($t = 15$ min). Inset graphs illustrate fluorescence recovery kinetics of nontreated data obtained from targeted cells (unbroken line) and control cells (dotted line).

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnology Journal

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

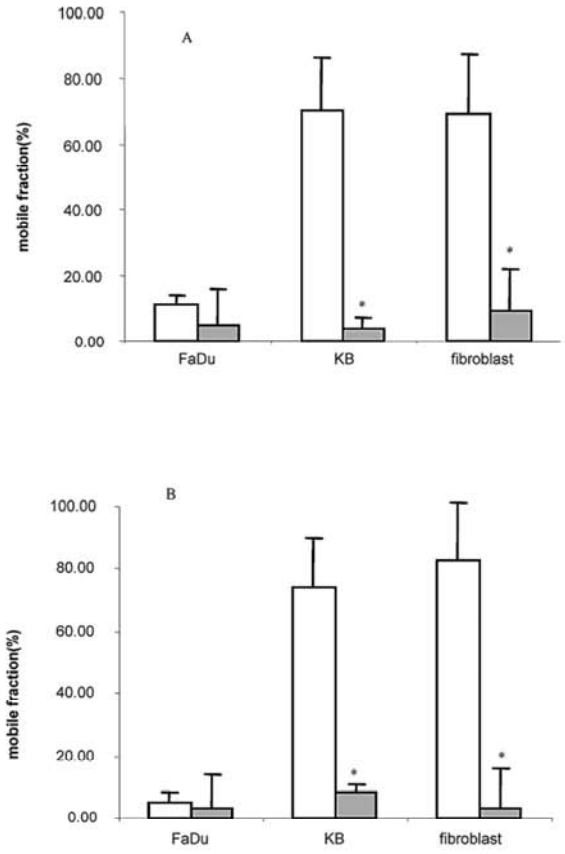

Figure 5. Mobile fraction values with or without GJIC inhibitor (18 α-GA) with CFDA (A) or calcein AM (B). GJIC functionality was performed 20 min after treatment with the inhibitor. The results represent the mean ± SD of at least six separate experiments. Statistically significant difference from the control without inhibitor is indicated as $*p<0.05$.

4 Discussion

This study illustrates the interest of the gap-FRAP technique to quantify modifications in the capacity of GJIC related to Cx43 intracellular localization. Western blot analysis and immunocytochemistry staining have been widely described to assess Cx43 expression [35, 36]. With these two complementary approaches, we argued that the staining localization of Cx43 to the cell–cell contact surfaces was essential to discriminate cells. Fluorescent green spots were observed at the cell–cell borders in fibroblasts and KB cells, but only around the nucleus in FaDu cells. A perinuclear population of phosphorylated Cx43 has been previously described [37]. Cx43 phosphorylated forms are usually concentrated in gap junctional plaques [7], and GJIC functionality is related to the expression of phosphorylated Cx43 expression and their localization in the cell–cell contact areas, corresponding to gap junctions between contacting cells [38]. Nonphosphorylated Cx43 expression is often associated with the cytoplasmic pool of available Cx43 proteins that would normally be trafficked to the membrane [39]. Phosphorylation of Cx43 may be coupled to the assembly of gap junction plaques and to the formation of functional channels. But phosphorylation of some amino acids of Cx43 could also modulate GJIC in a negative manner. Several growth factors and cytokines alter the phosphorylation status of Cx43. Two serine/threonine protein kinase families, protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), have been connected to the phosphorylation of Cx43, occurring together with decreased GJIC [40]. Phosphorylation of Cx43 could also be the consequence of the action of some carcinogenic agents such as esters of phorbol [41].

To follow the functionality of GJIC, we performed gap-FRAP technique which showed some advantages such as being noninvasive and easier and faster than other approaches like dye transfer or scrape loading [23]. The gap-FRAP approach allowed us to quantify and compare GJIC capacity between our characterized cell types. An exponential fitting allowed to calculate the theoretical fluorescence intensity value within the target cell at $t = 0$ s, immediately after the photobleaching period, a few seconds before experimental measurements by the confocal system could be made. Although a single exponential function is probably an oversimplification of the diffusion events that underlie fluorescence recovery, it can give a close fit of most data of this type [42]. In our case, the residuals of the monoexponential fittings were random, thus confirming the validity of the model. The choice to compare the mobile fraction values rather than exclusively the percentages of recovery allows to normalize the fluorescence recovery ratios using the photobleaching rate. Actually, an identical photobleaching protocol can lead to different photobleaching percentages depending on the cell type, resulting from either variability in optimal esterase activity or leakage of the fluorescent dye by active transport [20]. Photodegradation variability can also be increased by shorter loading times of the tracer. Fluorescence intensity measured just after photobleaching was taken into account in the mobile fraction determination. At equilibrium, fluorescence intensity was not equal to unity as the dye could partly be sequestrated into compartments of adjacent cells and cannot, therefore, diffuse toward the targeted cell [43].

Most studies that have been performed, either to distinguish or to evaluate GJIC in cells and tissue slices, have used the fluorescence recovery percentage as the discriminating parameter. It has been generally obtained from a first postbleaching value to a specified experimental time or to a plateau value [25, 29, 44–46]. However, to distinguish without any doubt, cells showing different kinetic profiles, the transfer constant (k) or the constant time (τ), obtained from the fitting, need to be assessed

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61 www.biotechnology-journal.com

Table 2. Features of CFDA in comparison with calcein AM for gap FRAP assays

	Advantages	Disadvantages
CFDA[a)]	Low cost	
	Widely used in gap FRAP assays [48]	High spontaneous release [59]
	Moderated fluorescence [58]	Sensitivity to physiological pH range [52, 60]
	Short time loading	
	High relative transfer constant	High cost
Calcein AM[b)]	Highly fluorescent [58]	Long time loading
	Well retained in cells [61]	Potential photosensitizer for photodynamic therapy [63, 64]
	Low pH sensitivity [62]	Dark cytotoxicity cell line-dependent [65]

a) 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate.
b) Calcein acetoxymethylester.

(Table 1). For example, in glioma cell lines, the extent of recovery and τ could evolve differently and complementarily [26]. Determination of the transfer constant k allows us to compare the speed of the cell–cell exchange [47, 48]. However, as indicated by the corrected k values (Table 1), a comparative analysis using transfer constant data requires either normalization or a similar number of connected cells to the bleached target cell [49].

To check the involvement of gap junctions in the fluorescence restitution after photobleaching, we used a gap junction channel inhibition assay. Derivatives of the aglycone saponin, isolated from the roots of the licorice glycyrrhiza radix, have been reported to exert nontoxic, reversible inhibition of gap junction communication [32]. Goldberg *et al.* [50] and Guan *et al.* [51] suggested that 18 α-GA and 18 β-GA could alter intercellular communication as a consequence of altered connexon configuration. GJIC capacity was significantly abolished in positive cells exposed to 18 α-GA without a statistically significant decrease for FaDu cells whatever the tracer (CFDA or calcein AM) used.

We discovered that the choice of the dye influenced the fluorescence kinetic profiles. Calcein AM and CFDA were selected because they offered interesting physical and chemical properties (Table 2). Several esterase substrates have been commonly employed in gap-FRAP assays, but these two dyes prevail by their characteristics. They derive from the structural modifications of fluorescein and, as such, exhibit fluorescence properties after esterases cleavage. Nevertheless, calcein AM is better retained by cells, less sensitive to pH, and more sensitive to photobleaching than CFDA [49]. In relation with its higher hydrophobicity and its lower molecular weight (460.4 Da *vs.* 994.9 Da for calcein AM), CFDA required shorter loading times compared to calcein AM (15 *vs.* 30 min). Calcein AM ($pK_a = 5.0$) is less sensitive to pH in the physiological pH range compared to CFDA ($pK_a = 6.4$). Besides, calcein is better retained in cells than CF due to its six negative charges (*vs.* two positive charges) at pH 7. A lower leakage could explain the higher relative transfer constant measured with calcein AM. Calcein AM and CFDA have been widely used *in vivo* for pH measurements [52], pharmacokinetic studies [53], lymphocyte migrations [54], and angiography [55]. For gap-FRAP analyses only calcein AM seems appropriate to allow a discrimination between cells in short-time experiments and to assess relative transfer constants in the case of a target surface and not only a target cell. Very few studies have been reported in the literature concerning GJIC studies performed by gap-FRAP technique using confocal microscopy for a 3-D analysis in tissue organotypic slices [29], and medial collateral ligament and cartilage [25, 46]. Development of a sophisticated device to apply gap-FRAP on biopsies or *in situ* could be partly limited by the choice of the tracer. CFDA, due to its high spontaneous release, would not draw a clear frontier between the loaded cells and the extracellular environment. Gap-FRAP assay is certainly more simple, faster, and less invasive than other techniques like microinjection [56] or scrape loading for application on tissue [57].

This study confirms the interest of the gap-FRAP approach to quantify modifications in the capacity of gap junctions and argues about the limits of CFDA for 3-D future approaches, that are currently in progress.

5 References

[1] Bruzzone, R., White, T. W., Goodenough, D. A., The cellular Internet: On-line with connexins. *Bioessays* 1996, *18*, 709–718.
[2] Kuraoka, A., Yamanaka, I., Miyahara, A., Shibata, Y., Uemura, T., Immunocytochemical studies of major gap junction proteins in rat salivary glands. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1994, *251*, S95–S99.
[3] Zhao, H. B., Connexin26 is responsible for anionic molecule permeability in the cochlea for intercellular signalling and metabolic communications. *Eur. J. Neurosci.* 2005, *21*, 1859–1868.
[4] Schneider, B., Teschner, M., Sudermann, T., Pikula, B., Lautermann, J., Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 2002, *64*, 324–329.

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Biotechnology Journal

Biotechnol. J. 2007, 2, 50–61

[5] Wilgenbus, K. K., Kirkpatrick, C. J., Knuechel, R., Willecke, K., Traub, O., Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* 1992, *51*, 522–529.

[6] Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S. A., Alaoui-Jamali, M. A., Laird, D. W., 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.* 2003, *278*, 30005–30014.

[7] Musil, L. S., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., Goodenough, D. A., Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.* 1990, *111*, 2077–2088.

[8] Moreno, A. P., Fishman, G. I., Spray, D. C., Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels. *Biophys. J.* 1992, *62*, 51–53.

[9] Musil, L. S., Goodenough, D. A., Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* 1991, *115*, 1357–1374.

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

[11] Loewenstein, W. R., Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 1981, *61*, 829–913.

[12] Murray, S. A., Fletcher, W. H., Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Cell Biol.* 1984, *98*, 1710–1719.

[13] Kalimi, G. H., Lo, C. W., Gap junctional communication in the extraembryonic tissues of the gastrulating mouse embryo. *J. Cell Biol.* 1989, *109*, 3015–3026.

[14] Loewenstein, W. R., Kanno, Y., Studies on an epithelial (gland) cell junction. I. Modifications of surface membrane permeability. *J. Cell Biol.* 1964. *22*. 565–586.

[15] Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J. L., Zaidan-Dagli, M. L., Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, *1719*, 125–145.

[16] Hendrix, E. M., Myatt, L., Sellers, S., Russell, P. T., Larsen, W. J., Steroid hormone regulation of rat myometrial gap junction formation: Effects on cx43 levels and trafficking. *Biol. Reprod.* 1995, *52*, 547–560.

[17] Laird, D. W., Fistouris, P., Batist, G., Alpert, L. *et al.*, Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* 1999, *59*, 4104–4110.

[18] Hirschi, K. K., Xu, C. E., Tsukamoto, T., Sager, R., Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth. Differ.* 1996, *7*, 861–870.

[19] Rotman, B., Papermaster, B. W., Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1966, *55*, 134–141.

[20] Dive, C., Cox, H., Watson, J. V., Workman, P., Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Mol. Cell. Probes* 1988, *2*, 131–145.

[21] Wang, X. M., Terasaki, P. I., Rankin, G. W., Jr., Chia, D. *et al.*, A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum. Immunol.* 1993, *37*, 264–270.

[22] Barberi-Heyob, M., Vedrine, P. O., Merlin, J. L., Millon, R. *et al.*, Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy *via* induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.* 2004, *24*, 951–958.

[23] Wade, M. H., Trosko, J. E., Schindler, M., A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* 1986, *232*, 525–528.

[24] Quesada, I., Fuentes, E., Andreu, E., Meda, P. *et al.*, On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003, *284*, E980–E987.

[25] Chi, S. S., Rattner, J. B., Matyas, J. R., Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J. Anat.* 2004, *205*, 363–370.

[26] Soroceanu, L., Manning, T. J., Jr., Sontheimer, H., Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 2001, *33*, 107–117.

[27] Salmon, E. D., Leslie, R. J., Saxton, W. M., Karow, M. L., McIntosh, J. R., Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: Analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell Biol.* 1984, *99*, 2165–2174.

[28] Reits, E. A., Neefjes, J. J., From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* 2001, *3*, E145–E147.

[29] Frantseva, M. V., Kokarovtseva, L., Naus, C. G., Carlen, P. L. *et al.*, Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J. Neurosci.* 2002, *22*, 644–653.

[30] Evans, W. H., Boitano, S., Connexin mimetic peptides: Specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem. Soc. Trans.* 2001, *29*, 606–612.

[31] Davidson, J. S., Baumgarten, I. M., Glycyrrhetinic acid derivatives: A novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure–activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988, *246*, 1104–1107.

[32] Guo, Y., Martinez-Williams, C., Gilbert, K. A., Rannels, D. E., Inhibition of gap junction communication in alveolar epithelial cells by 18alpha-glycyrrhetinic acid. *Am. J. Physiol.* 1999, *276*, L1018–L1026.

[33] Tsai, C. H., Yeh, H. I., Tian, T. Y., Lee, Y. N. *et al.*, Down-regulating effect of nicotine on connexin43 gap junctions in human umbilical vein endothelial cells is attenuated by statins. *Eur. J. Cell Biol.* 2004. *82*, 589–595.

[34] Nagy, J. I., Li, W. E., Roy, C., Doble, B. W. *et al.*, Selective monoclonal antibody recognition and cellular localization of an unphosphorylated form of connexin43. *Exp. Cell Res.* 1997, *236*, 127–136.

[35] King, T. J., Fukushima, L. H., Hieber, A. D., Shimabukuro, K. A. *et al.*, Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: Inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 2000, *21*, 1097–1109.

[36] Segretain, D., Decrouy, X., Dompierre, J., Escalier, D. *et al.*, Sequestration of connexin43 in the early endosomes: An early event of Leydig cell tumor progression. *Mol. Carcinogen.* 2003, *38*, 179–187.

[37] Saitoh, M., Oyamada, M., Oyamada, Y., Kaku, T., Mori, M., Changes in the expression of gap junction proteins (connexins) in hamster tongue epithelium during wound healing and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997, *18*, 1319–1328.

[38] Matono, S., Tanaka, T., Sueyoshi, S., Yamana, H. *et al.*, Bystander effect in suicide gene therapy is directly proportional to the degree of gap junctional intercellular communication in esophageal cancer. *Int. J. Oncol.* 2003, *23*, 1309–1315.

[39] Arnold, J. M., Phipps, M. W., Chen, J., Phipps, J., Cellular sublocalization of Cx43 and the establishment of functional coupling in IMR-32 neuroblastoma cells. *Mol. Carcinogen.* 2005, *42*, 159–169.

[40] Lampe, P. D., Lau, A. F., The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, *36*, 1171–1186.

[41] Lampe, P. D., TenBroek, E. M., Burt, J. M., Kurata, W. E. *et al.*, Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 2000, *149*, 1503–1512.

[42] Lee, S. H., Kim, W. T., Cornell-Bell, A. H., Sontheimer, H., Astrocytes exhibit regional specificity in gap-junction coupling. *Glia* 1994, *11*, 315–325.

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[43] Lippincott-Schwartz, J., Patterson, G. H., Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003, *300*, 87–91.
[44] Frame, M. K., de Feijter, A. W., Propagation of mechanically induced intercellular calcium waves *via* gap junctions and ATP receptors in rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 1997, *230*, 197–207.
[45] Samoilova, M., Li, J., Pelletier, M. R., Wentlandt, K. *et al.*, Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: Increased gap junctional function and expression. *J. Neurochem.* 2003, *86*, 687–699.
[46] Chi, S. S., Rattner, J. B., Sciore, P., Boorman, R., Lo, I. K., Gap junctions of the medial collateral ligament: Structure, distribution, associations and function. *J. Anat.* 2005, *207*, 145–154.
[47] Cronier, L., Bastide, B., Herve, J. C., Deleze, J., Malassine, A., Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: Influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1994, *135*, 402–408.
[48] Deleze, J., Delage, B., Hentati-Ksibi, O., Verrecchia, F., Herve, J. C., Fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol. Biol.* 2001, *154*, 313–327.
[49] Hentati-Ksibi, O., Comparaison des permÈabilitÈs pour une sÈrie de molËcules fluorescentes des canaux jonctionnels homotypiques constituÈs des connexines 43, 32 et 26 de rat induites par transfection de leurs gËnes dans des lignÈes cellulaires non communicantes, *Ph.D. Thesis*, FacultÈ des Sciences Fondamentales et AppliquÈes, Poitiers 1999.
[50] Goldberg, G. S., Moreno, A. P., Bechberger, J. F., Hearn, S. S. *et al.*, Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetinic acid derivative. *Exp. Cell Res.* 1996, *222*, 48–53.
[51] Guan, X., Wilson, S., Schlender, K. K., Ruch, R. J., Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetinic acid. *Mol. Carcinogen.* 1996, *16*, 157–164.
[52] Mordon, S., Devoisselle, J. M., Maunoury, V., In vivo pH measurement and imaging of tumor tissue using a pH-sensitive fluorescent probe (5,6-carboxyfluorescein): Instrumental and experimental studies. *Photochem. Photobiol.* 1994, *60*, 274–279.
[53] Begu, S., Devoisselle, J. M., Mordon, S., Non invasive fluorescent study in situ and in real time of glucose effects on the pharmacokinetic of calcein. *J. Biomed. Opt.* 2002, *7*, 609–612.
[54] Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H. *et al.*, FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J. Immunol.* 1998, *160*, 5037–5044.
[55] Fang, T., Naguib, K. S., Peyman, G. A., Khoobehi, B., Comparative study of three fluorescent dyes for angiography: Sodium fluorescein, carboxyfluorescein, and calcein. *Ophthalmic. Surg.* 1990, *21*, 250–257.
[56] Krutovskikh, V. A., Oyamada, M., Yamasaki, H., Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: Direct measurement of communication *in vivo*. *Carcinogenesis* 1991, *12*, 1701–1706.
[57] Cotrina, M. L., Gao, Q., Lin, J. H., Nedergaard, M., Expression and function of astrocytic gap junctions in aging. *Brain Res.* 2001, *901*, 55–61.
[58] Parish, C. R., Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* 1999, *77*, 499–508.
[59] Brenan, M., Parish, C. R., Intracellular fluorescent labelling of cells for analysis of lymphocyte migration. *J. Immunol. Methods* 1984, *74*, 31–38.
[60] Graber, M. L., DiLillo, D. C., Friedman, B. L., Pastoriza-Munoz, E., Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH. *Anal. Biochem.* 1986, *156*, 202–212.
[61] Lichtenfels, R., Biddison, W. E., Schulz, H., Vogt, A. B., Martin, R., CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J. Immunol. Methods* 1994, *172*, 227–239.
[62] Moore, P. L., MacCoubrey, I. C., Haugland, R. P, A rapid, pH insensituve, two color fluorescence viability (cytotoxicity) assay. *J. Cell Biol.* 1990, *111*, 304.
[63] Beghetto, C., Renken, C., Eriksson, O., Jori, G. *et al.*, Implications of the generation of reactive oxygen species by photoactivated calcein for mitochondrial studies. *Eur. J. Biochem.* 2000, *267*, 5585–5592.
[64] Liminga, G., Martinsson, P., Jonsson, B., Nygren, P., Larsson, R., Apoptosis induced by calcein acetoxymethyl ester in the human histiocytic lymphoma cell line U-937 GTB. *Biochem. Pharmacol.* 2000, *60*, 1751–1759.
[65] Liminga, G., Nygren, P., Dhar, S., Nilsson, K., Larsson, R., Cytotoxic effect of calcein acetoxymethyl ester on human tumor cell lines: Drug delivery by intracellular trapping. *Anticancer Drugs* 1995, *6*, 578–585.

© 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

IV.2 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE COMPORTEMENTAL POUR ANALYSER LA TECHNIQUE DE *GAP*-FRAP DANS UNE CULTURE TRIDIMENSIONNELLE, LE SPHEROIDE

L'équation perturbation-relaxation, décrite dans le partie **IV.1**, est un modèle de cinétique du recouvrement de fluorescence des zones adjacentes vers une zone photoblanchie. Sa fonction est de reproduire la réponse temporelle du recouvrement de fluorescence. Il n'explique pas la physique de diffusion de la calcéine *via* les jonctions *gap*.

Après avoir choisi la calcéine-AM pour un transfert potentiel de la technique de *gap*-FRAP *in vivo*, l'étape suivante a consisté à développer un modèle comportemental de physique macroscopique pour l'analyse des données de recouvrement de fluorescence. Ce modèle est une représentation simplifiée comparée aux modèles à dérivées partielles proposés dans la littérature pour l'analyse de la technique de FRAP (Braeckmans *et al.*, 2003).

Dans cet objectif, trois critères ont été fixés :

- La zone photoblanchie d'un diamètre égal à 50µm pour un transfert ultérieur *in vivo via* un système fibré.
- Le modèle d'analyse développé doit, non seulement prendre en compte la diffusion de la sonde fluorescente depuis les zones périphériques adjacentes mais également, celle provenant des zones sous-jacentes vers la zone cible photoblanchie.
- Les paramètres discriminant issus du modèle comportemental développé doivent permettre une caractérisation des tissus en fonction de la fonctionnalité des jonctions communicantes.

Une étude comparative du recouvrement de fluorescence pour des cultures en monocouche (modèle bidimensionnel) et en sphéroïde (modèle tridimensionnel) d'environ 500µm de diamètre a été menée. Les lignées cellulaires KB et FaDu, décrites dans la partie **IV.1** ont également été sélectionnées pour cette approche.

Comme nous l'avons mis en évidence en monocouche (Voir partie **IV.1**), la distribution des Cx43 (par immunocytochimie) dans le modèle sphéroïde KB, est principalement membranaire au niveau des zones de contact intercellulaire. A contrario, pour les sphéroïdes FaDu, le marquage apparaît non significatif alors qu'il était périnucléaire en culture bidimensionnelle.

Après avoir optimisé les conditions d'incorporation de la calcéine-AM pour la culture en sphéroïde (temps et température-dépendant), indépendamment du type cellulaire, le

marquage s'est révélé d'intensité hétérogène en surface, pouvant aller jusqu'à 80µm de profondeur. Indépendamment du type de culture (2-D & 3-D), la modélisation du recouvrement de fluorescence est fondée sur des lois de mécanique des fluides. Les trois zones (une cible et deux périphériques) sont décrites par un systéme de trois compartiments interconnectés. De cette analyse, trois paramétres ont été isolés : k le rendement de recouvrement de fluorescence à l'équilibre et deux constantes de temps (une rapide et une lente), qui décrivent la vitesse de recouvrement. L'algorithme développé met en évidence la relation entre chaque compartiment dans le processus de recouvrement de fluorescence en intégrant la diffusion de la sonde depuis la périphérie comme valeur d'entrée vers la zone cible.

Ce modèle, développé à partir d'équations différentielles, a montré sa capacité de discrimination dépendant de la fonctionnalité des jonctions *gap*. En effet, pour les cultures de cellules KB, positives pour l'expression des Cx43, k = 0,21, n = 7 et k = 0,18, n = 7, en culture 2-D & 3-D, respectivement. Ces valeurs sont significativement supérieures à celles des FaDu (k = -0,01, n = 5 et k = 0,026, n = 6). L'absence de différence significative entre les paramétres estimés pour les KB quelque soit le type de culture, confirme une contribution négligeable des couches sous-jacentes lors de la mesure du recouvrement de fluorescence dans un unique plan Z par microscopie confocale.

Cette étude est actuellement en révision pour l'*European Biophysical Journal* et est présentée dans les pages suivantes sous forme d'article.

A system engineering model to analyze gap-FRAP in a multicellular 3-dimensional model

Muriel Abbaci [1,2,3], Thierry Bastogne [2], Jacques Didelon [3], Dominique Dumas [4]

François Guillemin[1,2,3], Walter Blondel [1,2] and Muriel Barberi-Heyob [2,3]

(1) Faculté de Médecine, Nancy-University, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

(2) Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy.

(3) Centre Alexis Vautrin, Nancy-University.

(4) LEMTA, Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire-Service Imagerie Cellulaire, Nancy University, Faculté de médecine, Vandœuvre-lès-Nancy.

Keywords : gap-FRAP, spheroid, confocal microscopy, engineering model

Corresponding author: Muriel Barberi-Heyob

m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Tel.: 33 3 83 59 83 76

Fax.: 33 3 83 59 83 78

ABSTRACT

For gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) analysis, perturbation-relaxation equation (static model), corresponding to a single exponential function, is an oversimplification of the diffusion events. A behavioral model was described to compare the functionality of gap junctional intercellular communication (GJIC) for a 2-dimensional (D) culture and a multicellular 3-D model. Criteria were imposed such as a targeted area of 50 µm for photobleaching and an analysis of the process from neighboring and underlying cells. We compared the output variables (static gain and response times of the recovery kinetics) in KB cells characterized by a positive connexin 43 expression and a GJIC capacity and negative FaDu cells in monolayer cultured cells and spheroids. This system-engineering model based on differential equations, showed its discrimination capacity according to the functionality of GJIC. No significant differences were observed in relation with the culture type, checking the negligible contribution from underlying layers for future *in vivo* application.

Introduction

Developed in the 70s, the Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) technique is based on the progressive increase of fluorescence intensity in a photobleaching area obtained after an illumination with a laser beam. This enhancement corresponds to the gradual arrival of intact fluorescent molecules towards the targeted zone (Reits and Neefjes 2001). This widely used method is principally dedicated to study fluorescent constituents mobility in cellular membranes and cytoplasm at microscopic scale (Lippincott-Schwartz and Patterson 2003). Exhaustive methods to analyze FRAP results were presented by Carrero *et al.* (Carrero et al. 2003). Diffusion models for use with non scanning and scanning fluorescence microscope have already been proposed (Axelrod et al. 1976; Kubitscheck et al. 1994) and 2-D and 3-D models for confocal laser scanning microscopy (CLSM) were previously developed, based on numerical approaches (Peters and Kubitscheck 1999; Wedekind et al. 1994). Finally, models with bleaching scanning and static laser beam have been described (Blonk et al. 1993; Braeckmans et al. 2003; Braeckmans et al. 2007). Gap-FRAP technique enlarges the FRAP technique to study the functionality of GJIC channels *in vitro* (Wade et al. 1986). This is the main form for direct contact between cytoplasms of adjacent cells. Each gap junction is made of twelve protein sub-units called connexins (Cx). Currently, several physiological roles characterize them, including electrical coupling, the homeostasis (Loewenstein 1981) and the balance of the cellular proliferation (Loewenstein and Kanno 1964). GJIC is also partially implicated in resistance in drugs and ionizing radiation by contact effect between tumor cells in multicellular 3-D culture (Olive and Durand 1994). In fact, to take into consideration the 3-D arrangement of solid tumors, multicellular spheroids have been developed. This cellular model represents a quite practically growth and organization of solid tumors and simulate much more precisely the cell-cell interactions

(Santini and Rainaldi 1999). Spheroid are composed of necrotic, quiescent and proliferating cells (Kunz-Schughart et al. 1998). The stable 3-D organization of spheroids is made possible by intercellular membrane contact and intercellular communications such as gap junctions (Dubessy et al. 2000). GJIC in spheroid was successfully measured by microinjection dye transfer (Dertinger and Hülser 1984). Mono-exponential fitting is presently the main way to analyze *in vitro* gap-FRAP responses in monolayer cultures (Deleze et al. 2001) and no devoted model has still been proposed. Very few studies have been reported in the literature concerning GJIC studies performed by gap-FRAP technique for a 3-D analysis (Chi et al. 2005; Wentlandt et al. 2006). In these studies, fluorescence recovery percentage values obtained by a perturbation-relaxation equation resulting from a classical single exponential function, were selected as the discriminating parameter (Deleze et al. 2001). However, for most 3-D analyses, this model is not close to the fluorescence recovery kinetics and finally, it does not appear optimized. This paper describes for the first time, the development of a system engineering model to evaluate pertinent output variables which are able to characterize the functionality of GJIC in cells cultured as spheroid model. Classical fluorescence recovery parameters were compared with the new output variables from the system engineering model in cell types characterized by different GJIC capacities.

Materials and methods

Cell lines and cell cultures

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Culture media and additives were obtained from life technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). Calcein acetoxymethylester (AM) was obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Anti-Cx43 rabbit polyclonal antibody was provided by Zymed Laboratories Inc (Clinisciences, Montrouge, France). Fluoresceine Iso Thio Cyanate (FITC)-conjugated goat

anti-rabbit immunoglobulin serum was purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). FaDu and KB, human head and neck carcinoma cell lines were grown in 75 cm^2 plastic tissue culture flasks with RPMI 1640 complemented with 9% of FCS, 1% of L-Glutamine and 1% of penicilline/streptomycine in a 37°C, 5% CO_2 atmosphere.

Multicellular spheroids were initiated by seeding 5.10^4 single FaDu and KB cells into 75 cm^2 flasks, previously coated with 1% L-agarose. After 3 days, aggregates were transferred to 250 mL spinner flasks (Integra Biosciences, Cergy-Pontoise, France) containing 100 mL of culture medium. The flasks were placed on magnetic plates at 75 rpm in 5% CO_2 and 37°C humidified atmosphere. Spheroid culture medium was changed every 2 days until they reached 500 µm in diameter.

Localization of Cx43 expression by immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for spheroid was performed on 5 µm fresh frozen tissue sections with the use of the rabbit polyclonal anti-Cx 43 antibody at a dilution 1/50. The slides were fixed with formol, blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) and goat serum for 1h at room temperature; they were then sequentially incubated at 4°C for a night with anti-Cx43 rabbit polyclonal antibody (1/50) and secondary antibody, FITC-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/50) at room temperature for 45min.

Gap-FRAP experiments

For monolayer culture, cell lines were plated on 8-well glass chamber slides at 3.10^4 cells/mL, 72h before performed FRAP experiments. The cells were loaded for 15min at 37°C for 30min at 37°C with calcein acetoxymethylester (AM) at 0.5 µM

For spheroid culture, spheroids were loaded at 4°C for 2h with calcein AM at 0.5 µM then rinsed and incubated at 37°C for 30min. Spheroids were observed in 4-well glass chamber slides.

FRAP was achieved on a 50 µm diameter region of interest (ROI) on proliferative rim using CLSM (SP2 AOBS Leica), constituted by a reversed microscope equipped with an argon laser source at 488 nm. Fluorescence intensity signal was measured between 500 and 560 nm. The laser output power was adjusted to 30s for prebleaching period then during 15 iterations to achieve a sufficient photobleaching for fluorescence recovery observations without causing visible damage. Fluorescence recovery analysis was performed with a measure every 15s during 900s.

Calcein distribution in spheroids

Labeled spheroids were frozen at -80°C and sectioned into 5 µm sections. Slides were observed under CLSM. The fluorescence intensity signal was measured between 500 and 560 nm. For macroscope analysis, loaded spheroids were observed with macroscope Leica MacroFluo^{TM} Z6 APO A. Emitted fluorescence was collected *via* a band-pass filter (560/40 nm).

Gap-FRAP analysis and System-engineering modeling

The recovery kinetics processing was divided into several steps. Firstly, a unitary value was assigned to the intensity of fluorescence measured before photobleaching period and served as reference value to express the recovery of fluorescence. For each time point, the fluorescence intensity value measured on a targeted area (50 µm) was divided by the intensity value of a reference area (50 µm) at the edge of the microscopic field. Since the reference area was unaffected by the laser bleach, this ratio allowed us to correct for artifactual changes in

fluorescence intensity due primarily to the photobleaching, resulting from the exposure of the whole field to the excitation light source (Soroceanu et al. 2001). These ratios were normalized and plotted *versus* time to display fluorescence recovery curves.

These curves were then fitted using a single exponential function. The exponential fluorescence recovery for the bleached cells was analyzed by the following perturbation-relaxation equation (Salmon et al. 1984):

$$\boldsymbol{F}(\boldsymbol{t}) = \boldsymbol{F}_{\boldsymbol{o}} + (\boldsymbol{F}_{\infty} - \boldsymbol{F}_{\boldsymbol{o}})(1 - \boldsymbol{e}^{-\boldsymbol{t}/\boldsymbol{\tau}}) \qquad (1)$$

where t is the time (s) after photobleaching; $F(t)$ is the normalized fluorescence intensity (A.U.); $\boldsymbol{F}_{\infty}$ is the asymptotic value to which the fluorescence intensity tends (A.U.); F_o is the theoretical fluorescence intensity estimated immediately (t=0s) after photobleaching. F_o is close to the experimental value (A.U.), according to the good fitting quality (R^2>0.98) (Fig. 1a). τ is a time constant (s). The transfer constant k=1/ τ was also calculated.

Likewise, the percentage of recovery at 15 min (Chi et al. 2004) is defined as follows:

$$\%_{15} = (\boldsymbol{F}_{15} - \boldsymbol{F}_{0})/\boldsymbol{F}_{\boldsymbol{i}} \times 100 \qquad (2)$$

A system-engineering model of the gap-FRAP responses was studied. The latter was derived from a macroscopic modeling in which three concentric compartments of the studied cell population were described by a hydraulic system composed of interconnected tanks (Fig.1b). The two connections between the tanks symbolized the exchange of calcein through the gap junctions at the frontier between two adjacent compartments. In this analogy, fluorescence intensities in the compartments were compared to level of calcein in the fictitious tanks.

Modeling assumptions

It was assumed that the calcein flows between the tanks were laminar, the leak outflows proportional to the mean level of calcein (y_i and y_m) in the tanks T_m and T and the flow of the

dye by passive diffusion also contributed to fluorescence recovery. Based on these assumptions and according to fluid mechanics laws, y_i and y_m obey to:

$$\begin{aligned} A_i \frac{dy_i}{dt} &= \alpha_{mi}\left(y_m(t) - y_i(t)\right) - \alpha_i y_i(t) \\ A_m \frac{dy_m}{dt} &= \alpha_{xm}\left(y_x(t) - y_m(t)\right) - \alpha_{mi}\left(y_m(t) - y_i(t)\right) - \alpha_m y_m(t) \end{aligned} \qquad (3)$$

with $y_i(0) = 0$ and $y_m(0) = y_{m0}$ as initial conditions. α_{xm} and α_{mi} were flow coefficients of the gap junctions, and α_m and α_i of the leak out. Parameters A_i and A_m were the cross-sectional areas of the tanks associated with the internal and middle compartments, respectively. In practice, A_i and A_m were estimated as the number of pixels associated with cancer cells for each compartment. The input variable (explanatory variable) was y_x while y_i characterized the output variable (variable to explain). The relationship between y_x and y_i was obtained by removing after substitution the state variable y_m from *(3)*:

$$(1 + T_1 p)(1 + T_2 p) \cdot y_i(t) = k \cdot y_x(t) + c \cdot y_{m0} \qquad (4)$$

where T_1 and T_2 were two time constants and k, the static gain. p denoted the time differentiation operator defined by $p \cdot y(t) = dy/dt$. c was a constant and $y_{m0} = y_m(0)$. k, T_1 and T_2 were aggregate parameters of the flow coefficients α_{xm}, α_{mi}, α_m and α_i. k expressed the fluorescence recovery yield at steady state. The determination of a parametric model describing the fluorescence recovery kinetics through gap junctions by extracting information from observations of input and output variables was a system identification problem (Walter and and Pronzato 1997).

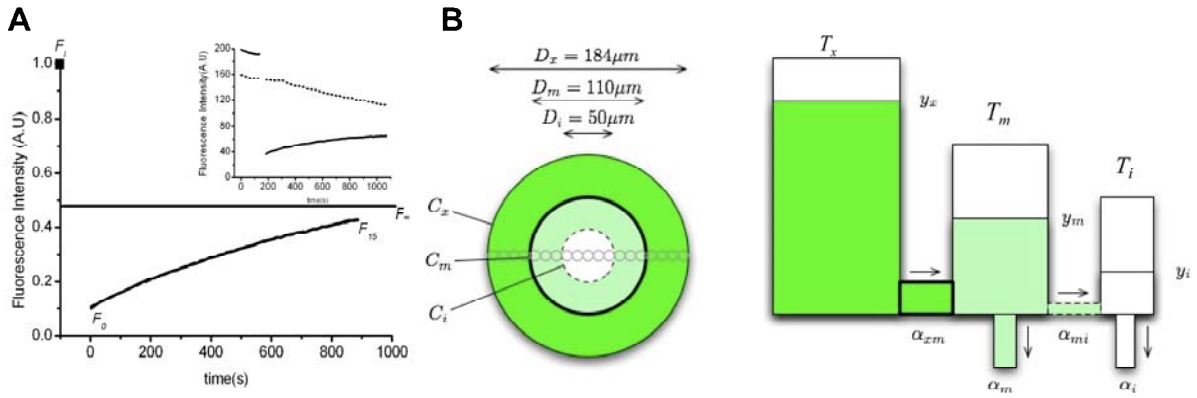

Figure 1. (***a***) Typical fluorescence recovery curve. Fluorescence recovery quantified with the following parameters: F_I, initial fluorescence intensity value; $\boldsymbol{F}_{\infty}$, asymptotic value to which the fluorescence intensity tends; F_o, theoretical fluorescence intensity estimated at t=0 s after photobleaching and F_{15}, fluorescence intensity value measured at the end of the experiment (t=15 min). Inset graph illustrates fluorescence recovery kinetic of non-treated data obtained from targeted area (unbroken line) and control area (dotted line). (***b***) System-engineering model of the fluorescence recovery in gap-FRAP. FRAP was achieved on a 50 µm diameter ROI (*Di*). Neighboring zone (*Dm*), corresponding to a decrease of the fluorescence intensity after photobleaching induced by the diffusion of light. Peripheral zone (*Dx*) without change of the fluorescence intensity after the photobleaching period. The studied cell population was split up into three concentric compartments (C_i, C_m and C_x). By analogy in fluid mechanics, GJIC between the compartments was described by a system composed of three interconnected tanks, T_i, T_m and T_x, respectively. y_i, y_m and y_x denoted the mean value of the normalized fluorescence intensities in the compartments. T_m and T_i illustrated the leak out of calcein from C_i and C_m.

Parameter estimation method

The lumped parameter model described in *(4)*, was implemented in Matlab™ (Mathworks Inc.). The system identification method used was based on the Simplified Refined Instrumental Variable (SRIVC) algorithm for continuous-time systems (Young and and Jakeman 1980) implemented in the CONTSID toolbox for Matlab (Garnier 2008).

Statistical Analysis

Mann and Whitney U test was used to check for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $p < 0.05$.

Results and Discussion

Cx43 expression distribution

We previously checked by western blot analysis of whole-cell extracts Cx43, Cx26 and Cx32 proteins expression in FaDu and KB cells revealing the presence of three immunoreactive isoforms of Cx43 and no expression for Cx26 and Cx32 (Abbaci et al. 2007). Antibody identifying both nonphosphorylated and phosphorylated forms, showed fluorescent green zones at the KB cell-cell borders on the contrary, FaDu cells only displaying a non significant distribution into the cytoplasm (Fig. 2a, b). Hence, compared to a monolayer culture, Cx43 distribution in KB and FaDu spheroids was closely similar. Hülser & Brummer described the presence of gap junction plaques whatever spheroids age and size. A regulatory function of GJIC linked to a growth in 3-D culture by coupled cells was proposed (Hülser and Brummer 1982). Competent cells in monolayer culture were still coupled in spheroid culture but GJIC could be somewhat reduced (Hülser 1992). Knüechel *et al.* observed in human bladder carcinoma cells cultured as spheroids, a Cx26 expression lower than in corresponding monolayer independently of the density of culture (Knuechel et al. 1996). Discrepancies between monolayer and spheroids cultures were most likely due to higher cellular differentiation in multicellular spheroids explained by physiological conditions in spheroids more similar to the *in vivo* situation (Knuechel et al. 1996).

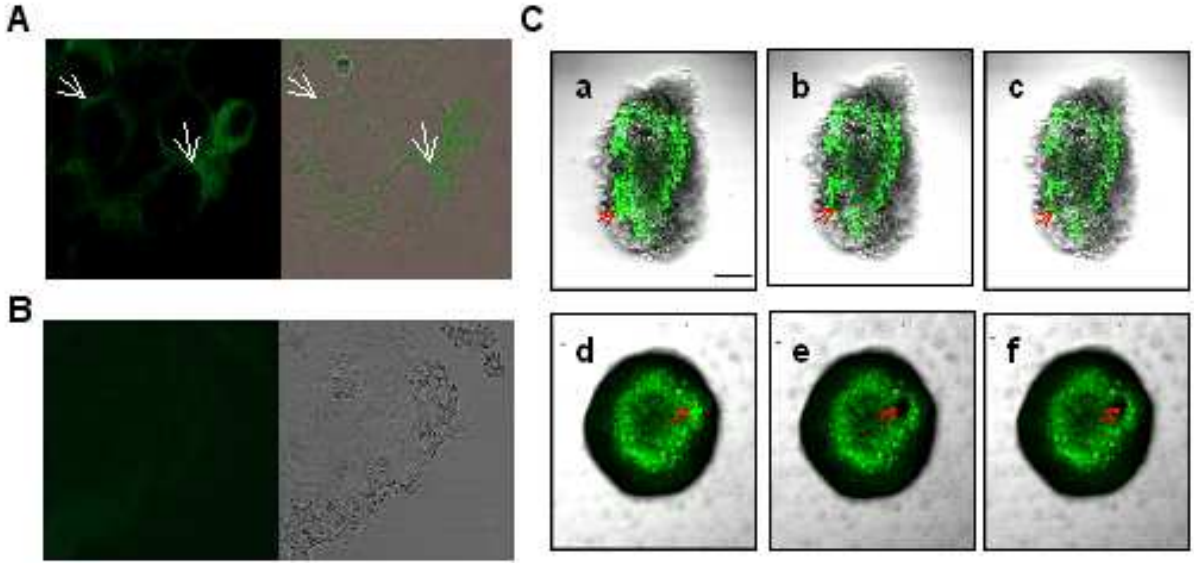

Figure 2. (***a***) Cell distribution of Cx43 proteins by immunocytochemistry in KB (magnification X100) and (***b***) in FaDu (magnification X40) spheroids. Light transmitted (right column) and the corresponding fluorescence image (left column). Immunocytochemistry with anti-Cx43 antibody revealed a cytoplasmic and membranar staining in KB spheroids. A marked green staining was observed at the cell-cell borders indicated by white arrows on contrary to FaDu spheroids. (***c***) Representative images of fluorescence restoration in KB (a, b, c) and FaDu (d, e, f) spheroids for a targeted area of 50 µm diameter (red arrow*).* Each column introduces the three specific steps of FRAP; left column shows recordings before photobleaching after calcein AM exposure (a, d); the middle column, acquisitions just after the photobleaching time (b, e) and the right part (c, f), fluorescence recoveries. Fluorescence image and the corresponding transmitted light. Scale bar 100 µm.

Calcein distribution in spheroids

A strong pattern of calcein fluorescence was observed in the outer rim of the KB spheroid followed by a decrease from the surface until a depth of 80 µm (Fig. 3a). Moreover, a characteristic heterogeneous dye distribution was observed in the proliferative rim (Fig. 3c) for both cell types. Hydrolysis of hydrophobic calcein AM by intracellular esterases produces calcein, a hydrophilic fluorescent compound that is well-retained in the cell cytoplasm (Czyz et al. 2000). We applied cold incubation protocol as recommended by Wartenberger *et al.* to increase fluorescent dye incorporation. The authors showed an improvement of calcein AM incorporation from 20 to 60 µm at 8°C in glioma spheroids. At low temperature, calcein AM was able to diffuse deeper into the spheroid since enzyme activity became marginal

(Wartenberg and Acker 1995). The stained rim corresponded to proliferative cells and inner non stained but vital rim, the quiescent cells (Wartenberg and Acker 1995). We postulated that calcein AM incorporation in spheroids was limited to proliferative cells. Distribution of the calcein AM in MCF7 spheroids (diameter from 300 to 400 µm) was also achieved by Martin *et al.* (Martin et al. 2003). The incorporation was also confined to the spheroid periphery (Martin et al. 2003) and as we observed a very low fluorescence intensity was detectable for calcein at the depth of 80 µm. Macroscopic images of FaDu spheroid loaded with calcein AM, illustrate the peripheral distribution of the fluorescent dye (Fig. 3b).

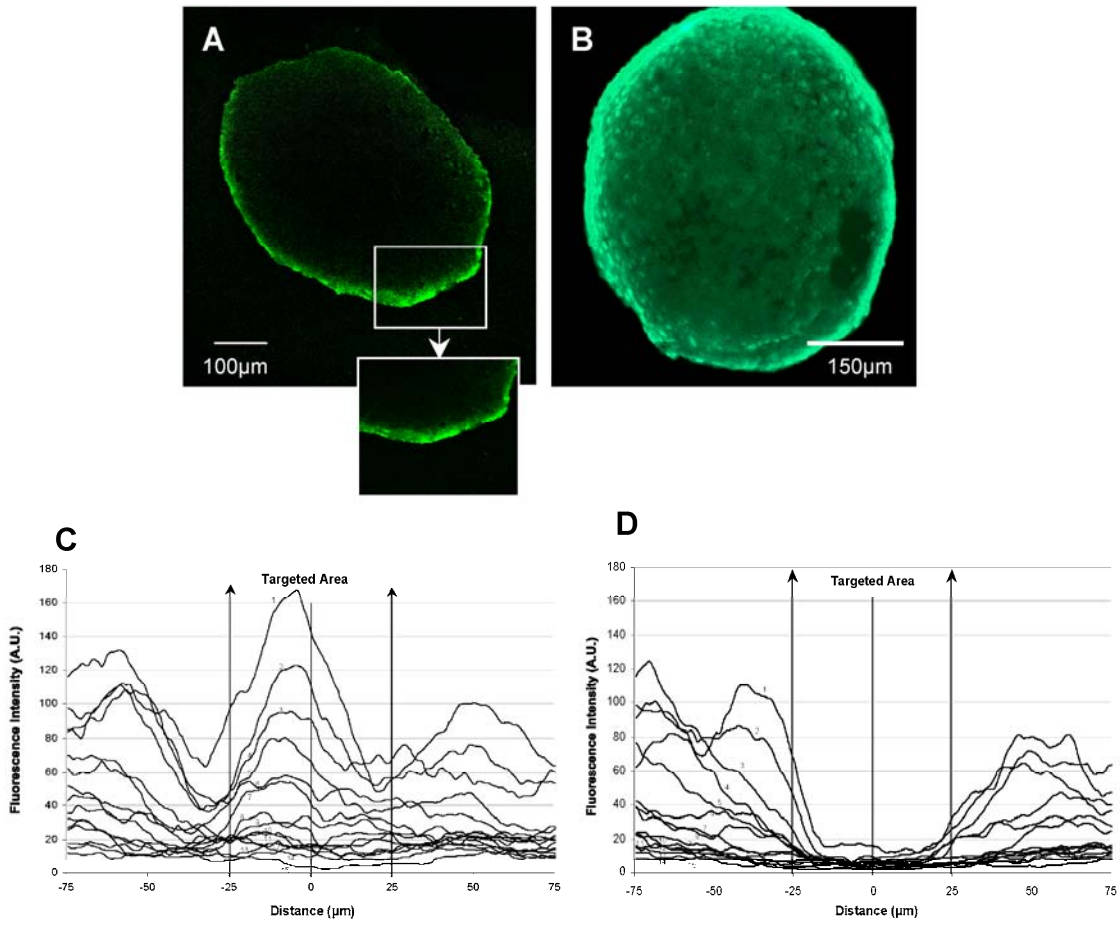

Figure 3. (***a***) Fluorescence image of a typical 5 µm thick frozen section of a KB spheroid loaded with 0.5 µM calcein AM using CLSM. (***b***) Macroscopic observation of an entire FaDu spheroid loaded with calcein AM. (***c***) Typical fluorescent dye distribution in the outer rim of KB multicellular spheroid until a depth of 80 µm along the Z-axis before the photobleaching period. (***d***) Bleaching profiles in the vertical plane for the ROI (included between two black arrows) and the neighboring zone. Each curve corresponds to an increment of 6 µm from the outer-most layer to a depth of 80 µm.

Gap-FRAP analysis in monolayer and 3-D cultures

Fluorescence recovery rates were interpreted as the dye diffusion across gap junctions. Fluorescence intensity after photobleaching period was decreased in all marked cells localized in the ROI from the outermost to the deepest layers (Fig. 2c). The unbleached dye molecules were redistributed through gap junctions (validated with a gap junction channel inhibition assay) from contacting KB cells (Abbaci et al. 2007). On the contrary for FaDu cells, no fluorescent dye diffused from adjacent cells in the ROI (Fig. 2c).

Using the classical perturbation-relaxation equation (Deleze et al. 2001), we observed similar gap-FRAP responses for each cell type under both monolayer and spheroid culture conditions (Table 1) and the functional state of GJIC was in relation with Cx43 distribution. No comparable cell morphology was observed for KB and FaDu spheroids in transmitted light (Fig. 2c). Difficulty to analyze accurately fluorescence recovery data could be enhanced by the specificity of gap junction communication often described in 3-D culture. Hülser *et al*. described a high packing density of cells in case of uncoupled cells such as HeLa whereas coupled cells presented a structure closely packed with some intercellular space in spheroids (Hülser 1992). Interestingly, variation in GJIC in 3-D culture of FaDu and KB cells could be linked to their sensibility to drugs and ionizing radiations analyzed previously (Griffon-Etienne et al. 1997).

Table 1. GJIC activity in monolayer and spheroid culture. Discriminating parameters were obtained **by the perturbation-relaxation equation** (Deleze et al. 2001). Fluorescence intensity values were normalized before calculation.

Cell line	**KB**		**FaDu**	
Culture type	**Monolayer** (n=7)[a]	**Spheroid** (n=7)	**Monolayer** (n=5)	**Spheroid** (n=6)
$\%_{15}$	10 ± 4[b]	13 ± 5	0	1 ± 1
k (min^{-1})	0.20 ± 0.08	0.22 ± 0.09	*	*

[a] Number of experiments
[b] SD
* Not determinable

The SRIVC estimation method (Garnier 2008) for continuous-time models identification was applied to gap-FRAP data (Fig. 4). Experiments were repeated at least five times. Among the three lumped parameters of the tank model, the shortest time-constant T_1 and the static gain k could be considered as suitable discriminators of the functionality of GJIC in a 3-D model. Boxplots showed a statistically significant increase of k values in KB cells, checking that the fluorescence recovery rate was greater in KB than in FaDu cells ($p<0.001$) (Fig. 4c). No statistically significant difference appeared between monolayer and spheroid culture for both cell types, leading to the conclusion that the underlayers cells had a negligible contribution in the fluorescence recovery process.

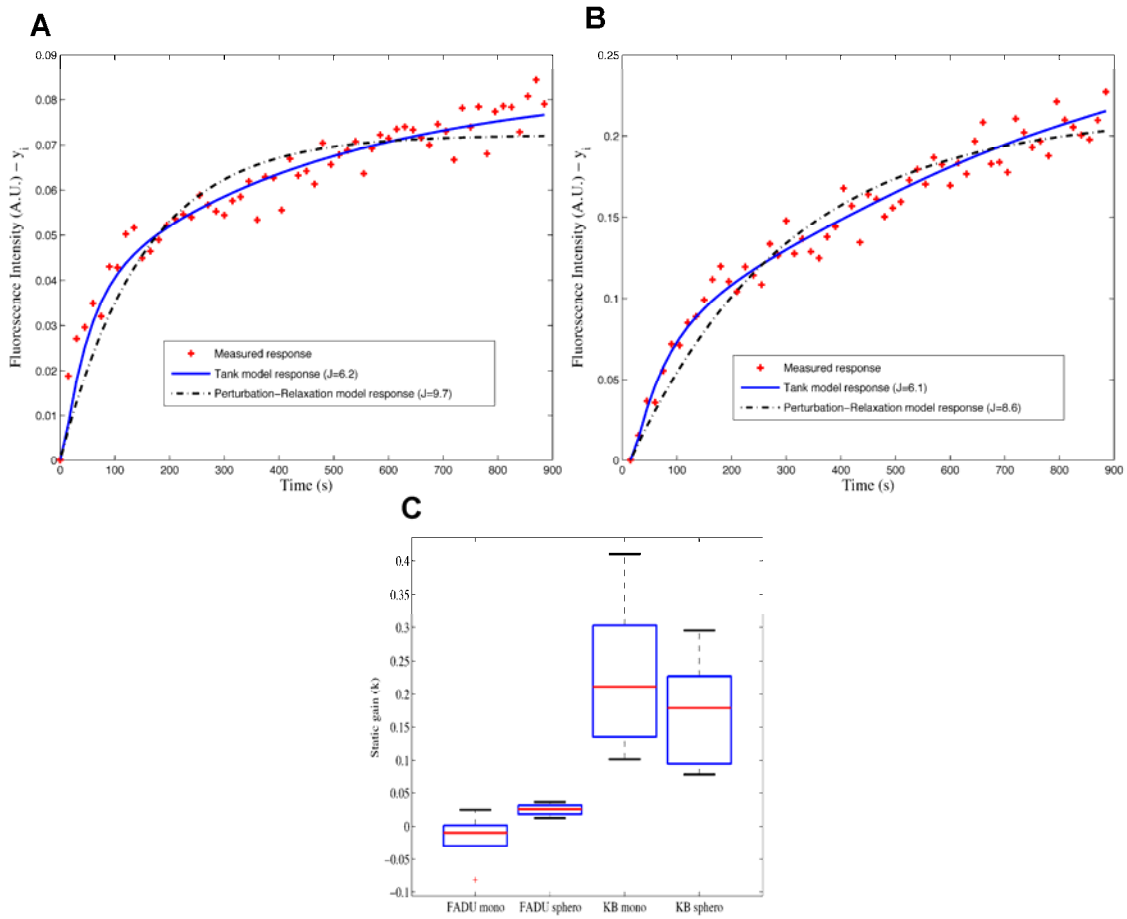

Figure 4. Kinetic profiles of raw and modeling fluorescence data for KB cells. (***a***) Measured (red points) and model (blue solid line) responses of fluorescence recovery in the internal compartment (y_i) in monolayer and (***b***) spheroid culture. Model responses were computed from the tank model. Fitting from perturbation-relaxation equation is presented in black dotted line. (***c***) Boxplots of the estimates parameters as k the static gain in cells cultured as a monolayer (mono) and as spheroids (sphero).

The perturbation-relaxation model (Deleze et al. 2001), is a black-box kinetic model while the lumped parameter model, 'tank' model defined in *(4)*, derives from a physical dynamic model. The first one aimed only at fitting the observed response time while the second one specified the cause-effect relationship based on a mechanical analogy. Moreover, the lumped parameter model takes couplings and exchanges between the compartments through the gap junctions. Accordingly, it provides new insights into the gap-FRAP phenomenon, showing that the causal relationship between the fluorescence levels between photobleached and non-photobleached zones was based on a second-order equation and not only on a mono-exponential kinetic as assumed in the perturbation-relaxation model. However, in the case of very different values for time constants T_1 and T_2 (*e.g.* magnitude 100) then the shortest time constant can be neglected. Secondly, the 'tank' model takes into account variations in the input variable (y_x) (concentration of calcein in the peripheral zone) which is not the case for the perturbation-relaxation model. Thirdly, it was shown that the transient response of the fluorescence recovery depended on the calcein concentration (y_{m0}) in the intermediate zone. Hence, using the system engineering model, concentration gradient between the two tanks (T_m and T_i) was taken into consideration during all fluorescence recovery periods. The ROI was limited to 50 µm diameter but *in fine*, we observed that the light diffusion induced a slightly decreased of the fluorescence intensity also in neighboring zone after the photobleaching period (Fig. 1b). This aspect was ignored in the perturbation-relaxation model, which could finally lead to erroneous estimations and conclusions.

Median static gain values for KB cells were equal to 0.21 and 0.18 in monolayer culture and spheroids, respectively, indicating that the fluorescence restitution was limited (Table 2).

Table 2. GJIC activity in monolayer and spheroid culture. Discriminating parameters were obtained **by the system-engineering model.** Fluorescence intensity values were normalized before calculation.

Cell line	**KB**		**FaDu**	
Culture type	**Monolayer** (n=7)[a]	**Spheroid** (n=7)	**Monolayer** (n=5)	**Spheroid** (n=6)
k	0.21 ± 0.11[b]	0.18 ± 0.08	0.01± 0.04	0.03 ± 0.01
T_1 (s)	66.8 ± 14.1	81.6 ± 46.5	257.2 ± 174.8	138.9 ± 302.8
T_2 (s)	613.6 ± 184.7	561.7 ± 173.9	430.3 ± 162.2	504.9 ± 319.5

[a] Number of experiments
[b] SD

Other molecules could interact with calcein and/or calcein could be sequestered into cellular compartments preventing the diffusion. Petronilli *et al.* described the trapping of calcein inside mitochondria (Petronilli et al. 1999). Dye could be also aggregated or incorporated into bigger complex. Membrane binding was demonstrated as being negligible (Kendall and MacDonald 1982).

This system engineering model gives insight into diffusion phenomenon taking into account the contribution of the peripheral zones to the photobleached area enlarged to several cells. After the comparative study with calcein AM (Abbaci et al. 2007) and the development of a behavioral model, the use of gap-FRAP to distinguish the functionality of GJIC on tissue *ex vivo* is currently in progress.

REFERENCES

Abbaci M, Barberi-Heyob M, Stines JR, Blondel W, Dumas D, Guillemin F, Didelon J (2007) Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: a comparative study. Biotechnol. J. 2:50-61

Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophys. J. 16:1055-1069

Blonk JCG, Don A, Van Aalst H, Birmingham J (1993) Fluorescence photobleaching recovery in the confocal scanning light microscope. J. Microsc. 169:363-374

Braeckmans K, Peeters L, Sanders NN, De Smedt SC, Demeester J (2003) Three-Dimensional Fluorescence Recovery after Photobleaching with the Confocal Scanning Laser Microscope. Biophys. J. 85:2240-2252

Braeckmans K, Remaut K, Vandenbroucke RE, Lucas B, De Smedt SC, Demeester J (2007) Line FRAP with the Confocal Laser Scanning Microscope for Diffusion Measurements in Small Regions of 3-D Samples. Biophys. J. 92:2172-2183

Carrero G, McDonald D, Crawford E, de Vries G, Hendzel MJ (2003) Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. Methods 29:14-28

Chi SS, Rattner JB, Matyas JR (2004) Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. J. Anat. 205:363-70

Chi SS, Rattner JB, Sciore P, Boorman R, Lo IK (2005) Gap junctions of the medial collateral ligament: structure, distribution, associations and function. J. Anat. 207:145-54

Czyz J, Irmer U, Schulz G, Mindermann A, Hulser DF (2000) Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. Exp. Cell Res. 255:40-6

Deleze J, Delage B, Hentati-Ksibi O, Verrecchia F, Herve JC (2001) Fluorescence recovery after photobleaching. Methods Mol. Biol. 154:313-27

Dertinger H, Hülser DF (1984) intercellular communication in spheroids, vol 95. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Dubessy C, Merlin J-L, Marchal C, Guillemin F (2000) Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 36:179-192

Garnier H, Gilson-Bagrel, M., Bastogne, T. , and Mensler, M. (2008) Identification of continuous-time models from sampled data, chapter CONTSID toolbox: a software support for data-based continuous-time modelling. Springer-Verlag, H. Garnier and L. Wang (Eds), London

Griffon-Etienne G, Merlin JL, Marchal C (1997) Evaluation of Taxol in head and neck squamous carcinoma multicellular tumor spheroids. Anticancer Drugs 8:48-55

Hülser DF (1992) Intercellular communication in three-dimensional culture. CRC press, Boca Raton

Hülser DF, Brummer F (1982) Closing and opening of gap junction pores between two- and three dimensionally cultured tumor cells. Biophys. Struct. Mech. 9:83-8

Kendall DA, MacDonald RC (1982) A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. J. Biol. Chem. 257:13892-13895

Knuechel R, Siebert-Wellnhofer A, Traub O, Dermietzel R (1996) Connexin expression and intercellular communication in two- and three-dimensional in vitro cultures of human bladder carcinoma. Am. J. Pathol. 149:1321-32

Kubitscheck U, Wedekind P, Peters R (1994) Lateral diffusion measurement at high spatial resolution by scanning microphotolysis in a confocal microscope. Biophys. J. 67:948-956

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. Int. J. Exp. Pathol. 79:1-23

Lippincott-Schwartz J, Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. Science 300:87-91

Loewenstein WR (1981) Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev. 61:829-913

Loewenstein WR, Kanno Y (1964) Studies on an Epithelial (Gland) Cell Junction. I. Modifications of Surface Membrane Permeability. J. Cell Biol. 22:565-86

Martin C, Walker J, Rothnie A, Callaghan R (2003) The expression of P-glycoprotein does influence the distribution of novel fluorescent compounds in solid tumour models. Br. J. Cancer 89:1581-9

Olive PL, Durand RE (1994) Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. Cancer Metastasis Rev. 13:121-38

Peters R, Kubitscheck U (1999) Scanning Microphotolysis: Three-Dimensional Diffusion Measurement and Optical Single-Transporter Recording. Methods 18:508-517

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999) Transient and Long-Lasting Openings of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Can Be Monitored Directly in Intact Cells by Changes in Mitochondrial Calcein Fluorescence. Biophys. J. 76:725-734

Reits EA, Neefjes JJ (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. Nat. Cell Biol. 3:E145-7

Salmon ED, Leslie RJ, Saxton WM, Karow ML, McIntosh JR (1984) Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. J. Cell Biol. 99:2165-74

Santini MT, Rainaldi G (1999) Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. Pathobiology 67:148-57

Soroceanu L, Manning TJ, Jr., Sontheimer H (2001) Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. Glia 33:107-17

Wade MH, Trosko JE, Schindler M (1986) A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. Science 232:525-8

Walter E, and Pronzato L (1997) Identification of Parametric Models from experimental data. . Springer-Verlag, Masson, Berlin-Heidelberg

Wartenberg M, Acker H (1995) Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy. Micron 26:395-404

Wedekind P, Kubitscheck U, Peters R (1994) Scanning microphotolysis: a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging. J. Microsc. 176:23-33

Wentlandt K, Samoilova M, Carlen PL, El Beheiry H (2006) General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices. Anesth. Analg. 102:1692-8

Young PC, and Jakeman AJ (1980) Refined instrumental variable methods of time-series analysis: Part III, extensions. Int. J. Cont. 31:761-764

IV.3 COMPARAISON DE LA FONCTIONNALITE DES JONCTIONS *GAP* DE LA VESSIE SAINE ET TUMORALE CHEZ LE RAT PAR LA TECHNIQUE DE GAP-FRAP

Dans cette dernière partie, nous avons étudié la faisabilité de transposer la technique de *gap*-FRAP sur un tissu *ex vivo*. Pour atteindre cet objectif, le choix de l'organe à étudier s'est fait selon trois critères :

- Pouvoir récupérer un organe entier afin de limiter l'invasivité liée au prélèvement tissulaire ;
- Choisir un tissu semi-transparent et fin pour permettre son analyse par microscopie confocale ;
- Et, se caractériser par une communication *gap* jonctionnelle positive (Haefliger *et al.*, 2002).

La technique de *scrape loading* avait déjà mis en évidence une communication intercellulaire *gap* jonctionnelle pour l'urothélium de la vessie ouverte après cystectomie mais l'estimation de la fonctionnalité des jonctions *gap* avait été faite après fixation des tissus (Haefliger *et al.*, 2002). Nos objectifs étaient de quantifier la fonctionnalité des jonctions *gap* par la technique de *gap*-FRAP dans **l'organe entier *ex vivo*** et, de comparer les capacités de recouvrement de fluorescence dans un tissu sain et néoplasique pour évaluer le potentiel de la technique pour afin de **discriminer des tissus *in vivo***.

Notre choix s'est porté sur la vessie de rat avec une analyse de la fonctionnalité des jonctions communicantes sur un urothélium sain mais aussi, pour des tumeurs orthotopiques syngéniques sept jours suivant l'instillation intravésicale de cellules de carcinome transitionnel papillaire (AY27), modèle déjà développé pour des études thérapeutiques dans notre laboratoire.

Les cellules ont été marquées pour la première fois avec une sonde *cell tracker*, le SP-DiI. L'utilisation de cette sonde, décrite dans la littérature pour le *tracking* de cellules souches et cellules endothéliales *in vivo* (Kahler *et al.*, 2007, Studeny *et al.*, 2002), a été optimisée pour la visualisation par fluorescence des zones tumorales dans la vessie, une semaine suivant l'induction. La spécificité de la sonde pour le tissu tumoral *in vivo* a été démontrée par la colocalisation des zones fluorescentes avec les zones cancéreuses observées par HES (*Hematoxylin Eosin Staining*) ainsi que par le maintien du ratio 1 : 1, étudié par cytométrie en

flux, plusieurs jours après la coculture *in vitro* de cellules AY27 non marquées et, marquées avec le SP-DiI.

Pour les cellules AY27 cultivées *in vitro,* la distribution des Cx26 s'est révélée principalement cytoplasmique, et le marquage des Cx43 non significatif, suggérant l'absence de communication intercellulaire confirmée ensuite par la technique de *gap*-FRAP.

Le SYTO 17, déjà décrit dans la littérature (Koenig *et al.*, 2003), a été sélectionné pour l'identification histologique de l'urothélium par rapport aux autres couches. Le marquage *in vivo* avec l'utilisation conjointe de la calcéine-AM (2 µM) et du SYTO 17 (10 µM) a été optimisé pour une instillation intravésicale pendant 1 heure. L'étude a permis de mettre en évidence pour la calcéine, un marquage hétérogène dans la vessie saine et plus intense dans les zones tumorales.

L'utilisation des paramètres discriminants pour un modèle 3-D décrits dans la partie **IV.2** a montré une communication intercellulaire significativement plus élevée par la technique de *gap*-FRAP pour le tissu sain k = 0,64 comparée au tissu tumoral k = 0,33. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour le T_1 contrairement au T_2 (constantes de temps qui définissent le recouvrement de fluorescence) plus élevé pour la tumeur.

En parallèle, la distribution des Cx26 et des Cx43, étudiée par immunohistochimie, s'est révélée principalement membranaire pour l'urothélium sain tandis qu'un marquage diffus avec une distribution cytoplasmique accompagnée de localisations membranaires hétérogénes a été mis en évidence pour les zones tumorales.

Cette étude a conforté l'intérêt de l'approche *gap*-FRAP pour distinguer des tissus ayant un systéme de communication intercellulaire différente. Une application potentielle de la technique pour le diagnostic du cancer de la vessie doit être approfondie. L'évaluation de son utilisation combinée avec la cystoscopie de fluorescence est une étape ultérieure.

Cette étude est actuellement soumise à publication. Elle est présentée dans les pages suivantes sous forme d'article.

GAP JUNCTIONAL COMMUNICATION CAPACITY IN AN ORTHOTOPIC RAT BLADDER TUMOR MODEL AFTER INTRAVESICAL INSTILLATION BY GAP-FRAP TECHNIQUE

Muriel Abbaci[1,2,3], Muriel Barberi-Heyob[2,3*], Saoussen Berrahmoune[2,3], François Plénat[5], Thierry Bastogne[2], Dominique Dumas[1,4], Walter Blondel[1,2], François Guillemin[1,2,3]and Jacques Didelon[3]

[1] Faculté de Médecine, Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France

[2] Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy

[3] Centre Alexis Vautrin, Nancy-University

[4] LEMTA, Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire-Service Imagerie Cellulaire, Nancy University, Faculté de médecine, Vandœuvre-lès-Nancy

[5] Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire, Nancy University, Faculté de Médecine

*Correspondence to: Muriel Barberi-Heyob, Laboratoire du Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy Université, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, Brabois F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy.

Fax.: 33 3 83 59 83 78. E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Abstract

Many reports have suggested that altered gap junctional intercellular communication (GJIC) capacity may give a growth advantage to malignant cells in rat bladder carcinogenesis. We previously demonstrated the interest of the gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching applied to cells connected through gap junctions) approach to quantify modifications in the functionality of gap junctions in a multicellular 3-dimensional model. GJIC in normal urothelium and in an orthotopic rat bladder tumor model (instillation of AY-27, rat bladder transitional cell carcinoma) was studied *ex vivo* using the gap-FRAP technique in confocal microscopy. Normal and preconditioned urothelium expressed connexins (Cxs) at the cell-cell contact sites. On the contrary, Cxs were exclusively expressed in the cytoplasm of AY-27 cells suggesting the absence of GJIC confirmed by gap-FRAP results *in vitro,* whereas eight days post-instillation, transitional cell carcinoma showed a discontinuous staining of Cxs in membrane.

A simultaneous multi-color staining was realized using a fluorescent dye (SP-DiI) to track tumors cells in the bladder *ex vivo* (SP-DiI was not transferred to unlabelled neighboring cells *in vitro*), a fluorescent marker (SYTO 17) to discriminate cell types in the entire organ, and calcein acetoxymethylester to assess GJIC by the gap-FRAP technique. A statistically significant difference in gap junctional communication was observed between normal urothelium and transitional cell carcinoma of the rat bladder. This study reveals the interest of gap-FRAP to differentiate the functionality of GJIC between normal urothelium and transitional cell carcinoma in rat bladder *ex vivo*.

Key words: gap-FRAP, connexins, confocal microscopy, transitional cell carcinoma, rat bladder

INTRODUCTION

Bladder cancer is the second most common urologic malignancy.[1] More than 75% of patient with this disease are diagnosed with a superficial cancer that is confined to the mucosal and submucosal layers at the time of the initial evaluation.[2] Analysis, urine cytology and white light cystoscopy are well accepted as usual methods for detecting bladder cancer.[2] Transitional cell carcinoma of the bladder, which is limited to the *lamina propria* or superficial in 80% of the cases, is characterized by a high recurrence rate up to 70% in the three years following the first treatment. Of current interest is the development of new fluorescence detection methods for bladder cancer. Fluorescence cystoscopy aims at improving the visual contrast between tumor and normal tissue in order to obtain a precise mapping of the diseased bladder.[3-5] By fluorescence cystoscopy, Schmidbauer *et al.* showed promising improvement in the detection of rat bladder cancer and carcinoma *in situ.*[6] One limitation of fluorescence diagnosis is the variable specificity (33-71%).[7]

Gap junction channels provide direct intercellular communication. A relation between impairment of intercellular communication and the process of carcinogenesis seems to exist.[8, 9] Indeed, the majority of malignant cells are characterized by a decrease or, more rarely, an increase of the number and functionality of gap junctions, compared to their healthy counterparts.[10, 11] The great number of *in vitro* and *in vivo* data which has been accumulated illustrates that gap junctional intercellular communication (GJIC) is frequently modified in cancer cells whatever their tissue and species origins.[12] The juxtaposition of two half channels, called connexons, constitutes a gap junction.[13] Each connexon is inserted into the cytoplasmic membrane and is made of six protein sub-units called connexins (Cx). The family of the Cx is composed of 21 types of proteins classified according to their molecular weight.[14] The flux of molecules through these channels includes the passive diffusion of small (< 1.0

kDa) and hydrophilic molecules, such as metabolites (*e.g.* ATP), nutrients (*e.g.* glucose), and secondary messengers (*e.g.* triphosphate inositol, ionic coupling, and Ca^{2+}).[15]

Expression of Cx proteins was detected in rat bladder carcinomas[16] and was correlated with tumorigenicity, giving evidence that altered GJIC capacity and/or increased Cx expression may give a growth advantage to malignant cells in rat bladder carcinogenesis.[11] Gap junctions were identified in cell layers of transitional urothelium in rat bladder[17] and Cx26, Cx32 and Cx43 expressions were observed in unequal levels in normal and malignant urothelium from human and rat bladder.[18, 19]

We recently described the advantages and the limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of GJIC such as fluorescent dye transfer techniques and other methods *in vitro* and *in vivo*.[20] Scrape loading on opened rat bladder was achieved successfully with GJIC estimation after tissue fixation.[21] In this approach, cells are scraped or scratched in the presence of a gap junction permeable tracer, which becomes incorporated by cells along the scrape. However, this method is not particularly well-suited for three-dimensional (3-D) systems because this invasive method may introduce uncertainties in quantifying dye transfer rates due to variations in cell-staining intensity after scrape loading.[20] Compared to scrape loading, the gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching applied to cells interconnected through gap junctions) technique is known as a non invasive and accurate quantitative technique. It enlarges the FRAP technique to study the functionality of GJIC channels.[22] In the case of gap-FRAP technique, the size, the chemical and biophysical properties of the fluorescent molecules define the communication capacity, allowing to quantify this functionality even if the tracers have no metabolic role.[22] A fluorescent diffusion tracer is first introduced at uniform concentration into all the cells in a tissue culture dish, and a concentration gradient is created by photobleaching the fluorescence in one cell. If the bleached cell communicates with neighbor cells by means of functional gap junction

channels, relaxation of this concentration gradient is detected by monitoring the fluorescence signal, using low-intensity excitation. Our group has used the gap-FRAP technique to compare fluorescence recovery parameters after photobleaching in cell types characterized by different patterns of phosphorylated Cx43, leading to different GJIC capacities, comparing CFDA and calcein-AM. We demonstrated that calcein-AM seemed appropriate to allow a discrimination in short time experiments and to assess a rate of transfer not limited to one targeted cell but to a targeted surface in tissue analysis.[23] A systems-engineering model was also developed to evaluate pertinent output variables for characterizing the functionality of GJIC in a multicellular 3-D model.[24] This model, which is based on differential equations, gives insight into diffusion phenomena taking into account the contribution of the peripheral zones to the photobleached area and shows its discriminative capacity according to the functionality of GJIC.[24]

The objective of the present study is to quantify and compare GJIC between normal urothelium and an orthotopic rat bladder tumor model after instillation of AY-27 cells. Simultaneously with gap-FRAP analysis, we are able to track very efficiently infiltrative tumor cells in an entire bladder *ex vivo* and to distinguish cellular details of the urothelium. For the first time, we optimized the use of the gap-FRAP technique on an entire organ *ex vivo* by confocal laser scanning microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Culture media and additives were obtained from life technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except for foetal calf serum (FCS), which was obtained from Costar. SP-DiI and SYTO 17 were obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

and calcein acetoxymethylester (AM) from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Anti-Cx43 and anti-Cx26 rabbit polyclonal antibodies (71-0700, 71-0500) were provided from Zymed Laboratories Inc (Clinisciences, Montrouge, France). FITC-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin serum was purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

Cancer cell lines

The tumor cell line (AY-27) derived initially from carcinomas of the urinary bladder induced in female Fischer (F344) rats fed continuously with N-{4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide[25]. This papillary transitional carcinoma AY-27 cell line was primarily established by subcutaneous transplantation and subsequently established in cell culture. The cell line was a generous gift to our laboratory from Drs S.Selman and J.Hampton of the Medical College of Ohio (Toledo, OH).. KB, human head and neck carcinoma cell line was obtained from Pr. A. Hanauske as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. Cancer cells were grown in 75 cm^2 plastic tissue culture flasks containing RPMI 1640 complemented with 9% of FCS, 1% of L-Glutamine and 1% of penicilline/streptomycine in a 37°C, 5% CO_2 atmosphere.

*Bladder cancer cells labelling with the fluorescent dye SP-DiI (*CellTracker™*)*

The fluorescent dye SP-DiI (Dil derivative for long-term cellular labelling) (Molecular Probes™, Invitrogen) was dissolved in dimethylformamide to the concentration of 2.5 mg/mL. SP-DiI dye was then added directly to culture medium to a final concentration of 10µg/mL. It has an optical absorption maximum at 556 nm with peak emission at 573 nm. After 5 days of culture, AY-27 cells were incubated with 15 ml of medium with SP-DiI in 75

cm^2 plastic tissue culture flasks for 48 h. Then cells were washed with PBS incubated with dye free medium for 4 h and used for *in vivo* and *in vitro* experiments.[26]

Tumor cell implantation

Female Fischer 344 (F344) rats weighting (150-180 g) were purchased from Harlan, laboratories (Gannat, France). Animal care and studies were performed according to the European convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, EU directives and The Law on Statute on Animal Experiments in France. All experimental protocols were approved by the Committee for Care and use of Animals in Experiments at the University of Nancy. Rats (2-3/cage) were maintained in standard cages in isolators. Animals were housed with 12-hour light/dark cycle at 22-24°C and 50% humidity, and they were administered with the diets and water *ad libitum*.

The orthotopic bladder cancer was previously described by Xiao *et al.*[27] Briefly, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 45 $mg.kg^{-1}$ of sodium pentobarbital (Sanofi, France) and body temperature was maintained with thermostatic blanket during experiments. The rats bladders were catheterized with 14G intravenous cannula (TERUMO, Surflo). Epithelial desquamation was performed using intravesical instillation of 0.5 mL HCl (0.1N) during 15 secondes, and neutralized with 0.5 mL of NaOH (0.1N). Bladders were washed and a bladder cell suspension, AY-27 loaded with the fluorescent dye SP-DiI (0.5 mL containing 10^6 cells) was instilled intravesically for one hour. Gap-FRAP experiments were carried out 8 days after the implantation of tumor cells. At that time, gross tumor could be distinguished by direct vision but remaining areas of normal mucosa were still there.

For histological examination, bladders were fixed in an acetone-formaldehyde-alcohol solution, embedded in paraffin, serially sectioned at 5 µm. Slides were heated in an incubator at 38°C for a night and then deparaffinized in toluene and hydrated in graded ethanol. After

fluorescence SP-DiI observation, slides were stained with Haematoxyin-Eosin (H&E) for histological examination.

Localization of Cx43 and Cx26 expression by immunocytochemistry

For the AY-27 cell line, we performed immunocytochemical analysis for determine the staining localization of Cx43 and Cx26 forms at confluent monolayer culture. Cells were plated on 8-well glass chamber slides (Nunc, Dominique Dutsher, France) at 3.10^4 cells/mL. After fixation in 5% paraformaldehyde, the cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (15 min, room temperature for the two stages). Cells were blocked for 30 minutes in phosphate buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumine (BSA) and then, incubated with (1:50) dilution of anti-Cx43 rabbit polyclonal antibody or (1:100) anti-Cx26 rabbit polyclonal antibody in overnight incubation at 4°C, followed by Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:50). Control slides were processed identically with BSA replacing the primary antibody. Cells were visualized with a Leica confocal microscope system (SP2-AOBS Leica, TCS SP2-AOBS, Germany).

For bladder tissue, the organ was rapidly excised, embedded in tissue freezing medium and quickly frozen. Samples were cryostat-sectioned into 5 µm thick slices and processed for H&E staining or immunohistochemistry. The slides were fixed with formol (3%) and blocked with 1% BSA for 1 hour at room temperature. They were then sequentially incubated at 4°C for a night with (1:200) anti-Cx43 rabbit polyclonal antibody or (1:800) anti-Cx26 rabbit polyclonal antibody in PBS containing 5% Rabbit serum and 1% BSA followed by secondary antibody, FITC-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:50) at room temperature for 45 minutes. Preparations were mounted with a fluorescent mounting medium (Dakocytomation,Trappes, France). Sections were visualized with an epifluorescence microscope (Olympus, AX 70, France).

Gap-Fluorescence Recovery After Photobleaching (gap-FRAP) in AY-27 and KB monolayer culture cells

The GJIC was quantitatively assessed in living cells by gap-FRAP assay as previously described.[23] Briefly, cells were plated on 8-well glass chamber slides at 3.10^4 cells/mL, 72 hours before performed FRAP experiments. The stock solution of calcein-AM was prepared in dry dimethyl sulfoxide (DMSO) at 2 mM and protected from light. The cells were loaded for 30 minutes at 0.5 µM with calcein-AM at 37°C. The dye was retained due to the hydrolysis by cytoplasmic esterases into calcein (excitation/emission maxima at 494/517 nm) inside the cells. As a result of its low molecular weight (622 Da), the dye has been shown to permeate gap junction channels.[28] After the loading process, the cell culture slides were washed several times with RPMI medium to remove the fluorochrome-ester and prevent further dye loading during subsequent measurements.

FRAP was achieved using a confocal laser scanning microscope, constituted by an inverted microscope equipped with an argon ion laser source operating at 488 nm. The intensity of the fluorescence signal was measured between 500 and 560 nm with an objective 10X (dry/0.8NA) and numerical zoom 2X. The laser output power was adjusted to 30 seconds for prebleaching period then during 25 seconds to achieve a sufficient photobleaching for fluorescence recovery observations without causing visible damage. Fluorescence recovery analysis was performed every 15 seconds for 900 seconds.

In vitro fluorescence labelling of AY-27

SP-DiI-labelled AY-27 cells were placed on 8-well glass chamber slides at $1x10^4$ cells/mL. Four days and 8 days after culture, AY-27 were loaded 30 minutes with SYTO-17 and calcein-AM at 10 and 0.5 µM, respectively. Morphology and fluorescence intensities were

assessed using confocal microscope with the following laser lines : calcein (excitation wavelength λ_{ex}= 488 nm; emission wavelength λ_{em}=500-550 nm), SP-DiI (λ_{ex}=543 nm; λ_{em}=555-600 nm), SYTO-17 (λ_{ex} =633 nm, λ_{em}= 645-690 nm). Fluorescent signals, obtained from the three dyes, were measured sequentially to avoid overlapping emission signals with confocal microscope.

Coculture of AY-27 labelled with SP-DiI to measure cell-cell transfer

The fluorescence intensities of labelled and unlabelled AY-27 cells was measured using flow cytometry technique (FACSCalibur, BD Biosciences) in order to check the absence of dye transfer from labelled cells. Briefly, labelled and non labelled tumor cells were cocultured at ratio 1:1, trypsinized after 4 days and subjected to flow cytometer analysis (λ_{ex}= 488 nm; λ_{em}= 585±42 nm; fluorescence intensity).

Fluorescent dyes preparation and intravesical administration

As previously presented by Koenig *et al.*, cellular details of the entire urothelium can be observed with SYTO 17 using confocal scanning microscope.[29] The fluorescent dye was freshly diluted in sodium chloride 0.9% to a final concentration of 10 µM. Calcein-AM stock solution was freshly diluted to 1:1 000 ($^{v}/_{v}$) with sodium chloride 0.9% to obtain a final concentration 2 µM. Animals were anesthetized and catheterized as previously described. 0.5 mL of calcein-AM and SYTO 17 were administered intravesically in normal or tumor bearing rat bladders for 1 hour before measurements.

Gap-FRAP technique ex vivo

After fluorescent dyes intravesical administration, the animals were euthanized, the bladder was inflated and a cystectomy was performed. The organ was opened using a scalpel

blade with urothelium objective side. Acquisitions were achieved using a confocal laser scanning microscope as previously described. Fluorescence imaging was performed using 633 nm excitation light for SYTO-17 to determine the depth of the focal plane of the urothelium and subsequentially using 543 nm light in order to avoid cross-talk between the fluorescence of SP-DiI and calcein. FRAP was achieved with an argon laser source operating at 488 nm. The intensity of calcein fluorescence signal was measured between 500 and 550 nm with an objective 40X (water/0.8NA). The laser output power was adjusted to 10 seconds during the prebleaching period and then to full power during 15 iterations to achieve a sufficient photobleaching for fluorescence recovery observations. The Fluorescence recovery was monitored every 5 seconds for 50 seconds followed by every 10 seconds for 200 seconds.

Gap-FRAP analysis

For each experiment, a reference area was defined for measuring the photodegradation caused by the successive acquisitions and the leakage of the fluorescent dye. The recovery kinetics processing was divided into several steps. Firstly, a value of 1 was assigned to the intensity of the fluorescence measured before the photobleaching period and served as the reference value to express the recovery of fluorescence. For each time point, the fluorescence intensity value measured on a targeted area was divided by the intensity value of a reference area at the edge of the microscopic field. Since the reference area is unaffected by the laser bleach, this ratio allowed us to correct for artifactual changes in fluorescence intensity due primarily to photobleaching caused by exposure of the whole field to the excitation light source.[23] These ratios were normalized and plotted as a function of time to display fluorescence recovery curves.

For the bladder *ex vivo*, we previously described a systems-engineering model to analyze accurately fluorescent dye diffusion through gap junctions in a 3-dimensional

multicellular model.[24] The latter was derived from a macroscopic modeling in which concentric compartments of the studied cell population were described by a hydraulic system composed of interconnected tanks. The two connections between the tanks symbolized the exchange of calcein through the gap junctions at the frontier between two adjacent compartments. In this analogy, fluorescence intensities in the compartments were compared to level of calcein in the fictitious tanks. It was assumed that the calcein flows between the tanks were laminar, the leak outflows proportional to the mean level of calcein (y_i and y_m) in the tanks T_m and T and the flow of the dye by passive diffusion also contributed to fluorescence recovery. Based on these assumptions and according to fluid mechanics laws, y_i and y_m obey to:

$$\begin{aligned} A_i \frac{dy_i}{dt} &= \alpha_{mi}\left(y_m(t) - y_i(t)\right) - \alpha_i y_i(t) \\ A_m \frac{dy_m}{dt} &= \alpha_{xm}\left(y_x(t) - y_m(t)\right) - \alpha_{mi}\left(y_m(t) - y_i(t)\right) - \alpha_m y_m(t) \end{aligned} \qquad (1)$$

with $y_i(0) = 0$ and $y_m(0) = y_{m0}$ as initial conditions. α_{xm} and α_{mi} are flow coefficients of the gap junctions, and α_m and α_i of the leak out. Parameters A_i and A_m are the cross-sectional areas of the tanks associated with the internal and middle compartments, respectively. In practice, A_i and A_m were estimated as the number of pixels associated with cancer cells for each compartment. The input variable (explanatory variable) is y_x while y_i characterizes the output variable (variable to be explained). The relationship between y_x and y_i was obtained by removing the state variable y_m from *(1)* after substitution:

$$(1 + T_1 p)(1 + T_2 p) \cdot y_i(t) = k \cdot y_x(t) + c \cdot y_{m0} \qquad (2)$$

where T_1 and T_2 are two time constants and k, the static gain. p denotes the time differentiation operator defined by $p \cdot y(t) = dy/dt$. c is a constant and $y_{m0} = y_m(0)$. k, T_1 and T_2 are aggregate parameters of the flow coefficients α_{xm}, α_{mi}, α_m and α_i. k expresses the

fluorescence recovery yield at steady state. The lumped parameter model described in *(2)*, was implemented in Matlab™ (Mathworks Inc.).

Macroscopic observation of calcein distribution in entire bladder ex vivo

After intravesical administration of calcein-AM at 2 µM, animals with bladder tumor 10 days post-induction were euthanized. The bladder was inflated and a cystectomy was performed. The fluorescence distribution was examined in the inflated bladder with oxygen using Olympus macroscope (MVX10 Olympus, France).

RESULTS

Connexin expression and functionality of GJIC in AY-27 monolayer culture cells

A cytoplasmic staining was found for Cx26 expression associated with a very low Cx43 expression (Fig. 1) in AY-27 cells. As we previously reported, KB cells were used as positive control for Cx43 expression and also for GJIC functionality.[23] The established AY-27 rat bladder transitional cell carcinoma cell line was characterized by the absence of fluorescence recovery after photobleaching (Fig. 1c), indicating that these cells did not possess functional gap junctions in relation with their cytoplasmic Cxs localization *in vitro*.

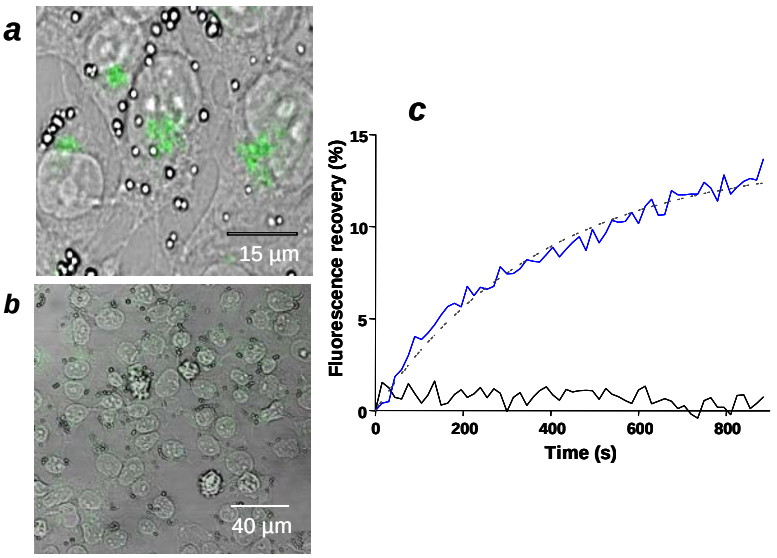

FIGURE 1 - Cell distribution of Cx proteins by immunocytochemistry and typical kinetics of fluorescence recovery after photobleaching by the gap-FRAP technique in confluent AY-27 cells. (*a*) Cx26 and (*b*) Cx43 expression. Overlapping of transmitted light and fluorescence images. For immunofluorescence staining and gap-FRAP technique see under *Materials & Methods*. (*c*) Fluorescence recovery curves with calcein-AM (0.5 µM) for AY-27 (in black) and KB cells used as positive control[23] (in blue) with monoexponential fitting (dotted line).

Characteristics of the tumor model

The orthotopic rat bladder transitional cell tumor model was described and characterized by Xiao *et al.*[27] This model is highly reproducible and ideal for preclinical studies on experimental intravesical approaches. After the labelling with the fluorescent cell tracker SP-DiI, tumor cells were implanted by intravesical instillation. After induction, the normal urothelium was still distinguishable, including superficial umbrella and intermediate and basal cells (Fig. 2a). Nevertheless, to facilitate tumor seeding, the bladder mucosa was conditioned with an acid rinse, leading to hyperplasia post-instillation (Fig. 2b) throughout the entire bladder. Generalized tumor cell administration (global tumor instillation) resulted in multiple superficial tumors[30] localized owing to the specific fluorescence staining for SP-DiI dye detected exclusively in tumor area (Fig. 2c, d). A positive signal can be also observed in deeper areas corresponding to infiltrated labelled AY-27 cells.

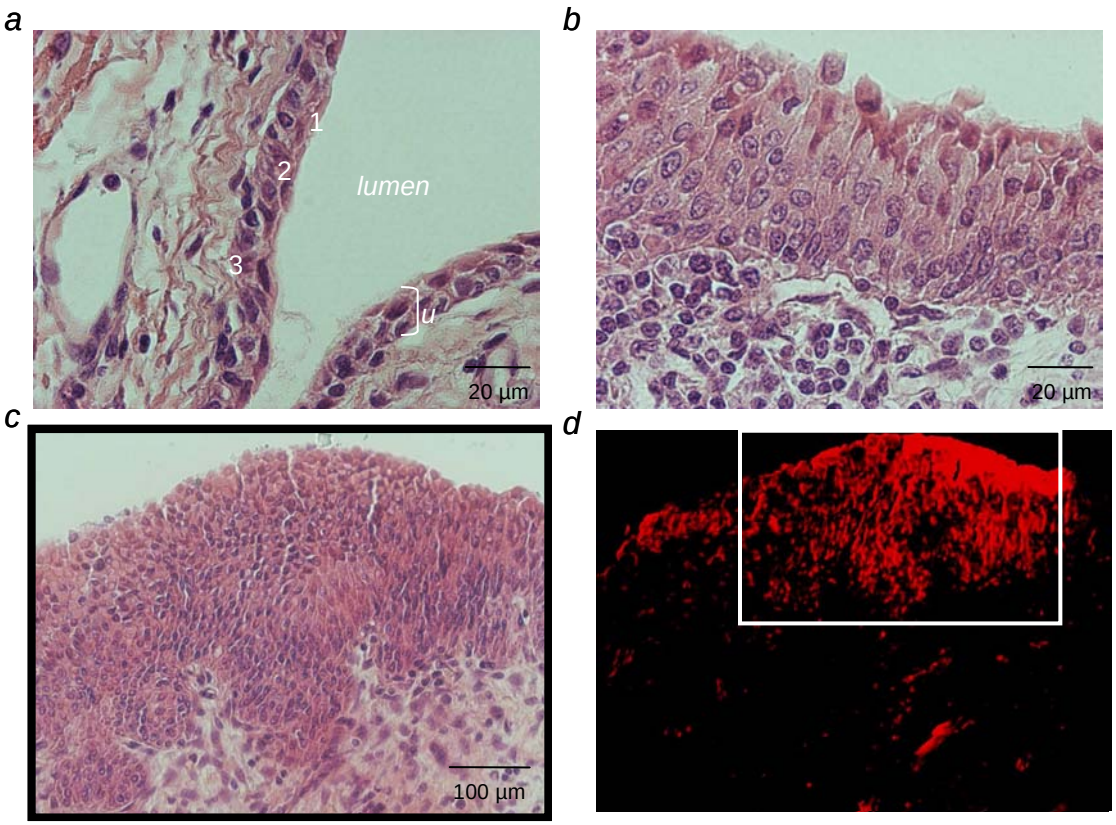

FIGURE 2 - (*a*) Histologic section of the rat bladder showing the normal urothelium with *(1)* umbrella cells; *(2)* intermediate cells; *(3)* basal cells. (*b*) Histologic sections of the bladder eight days after AY-27 tumor induction showing hyperplasia and (*c*) transitional cell carcinoma. (*d*) Fluorescence microscopy image of the tumor with the SP-DiI staining in red (white rectangle) for the corresponding specimen (black rectangle in *c*).

Localization of fluorescent dyes in vitro and ex vivo

In vitro, an intense labelling was observed four days after loading AY-27 cells with SP-DiI (Fig. 3a). As the fluorescent dye distributed equally between the daughter cells after each mitosis cycle, the fluorescence intensity decreased progressively as shown eight days post-labelling (Fig. 3b). Calcein-AM and SYTO-17 stainings were not altered or limited by the DiI derivative (Fig. 3c). Labelled and non-labelled papillary transitional carcinoma cells were placed in a co-culture system during four days under *in vitro* conditions. After four days in co-culture, two populations of cells were clearly distinguished by their fluorescence using flow cytometry (Fig. 3d). No transfer of the fluorescent dye was observed from labelled to

unlabelled cells, confirming the specificity of SP-DiI as a cell tracker for *in vivo* experiments. SP-DiI was not transferred to neighboring cells since the dye is tightly bound to cellular membranes.[26, 31]

Ex vivo, as expected no SP-DiI fluorescence was identified (Fig. 4b) in healthy urothelium and an intense but heterogeneous staining of calcein was observed (Fig. 4d). Eight days post-AY-27 cells instillation, tumor areas in bladder *ex vivo* were clearly distinguished through the entire urothelium (Fig. 4f). Fluorescent dye instillation provided more intense accumulation of calcein-AM in tumor tissue compared to healthy urothelium. A relationship was observed between the intensity of calcein staining and SP-DiI cellular distribution (Fig. 4h) whereas an homogeneous staining of SYTO-17 was observed independently of urothelium layers or cancerous tissue as shown Fig. 4g between basal cells and AY-27 cells.

A gross view of an inflated bladder was shown tens days after calcein-AM instillation (Fig. 5a). The macroscopic observation validated that calcein-AM appeared preferentially accumulated into the tumor tissue. Nevertheless, a vesiculisation of the dye appeared two hours after the cystectomy (Fig. 5b).

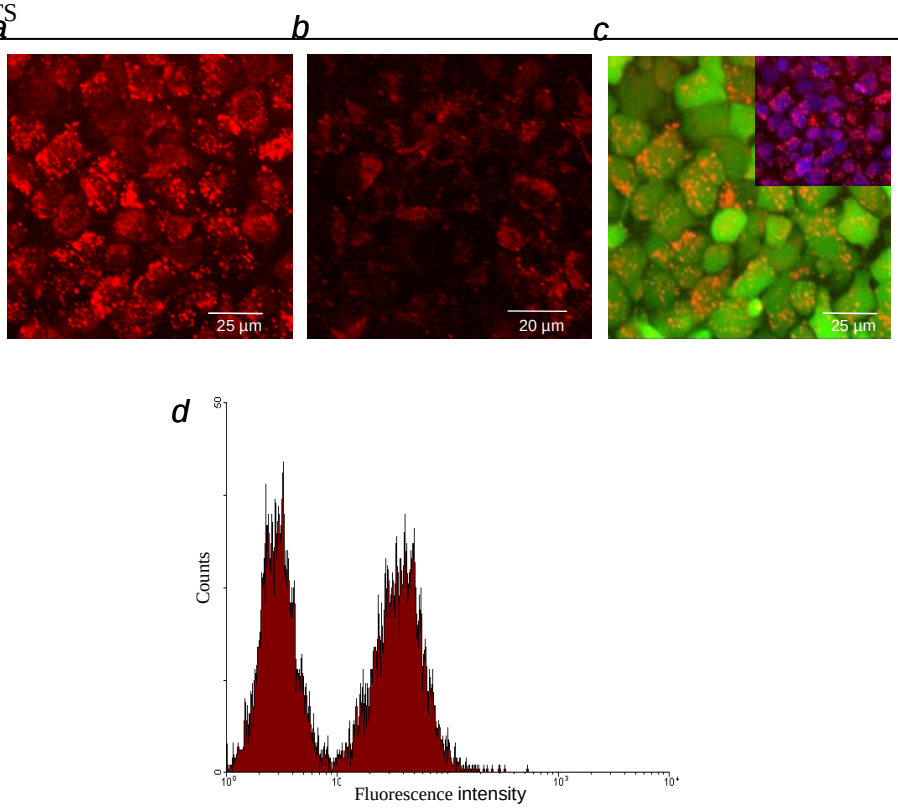

FIGURE 3 - Multi-color fluorescent staining *in vitro* using a fluorescent dye (CellTracker™, SP-DiI) to track to AY-27 tumors cells, a fluorescent marker (SYTO 17) to distinguish cellular details of the entire urothelium and calcein-AM to assess GJIC by gap-FRAP. (*a*) SP-DiI-labelled AY-27 cells four days post-labelling and (*b*) eight days post-labelling (in red). (*c*) No restrictive calcein-AM (in green) and SYTO-17 (inset, in blue) uptake was related. (*d*) Flow cytometry measurement of SP-DiI labelled AY-27 cells four days after coculture with non labelled cells at a ratio of 1:1.

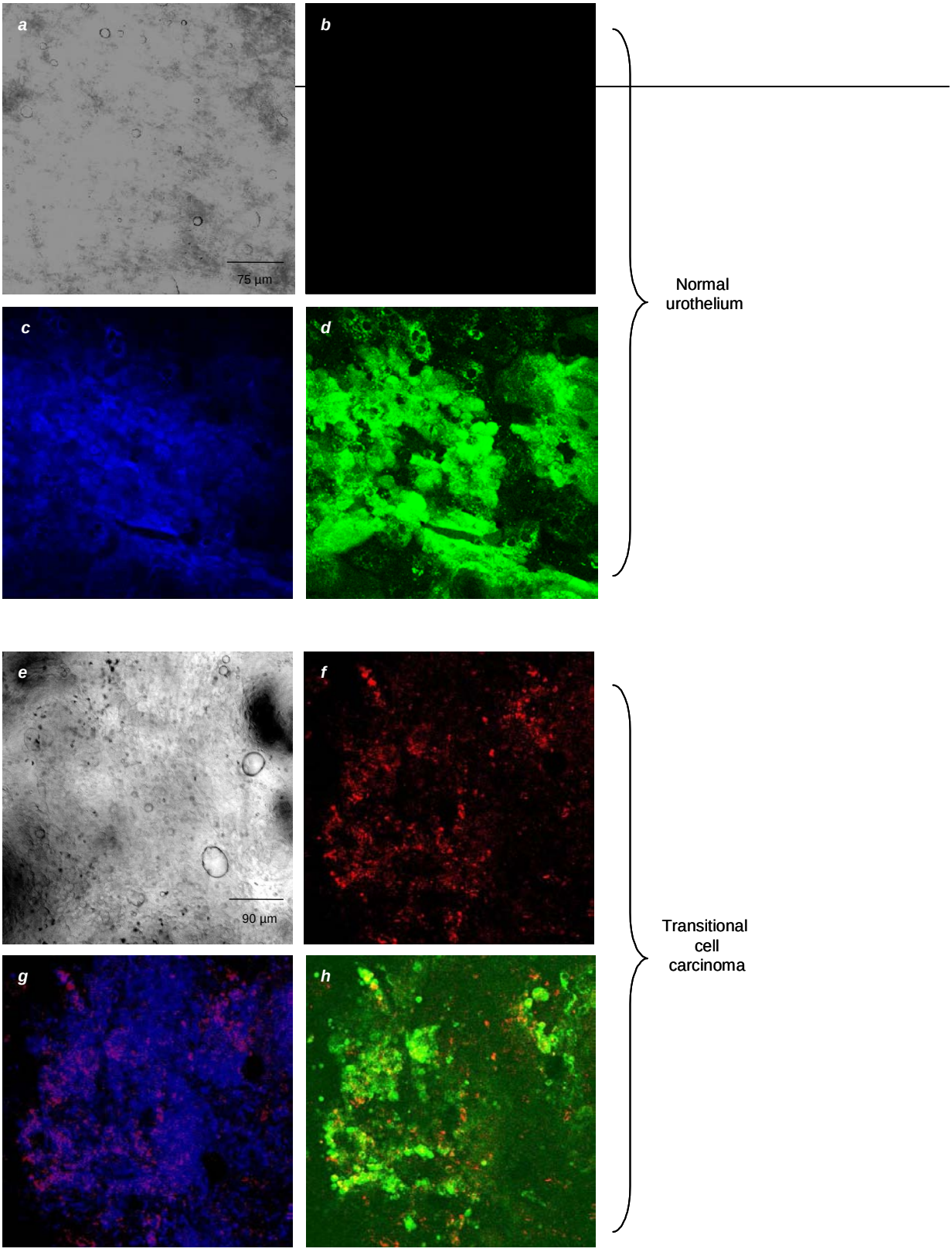

FIGURE 4 - Multi-color fluorescent staining showing normal urothelial cells and an orthotopic rat bladder tumor in a rat bladder *ex vivo* eight days after intravesical instillation. (*a*, *e*) Transmitted light and the corresponding fluorescence images by confocal microscopy: (*f*) multi-color staining was applied using SP-DiI; (*c*, *g*) SYTO 17; (*d*, *h*) calcein-AM. For fluorescent dye preparation and intravesical administration see under *Materials & Methods*. Samples were imaged by confocal microscopy with the following laser characteristics: calcein (λ_{ex}= 488 nm; λ_{em}=500-550 nm); SP-DiI (λ_{ex}=543 nm; λ_{em}=555-600 nm); SYTO 17 (λ_{ex} =633 nm, λ_{em}= 645-690 nm). Yellow color indicates colocalization of SP-DiI and calcein-AM.

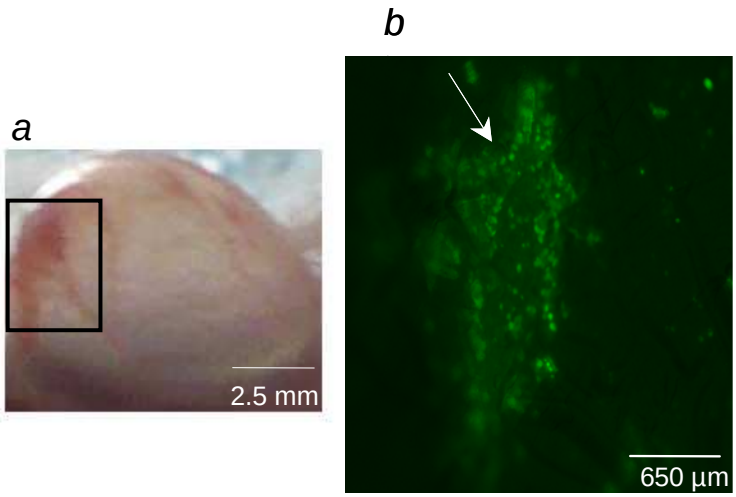

FIGURE 5 - Macroscopic observation of an entire bladder inflated with air. (*a*) Gross view of the bladder tumor ten days post-induction. The opaque solitary tumor area was identified (black rectangle). (*b*) Calcein-AM distribution (2 µM administered intravesically for 1 hour) in tumor tissue observed with the macroscope.

Connexin distribution in vivo

Cxs expression was observed in normal urothelium, preconditioned mucosa and superficial bladder tumor. Cx26 plaques, localized to the cell-cell contact, were detected in normal (Fig. 6a) and preconditioned mucosa (Fig. 6c). Normal urothelium was also found strongly positive in Cx43 expression with an intense cytoplasmic and membrane staining (Fig. 6b, d). Eight days post-instillation, the transitional cell carcinoma showed a heterogeneous staining pattern, predominantly cytoplasmic with few plaques occasionally observed (Fig. 6e, f). Despite the fact that immunohistochemical evaluation gives only semi-quantitative information of Cxs expression, these results indicated clearly a modifed expression of gap junction proteins in this orthotopic rat bladder tumor model compared to AY-27 cells *in vitro*.

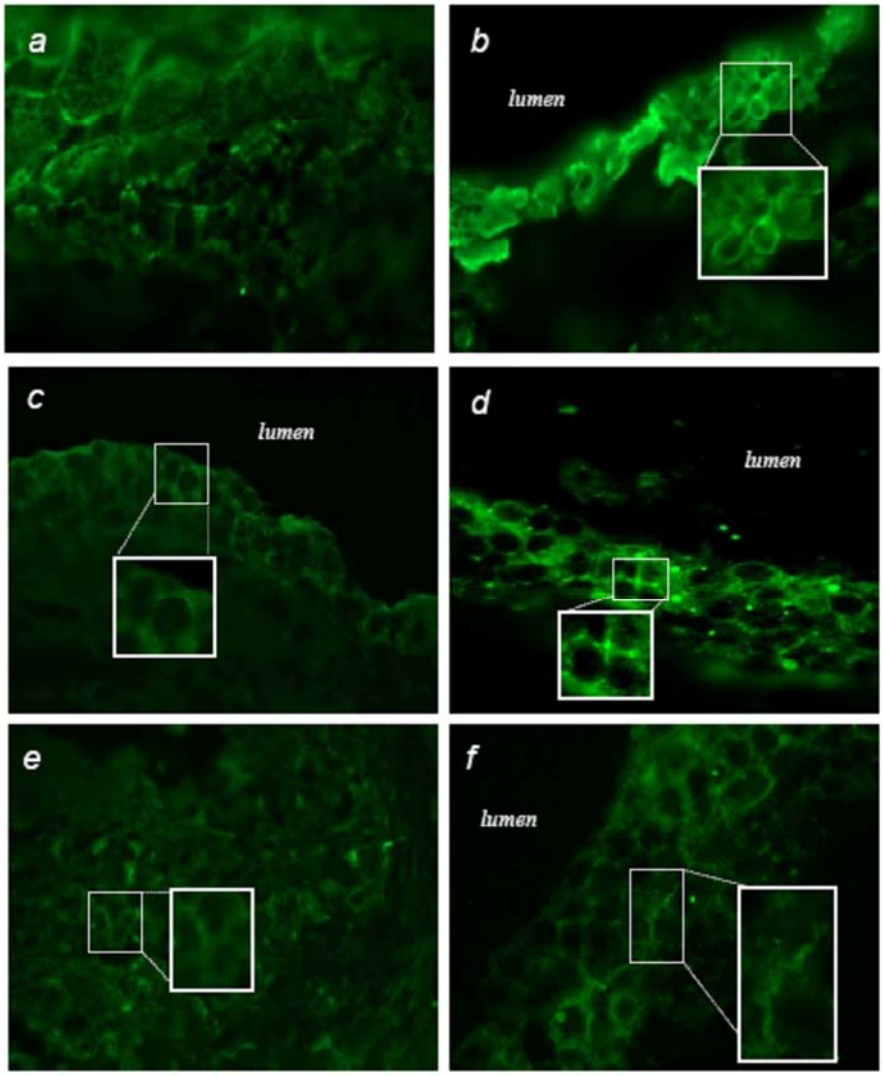

FIGURE 6 - Cell distribution of Cxs in rat bladder by immunohistochemistry. Cx26 (left column) and Cx43 (right column) expression. (*a*, *b*) in normal rat urothelium. (*c*, *d*) in preconditioned urothelium eight days post-treatment. (*e*, *f*) in transitional cell carcinoma eight days post-induction. For immunohistochemistry staining conditions see under *Materials & Methods*. Acquisitions performed with fixed illumination settings.

GJIC urothelium analysis

The entire bladder was inflated, ligatured and excised for gap-FRAP assays. Labelled urothelium was then photobleached by the argon laser beam in an area restricted to the targeted region of interest. Fluorescence recoveries were interpreted as calcein transport across gap junctions. In accordance with the visualized gap junction plaques, the entire urothelium was validated as positive tissue in GJIC functionality (Fig. 7a). On the contrary, in

the tumor tissue eight days post-induction, a very low redistribution of the dye through gap junctions was measured (Fig. 7b). Interestingly, after calcein photobleaching in the region of interest, we observed the remaining red fluorescence corresponding to SP-DiI-positive staining (Fig. 7b).

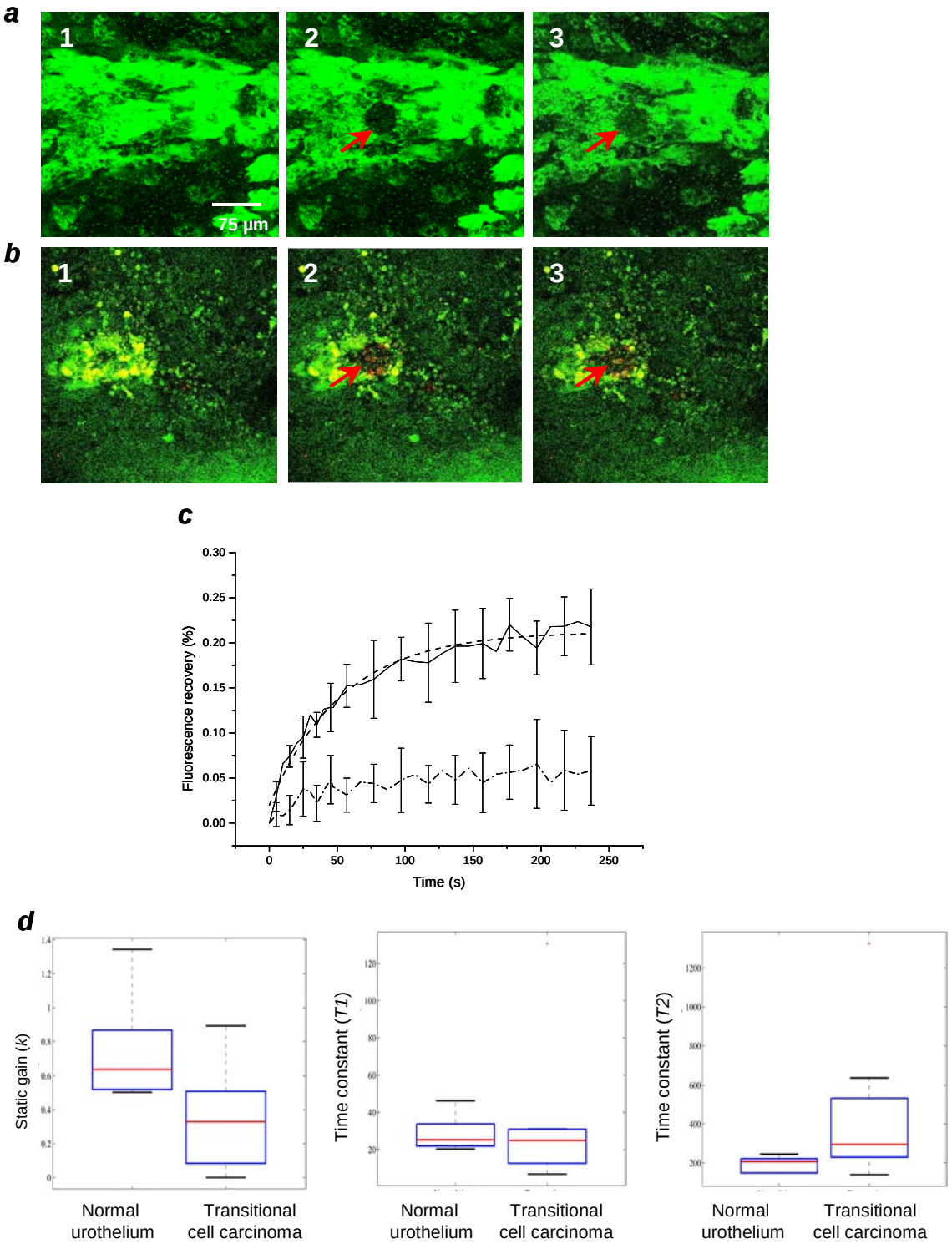

FIGURE 7 - Gap junctional intercellular communication capacity determined using the gap-FRAP technique in rat bladder *ex vivo*. (*a*) Representative images of fluorescence restoration during gap-FRAP in healthy urothelium; (*b*) in SP-DiI-labelled AY-27 tumor cells (in red). Each column introduces the three specific steps; first column shows recordings before photobleaching after calcein-AM exposure (2 µM) by intravesical instillation for 1 hour before measurements (in green); second column, acquisitions just after the photobleaching period and third column, fluorescence recoveries performed every 5 seconds for 50 seconds

followed by every 10 seconds for 200 seconds. The bleached calcein molecules from one targeted region of interest (50 µm) are indicated by a red arrow. Yellow color on merged images indicates colocalization of calcein-AM and SP-DiI. (*c*) Mean fluorescence recovery kinetics for healthy urothelium (n=6, straight line) fitted using a single exponential function[23] (dash line) and SP-DiI-labelled AY-27 tumor cells (n=9, dash dot line). Data points show the mean ± s.d.. (*d*) Boxplots of the estimated parameters between the normal urothelium and the AY-27 orthotopic rat bladder tumor model such as the static gain *k*, two time constants T_1 and T_2. For gap-FRAP analysis see under *Materials & Methods.*

Among the three lumped parameters of the tank model *(2)*, the time-constants and the static gain *k* parameter (*k*) can be considered as suitable discriminators of the functionality of GJIC in a 3-D model.[24] Hence, gap-FRAP results revealed a statistically significant decrease of the static gain in the transitional cell carcinoma (n=9) compared to the healthy urothelium (n=6) (0.329 *versus* 0.639, respectively; $p<0.027$), checking that the fluorescence recovery rates were greater in the normal urothelium than in the AY-27 orthotopic rat bladder tumor model. No significant difference was calculated for *T1* values, however high *T2* time constants characterized also the tumor tissue (Fig. 7d).

DISCUSSION

The use of fluorescence cystoscopy in the diagnosis and management of bladder cancer improves the visual contrast between tumor and normal tissue. Indeed, fluorescence cystoscopy has the potential to identify premalignant lesions and shows promising improvement in the detection of rat bladder cancer and carcinoma *in situ*. However, one major limitation is the variable specificity related to false-positive fluorescence of benign tissue.

This study reveals the interest of the gap-FRAP approach in the diagnosis of bladder cancer. We compared and quantified GJIC between the normal rat urothelium and an orthotopic rat bladder tumor model *ex vivo* using this technique. Normal rat urothelium was validated as positive tissue in GJIC functionality and conversely for the transitional cell carcinoma eight days post-instillation. Nevertheless, to facilitate tumor seeding, the mucosa was pre-treated

with an acid rinse leading to hyperplasia post-induction throughout the entire bladder. An alteration of the gap-junctional communication in the hyperplastic tissue is not excluded. As very often described in the literature, regeneration of the urothelium after pre-treatment was associated with mucosal irregularities, resulting from hyperplastic areas and small inflammatory healings.[32, 33] No qualitative variation of Cxs expression was observed in relation with the inflammatory process for healthy pre-treated urothelium (data not shown). As no specific labelling was used to distinguish the inflammatory process, GJIC results were limited to non pre-treated bladders compared with Sp-DiI tumor areas from treated bladders. According to Chanson *et al.*, gap junctions and Cxs do participate in the inflammatory response[34]. An influence was revealed in response to photodynamic therapy of normal urothelium and bladder wall in healthy and tumor bearing rats after global acid pre-treatment and instillation.[35]

An *in vitro* study comparing human malignant and normal urothelial cells demonstrated a significant decrease of Cx26 mRNA expression and no GJIC in malignant human urothelial cells evaluated by scrape loading.[19] Cx43 mRNA expression was not related to GJIC functionality. The authors suggested that alterations in the regulation of Cx26 expression were associated with and might contribute to the malignant phenotype in bladder cancer.[19] Connexin expression in 40 human bladder tumor and 5 normal urothelial specimens by immunohistochemistry demonstrated an abnormal expression of Cx26 with a decrease in 70% of the cases.[36] The authors suggested that lower expression of Cx26 is an early event in the development of bladder cancer.

As mentioned in the literature, after AY-27 cells intravesical instillation, cancer cells retained all their original characteristics without squamous differentiation.[27] A low protein expression of Cx43 and Cx26 was observed in AY-27 cytosol *in vitro*. Interestingly, AY-27 rat bladder transitional cell carcinoma model showed no intercellular communication by the

gap-FRAP technique contrary to other rat bladder tumor cell lines studied *in vitro* by scrape loading.[11]

The gap-FRAP method gives quantitative information about gap junctional communication. We observed a relationship between the intensity of calcein-AM staining and SP-DiI cellular distribution. Macroscopic observation also validated that calcein-AM preferentially accumulates in the transitional cell carcinoma. As false positive responses with calcein-AM labelling could be detected, this fluorescent dye does not selectively target transitional cell carcinoma. SP-DiI fluorescent dye was previously described to specifically track mesenchymal stem cells premixed with melanoma cells to tumor stroma formation.[26] Kähler *et al.* showed that endothelial progenitor cells, tracked with SP-DiI until 9 days after intravenous injection, participated to re-establish endothelial integrity after lung injury.[37] Tracking cancer cells after SP-DiI labelling is a significant way to distinguish tumor tissue area from urothelium by fluorescence microscopy several days after instillation. To assess the GJIC capacity in the tumor tissue, the region of interest was selected according to fluorescence of the SP-DiI dye. As shown by flow cytometry and by the *in vivo* experiments, red fluorescence originated only from SP-DiI labelled tumor cells. The use of intravesical acid aminolevulinic (ALA) and hexaminolevulinate (HAL) for fluorescence diagnosis of bladder carcinoma lesions is commonly known.[38] ALA and HAL are precursors in the heme biosynthetic pathway, inducing intracellular accumulation of endogenous protoporphyrin IX (PpIX). The fluorescence excitation *spectrum* of PpIX shows five peaks at 408, 510, 543, 583 and 633 nm and emission peaks at 635 and 695 nm.[39] The gap-FRAP technique using calcein-AM might be applied in combination with fluorescence cystoscopy to improve the detection of urothelial carcinoma *in situ*. *In vivo* application of gap-FRAP technique would require a system based on fiber optics, such as endoscopic confocal microscopy or a dedicated spectral analysis system which could be combined with fluorescence endoscopy.[40]

Grant sponsor: This work was supported by the research funds of the French “Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains”.

REFERENCES

1. Joudi FN, Konety BR. Fluorescence cystoscopy and bladder surveillance. Curr Opin Urol 2004;14:265-70.

2. Kitamura H, Tsukamoto T. Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. International Journal of Clinical Oncology 2006;11:28-37.

3. D'Hallewin MA, Bezdetnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. Eur. Urol. 2002;42:417-25.

4. Jichlinski P, Leisinger HJ. Fluorescence Cystoscopy in the Management of Bladder Cancer: A Help for the Urologist! Urol. Int. 2005;74:97-101.

5. Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. Eur. Urol. 2008;53:1138-50.

6. Schmidbauer J, Marberger M. Recent developments in fluorescence cystoscopy: do novel agents bring a benefit? Curr. Opin. Urol. 2007;17:347-51.

7. Kausch I, Doehn C, Jocham D. Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer. Expert Rev. Anticancer Ther. 2006;6:1301-11.

8. Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. Cell. Signal. 2006;18:592-600.

9. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochim. Biophys. Acta 1979;560:1-65.

10. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. Front. Biosci. 1998;3:d208-36.

11. Asamoto M, Takahashi S, Imaida K, Shirai T, Fukushima S. Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis. Carcinogenesis 1994;15:2163-6.

12. Mesnil M, Crespin S, Avanzo J-L, Zaidan-Dagli M-L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 2005;1719:125-45.

13. De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury. J. Cell Physiol. 2002;191:269-82.

14. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol. Chem. 2002;383:725-37.

15. Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. Curr. Med. Chem. 2003;10:2045-58.

16. Pauli BU, Kuettner KE, Weinstein RS. Intercellular junctions in FANFT-induced carcinomas of rat urinary bladder in tissue culture: in situ thin-section, freeze-fracture, and scanning electron microscopy studies. J Microsc 1979;115:271-82.

17. Peter S. The junctional connections between the cells of the urinary bladder in the rat. Cell Tissue Res 1978;187:439-48.

18. Knuechel R, Siebert-Wellnhofer A, Traub O, Dermietzel R. Connexin expression and intercellular communication in two- and three-dimensional in vitro cultures of human bladder carcinoma. Am J Pathol 1996;149:1321-32.

19. Grossman HB, Liebert M, Lee IW, Lee SW. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. Cancer Res. 1994;54:3062-5.

20. Abbaci M, Barberi-Heyob M, Blondel W, Guillemin F, Didelon J. Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. Biotechniques 2008;45:33-52, 6-62.

21. Haefliger JA, Tissieres P, Tawadros T, Formenton A, Beny JL, Nicod P, Frey P, Meda P. Connexins 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction. Exp. Cell Res. 2002;274:216-25.

22. Wade MH, Trosko JE, Schindler M. A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. Science 1986;232:525-8.

23. Abbaci M, Barberi-Heyob M, Stines JR, Blondel W, Dumas D, Guillemin F, Didelon J. Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: a comparative study. Biotechnol. J. 2007;2:50-61.

24. Abbaci M, Bastogne T, Dumas D, Didelon J, Guillemin F, Blondel W, Barberi-Heyob M. A system engineering model to analyze gap-FRAP in a multicellular 3-dimensional model Eur. Biophys. J. 2008:under submission.

25. Cohen SM, Yang JP, Jacobs JB, Arai M, Fukushima S, Friedell GH. Transplantation and cell culture of rat urinary bladder carcinoma. Invest Urol 1981;19:136-41.

26. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon-{beta} Delivery into Tumors. Cancer Res. 2002;62:3603-8.

27. Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, Miller GG, Halls SB, Parney I, Moore RB. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. Br J Cancer 1999;81:638-46.

28. Czyz J, Irmer U, Schulz G, Mindermann A, Hulser DF. Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. Exp. Cell Res. 2000;255:40-6.

29. Koenig F, Knittel J, Schnieder L, George M, Lein M, Schnorr D. Confocal laser scanning microscopy of urinary bladder after intravesical instillation of a fluorescent dye. Urology 2003;62:158-61.

30. D'Hallewin M-A, Berrahmoune S, Bezdetnaya L, Lassalle H-P, Guillemin F. Orthotopic animal models for oncologic photodynamic therapy and photodiagnosis. Photodiag. Photodyn. Ther. 2007;4:230-6.

31. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. Cell 1999;96:25-34.

32. Hendricksen K, Molkenboer-Kuenen J, Oosterwijk E, Hulsbergen-van de Kaa C. , A. WJ. Evaluation of an orthotopic rat bladder urothelial cell carcinoma model by cystoscopy. BJU International 2008;101:889-93.

33. El Khatib S, Berrahmoune S, Leroux A, Bezdetnaya L, Guillemin F, D'Hallewin MA. A novel orthotopic bladder tumor model with predictable localization of a solitary tumor. Cancer Biol Ther 2006;5:1327-31.

34. Chanson M, Derouette J-P, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, Kwak BR. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 2005;1711:197-207.

35. El Khatib S, Didelon J, Leroux A, Bezdetnaya L, Notter D, D'Hallewin M. Kinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of hexylester 5-aminolevulinate induced photodynamic therapy in an orthotopic rat bladder tumor model. J Urol 2004;172:2013-7.

36. Gee J, Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 is Abnormally Expressed in Bladder Cancer. J. Urol. 2003;169:1135-7.

37. Kahler CM, Wechselberger J, Hilbe W, Gschwendtner A, Colleselli D, Niederegger H, Boneberg EM, Spizzo G, Wendel A, Gunsilius E, Patsch JR, Hamacher J. Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. Respir. Res. 2007;8:50.

38. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. Nat Clin Pract Urol 2007;4:542-9.

39. Juzenas P, Juzeniene A, Kaalhus O, Iani V, Moan J. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo. Photochem Photobiol Sci 2002;1:745-8.

40. D'Hallewin M-A, El Khatib S, Leroux A, Bezdetnaya L, Guillemin F. Endoscopic confocal fluorescence microscopy of normal and tumor bearing rat bladder. Journal of Urology, The 2005;174:736-40.

V SYNTHÈSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Des mécanismes divers sont à l'origine de la diminution de la communication intercellulaire lors du processus de cancérogenèse. La technique de gap-FRAP, méthode de mesure du couplage intercellulaire, permet de mettre en évidence ce phénomène. Le défi majeur que nous proposons pour cette technique est son utilisation *in situ* pour évaluer la communication intercellulaire dans des conditions pathologiques. Or, en premier lieu cette étude de faisabilité pour un transfert vers l'*in vivo* s'est avérée essentielle.

Dans **une première partie**, nous avons déterminé quel traceur fluorescent traduisait au mieux la communication intercellulaire. Une étude *in vitro* de la technique de *gap*-FRAP a été réalisée sur des fibroblastes (CCD-1137sk) et sur des cellules de carcinome épidermoïde oropharyngée, KB et Fadu cultivées en monocouche. L'expression des Cx26 et Cx32 s'est révélée négative pour ces lignées. Nous avons aussi mis en évidence une expression marquée en Cx43 phosphorylée pour les fibroblastes et les cellules KB, associée à une localisation membranaire au niveau des zones de contact ou de plaques intercellulaires. Par opposition, les cellules FaDu présentaient une distribution diffuse des Cx43 dans la région périnucléaire. Nous avons ensuite réalisé une étude comparant deux sondes fluorescentes, la calcéine acetoxymethylester (AM) et le carboxyfluorescéine diacetate (CFDA) par la technique de *gap*-FRAP pour ces mêmes lignées cellulaires. Les sondes fluorescentes se sont redistribuées de façon massive dans la cellule cible photoblanchie en diffusant par les jonctions *gap* (confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur) pour les fibroblastes et les cellules KB, tandis qu'un recouvrement de fluorescence 7 fois plus faible, a été mesuré pour les cellules FaDu. Les cinétiques de recouvrement de fluorescence étaient significativement modifiées selon le traceur utilisé (2 fois plus rapide avec la calcéine), alors que les pourcentages de recouvrement de fluorescence restaient quant à eux comparables, malgré une libération extracellulaire du CFDA lignée dépendante. L'ensemble de ces résultats nous a permis de sélectionner la calcéine-AM comme étant le traceur le plus approprié pour des expérimentations sur tissus.

Dans une **seconde partie,** nous avons développé un modèle d'ingénierie système adapté à des mesures tridimensionnelles et au photoblanchiment d'une zone et non plus d'une cellule. Une étude comparative des données obtenues pour des mêmes protocoles de

photoblanchiment et de recouvrement appliqués *in vitro*, soit à une culture en monocouche, soit en trois dimensions sur sphéroïdes de cellules FaDu et KB a été menée. Le recouvrement de fluorescence s'est révélé positif pour les KB et négatif pour les FaDu quelque soit le type de culture. De façon similaire à la culture 2-D, l'étude de la distribution en Cx43 dans les cultures tridimensionnelles a présenté un marquage intense, localisé au niveau des zones de contact intercellulaire pour les cellules KB par opposition aux cellules FaDu où le marquage apparaissait faible et non significatif dans le cytoplasme. Nous avons développé un modèle de physique macroscopique adapté aux données expérimentales obtenues, proposant de nouveaux paramètres explicatifs du phénomène de diffusion, significatifs du recouvrement et prenant en compte la contribution des zones périphériques de la zone cible photoblanchie dans la restitution de fluorescence. Le nouveau modèle décrit, nous a permis de mettre en évidence une participation négligeable des couches sous jacentes pour la culture 3-D en sphéroïdes.

La **dernière partie** de l'étude a consisté en la transposition, l'optimisation et la validation de la technique de *gap*-FRAP sur un tissu *ex vivo*, la vessie saine de rat et avec induction par un modèle tumoral orthotopique syngénique. Cette induction a été obtenue par instillation intravésicale de cellules de carcinome transitionnel papillaire (AY27).

Tout d'abord, nous nous sommes attachés à caractériser la lignée cellulaire AY27, en culture cellulaire monocouche, en terme d'expression des Cx26 et Cx43 et de la fonctionnalité des jonctions *gap*. Une expression uniquement cytoplasmique pour la Cx26 a été observée ainsi qu'une absence de communication intercellulaire, contrairement à ce qui était rapporté jusqu'alors dans la littérature, pour d'autres lignées cancéreuses vésicales de rat. De plus aucune expression significative n'a été mesurée pour la Cx43. Au niveau de l'urothélium sain de rat, la technique de *scrape loading* avait déjà mis en évidence une communication intercellulaire *gap* jonctionnelle pour l'urothélium après cystectomie, une analyse en microscopie après fixation des tissus (Haefliger *et al.*, 2002). Cependant, aucune étude n'a décrit la possibilité d'utiliser la technique de *gap*-FRAP pour évaluer le fonctionnement des jonctions *gap* sur la vessie de rat. Nous avons évalué l'efficacité de la technique de *gap*-FRAP pour discriminer un urothélium sain d'une tumeur vésicale avec un degré de communication intercellulaire modifié. La corrélation entre la distribution des Cx26 et des Cx43, et l'histologie des tissus a été réalisée par immunohistochimie. Dans le cas de la tumeur, la localisation de l'expression des Cx26 et Cx43 était principalement cytoplasmique avec un marquage membranaire hétérogène et discontinu. Pour s'assurer une discrimination des zones tumorales et saines par l'imagerie de fluorescence, nous avons optimisé les conditions de

marquage *in vivo* en instillant des cellules cancéreuses, préalablement marquées avec une sonde fluorescente, le SP-DiI, visible après 8 jours de croissance tumorale. Le recouvrement de fluorescence était positif pour le tissu sain. En accord avec la distribution des Cx26 et Cx43 observée dans les zones cancéreuses, le couplage intercellulaire *in situ* était inférieur à celui mesuré pour l'urothélium sain. Ces résultats ont mis en évidence l'intérêt potentiel de la technique de *gap*-FRAP comme méthode de diagnostic, qui peut apparaître comme une approche complémentaire au diagnostic par fluorescence induite dans le cas du cancer de la vessie.

VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le développement d'une nouvelle méthode optique de caractérisation des tissus dans la perspective de détection de cancer. Il ne s'agissait pas ici d'obtenir une information dite « statique », basée sur les différences morphologiques ou sur les propriétés d'autofluorescence des tissus, mais plutôt d'acquérir une information dite **« fonctionnelle »,** basée sur une connaissance de la modification de la communication intercellulaire d'un tissu cancéreux par rapport au tissu sain homologue (Leithe *et al.*, 2006). La technique de ***gap*-FRAP** présentait les qualités prometteuses pour apporter une réponse sur la fonctionnalité des jonctions *gap* et ainsi, permettre une transposition ***in vivo***. L'information quantitative apportée par les courbes de recouvrement de fluorescence ainsi que l'approche non invasive de la méthode en ont fait un candidat dont la faisabilité *in situ* a été évaluée.

Notre objectif de travail s'est alors divisé en trois parties pour transposer et faire évoluer vers le tissu les conditions d'utilisation usuelle de la technique de *gap*-FRAP : **le choix de la sonde fluorescente, la méthode de calcul et le suivi de la fonctionnalité sur tissu pour une discrimination**. Le microscope confocal a été l'élément technique resté constant pour notre étude.

Le thème des connexines et de la communication intercellulaire *gap* jonctionnelle, qui a été initié avec ce travail de thèse, était un nouveau sujet au sein du laboratoire. Pour mener à bien ces travaux, nous sommes passés de cultures monocouche et tridimensionnelle *in vitro* à des mesures *ex vivo* sur des vessies de rat avec des tumeurs orthotopiques syngéniques. Les conclusions des deux premières étapes ont été basées sur **des comparaisons,** soit de sondes fluorescentes déjà décrites dans la littérature, soit de méthodes de calculs dites classiques (Wade *et al.*, 1986), avec de nouveaux paramètres que nous proposions. L'analyse de la zone photoblanchie et des zones périphériques participant au recouvrement de fluorescence, nous a permis de mettre au point ce modèle de physique macroscopique. Ce chapitre a mis en avant l'approche pluridisciplinaire que nécessite la technique de *gap*-FRAP pour une exploitation rigoureuse des résultats. Du fait du temps qu'a nécessité l'optimisation du marquage et du protocole d'acquisition pour la vessie, les résultats doivent être confirmés sur un échantillonnage plus grand d'autres lignées présentant des niveaux de communication différents pour confirmer l'efficacité de la méthode.

L'étude des sondes fluorescentes présentée dans ce travail est basée sur la comparaison des courbes de recouvrement de lignées sauvages. Bien que nous ayons évalué l'expression et la localisation des formes de Cx les plus étudiées (Cx26, Cx32 et Cx43), la présence d'autres Cxs potentielles, de sélectivité et perméabilité différentes, reste possible. Ainsi, les différences observées pour les cinétiques de recouvrement de fluorescence en fonction de la calcéine-AM et du CFDA pour chaque lignée, pourraient aussi s'expliquer en partie par d'autres Cxs. La sélectivité par rapport à la taille et la charge ionique du traceur est décrite dans la littérature et induit une affinité pour les jonctions *gap* en fonction de la nature des Cxs qui la composent (Veenstra, 1996). Une étude menée avec des cellules de type Hela (carcinome du col de l'utérus), connues pour être déficientes en jonctions *gap* (Eckert *et al.*, 1993), transfectées avec une Cx donnée ou l'utilisation de lignée cellulaire dont l'expression des Cxs est inhibée, pourrait permettre une comparaison du recouvrement de fluorescence en fonction de la sonde fluorescente de manière plus pertinente (Hentati-Ksibi, 1999). La perméabilité des jonctions *gap* en fonction de la nature des Cxs qui les compose, a été caractérisée par Elfang *et al.* en transfectant des cellules HeLa avec des Cxs murines pour des sondes utilisées en microinjection tel que le *lucifer yellow* (Elfgang *et al.*, 1995).

Le choix de la **calcéine-AM** pour une étude de la communication intercellulaire *in vivo*, a mis en évidence un marquage significatif de l'urothélium après instillation intravésicale. Une vésiculisation du produit, certainement dans les mitochondries, est également visible dans l'heure qui suit le marquage. Petronilli *et al.* ont décrit la séquestration de la calcéine à l'intérieur des mitochondries pour les hépatocytes, les cellules HeLa, les lignées cellulaires d'hépatome (MH1C1) et de rein (NRK) après un marquage avec sa forme ester à 1 µM (Petronilli *et al.*, 1999). La liaison de la calcéine aux membranes cellulaires est négligeable (Kendall *et al.*, 1982). D'autres paramètres pour l'utilisation de la calcéine-AM dans la vessie chez l'animal, doivent encore être déterminés telles que sa biodistribution, sa toxicité, son innocuité et la clairance du produit par l'organisme. Le potentiel diagnostic de la calcéine a déjà été analysé à titre expérimental pour l'angiographie rétinienne par injection intraveineuse chez le lapin et les primates (Fang *et al.*, 1990), ainsi que chez le rat pour l'étude de l'altération de barrière hémato-rétinienne par fluorophotométrie du vitré (Golshani *et al.*, 1994). Son élimination plus lente de la circulation comparée à la fluorescéine sodique permet la visualisation détaillée de la vascularisation rétinienne. L'intérêt de la sonde a également été démontré pour l'application simultanée de l'angiographie avec la photocoagulation au laser permettant une vérification directe de l'occlusion vasculaire (Fang *et al.*, 1990). D'autres

études *in vivo* ont décrit l'utilisation de la calcéine pour l'étude du tissu osseux nouvellement synthétisé chez le rat (Pataki *et al.*, 1997) et ont déterminé les effets du glucose sur la pharmacocinétique de la sonde fluorescente chez la souris après injection intra-veineuse.

L'effet délétère de l'énergie doit être évalué à long terme sur les zones photoblanchies après un marquage des cellules avec la calcéine-AM. Le réglage de la puissance d'irradiation au microscope confocal est empirique puisqu'il est basé sur une valeur en pourcentage de la puissance fournie par le système. L'impact du photoblanchiment sur le métabolisme des cellules pourra être estimé en ajoutant au milieu un agent à la fois fluorescent et intercalant de l'ADN tel que le propidium iodide ou en marquant les cellules avec une sonde de poids moléculaire supérieur à la limite de diffusion par les jonctions *gap*. Le marquage de l'ADN ou la diffusion de la molécule vers les cellules adjacentes traduira une modification de l'intégrité membranaire des cellules ciblées.

De nombreux modèles mathématiques et de connaissance ont été décrits pour la technique de FRAP depuis celui développé par Axelrod en 1976 (Axelrod *et al.*, 1976). L'analyse des données se fait par l'utilisation d'une fonction monoexponentielle. Le développement **du modèle d'ingénierie système**, décrit dans ce travail de thèse, est basé sur les données obtenues avant et après photoblanchiment. La zone cible et périphérique, dont la communication intercellulaire et traduite par les paramètres k, T_1 et T_2, ont été transposées en compartiments. Nous avons démontré l'intérêt d'étendre l'analyse du recouvrement de fluorescence, en intégrant la participation des zones voisines pour caractériser la diffusion du traceur. Cette méthode nous a permis également de comparer pour la première fois, la communication intercellulaire dans un modèle 2-D et 3-D en fonction des zones adjacentes et de la région photoblanchie. La prochaine étape de la modélisation du *gap*-FRAP est **l'analyse des courbes de photoblanchiment.** La décroissance de la fluorescence dans la zone cible dépend directement du nombre de jonctions communicantes par lesquelles la sonde fluorescente va diffuser pour compenser la photodégradation de la calcéine à cette étape. Une discrimination des cellules est donc également possible pendant le photoblanchiment. Chaque phase du protocole de la technique de *gap*-FRAP pourrait être prise en compte pour l'évaluation de la fonctionnalité des jonctions communicantes. Un algorithme permettant le calcul de paramètres associés au photoblanchiment pourrait compléter ceux déjà proposés.

Nous avons démontré la faisabilité de la technique de *gap*-FRAP *ex vivo* avec une instillation de la sonde fluorescente *in vivo*. Le choix du modèle préclinique, déjà utilisé au sein de notre laboratoire, nous a permis d'obtenir efficacement des tumeurs multiples. Cependant, le conditionnement chimique qui précède l'induction globale, entraine **une réaction inflammatoire** importante observée par analyse histologique, encore visible dans le chorion et dans certaines zones de l'urothélium, sept jours après le début de la croissance tumorale. L'inflammation pourrait constituer une limite de la technique de *gap*-FRAP pour la discrimination de tissu. L'expression des Cxs est cependant apparue comparable au niveau du tissu sain préconditionné, indépendamment des régions inflammatoires. Un **modèle vésical chimio-induit,** entraînant le développement de tumeurs transitionnelles et/ou épidermoïde, présenterait un intérêt certain, mais ce carcinogène ne devrait pas être un inhibiteur de jonctions communicantes. Une induction chimique, via l'initiateur le N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN), est obtenu lentement après la fin de l'ingestion selon la dose administrée et la durée du traitement (Okada *et al.*, 1977, Zhang *et al.*, 1998a). Le développement de tumeurs de type épidermoïde et transitionnelle, à partir d'un urothélium non altéré pour des rats traités au BBN, peut être considéré comme attractif (Herman *et al.*, 1985, Fukushima *et al.*, 1976). La bibliographie existante ne décrit pas l'influence du BBN sur la communication intercellulaire. L'influence de l'initiateur sur la fonctionnalité des jonctions *gap* du tissu sain devrait être déterminée.

Pour la même raison qu'en biopsie chirurgicale, il n'est pas envisageable d'utiliser la technique de *gap*-FRAP point par point sur un organe entier. La mesure de la communication intercellulaire sur des zones non suspectes en lumière blanche par leur morphologie est le réel intérêt d'une telle méthode. L'utilisation de cette approche pourrait être complémentaire d'une méthode de diagnostic déjà existante. Dans le cas du carcinome *in situ* de la vessie, l'utilisation du **diagnostic par fluorescence induite** représente l'une des avancées majeures en urologie depuis ces dix dernières années (Kausch *et al.*, 2006). Une utilisation comparative de ces deux techniques permettrait d'évaluer dans un premier temps, la sensibilité et la spécificité de cette approche pour la détection de cancer. Prochainement, le remplacement du SYTO 17 et du SP-DiI par une instillation **d'ALA ou HALA,** précurseurs de la protoporphyrine IX (PpIX) (bande d'absorption : 390-420 nm et émission : 635 et 695nm) et de **calcéine-AM** qui produit la calcéine (excitation : 494nm et émission : 517nm), nous permettrait de caractériser la complémentarité de la technique de *gap*-FRAP avec la détection de carcinome par fluorescente induite.

Approches instrumentales

Deux stratégies pourraient être proposées pour appliquer cette technique sur le patient. La première consisterait en l'utilisation de la **microscopie confocale fibrée**, comme décrit partie II, en associant une aide à l'interprétation des données par l'imagerie de fluorescence. Elle devrait prendre en compte la sélection d'une zone témoin, choisie par l'opérateur, pour corriger le photoblanchiment dû aux éclairements successifs de la zone cible. L'instrument le plus adapté actuellement à l'application de cette technique serait, selon nos sources, le Cell-Vizio (MKT). Pour autant, il serait nécessaire de lui apporter plusieurs modifications matérielles (optique, électronique et informatique) pour lui permettre de transmettre alternativement les intensités de lumière ainsi que les résultats du traitement des signaux de fluorescence provenant des zones cible et témoin. La sélection cible/témoin s'effectuerait au niveau de son capteur optique qui, modifié en conséquence à partir de son faisceau multifibres, comprendrait 2 groupements de fibres dédiés, à la cible pour l'un et au témoin pour l'autre. Ces modifications devraient également permettre de transmettre deux intensités de lumière distinctes : intensités fortes pour provoquer le photoblanchiment de la zone cible ; intensités faibles pour réaliser la mesure du recouvrement des zones cible et témoin. La conservation du positionnement du capteur sur les sites durant toute la durée de la mesure nécessiterait de la part du praticien, une correction manuelle, du fait de la fréquente motilité des milieux organiques susceptibles d'être examinés, ainsi que probablement, d'un traitement informatique de recalage d'images, pour obtenir une analyse convenable du recouvrement de fluorescence. La seconde stratégie, plus simple à réaliser car ne faisant pas appel à l'imagerie, consisterait en la mise en œuvre d'une instrumentation spécifique, à base d'une source laser diode, reliée à un capteur optique constitué exclusivement de deux fibres : une première fibre dédiée à la zone cible, la seconde à la zone témoin. Cette méthode devrait pouvoir être couplée à l'endoscopie, par exemple à la cystoscopie de fluorescence pour le diagnostic de tumeurs de la vessie.

Une pré-étude a été initiée pour permettre d'apprécier les potentiels de cette démarche, essentiellement au niveau des sensibilités des capteurs pressentis pour être intégrés à cette technique. Le but n'était pas d'effectuer des mesures de recouvrement de fluorescence mais d'éclairer entièrement un sphéroïde de diamètre 500 µm à l'aide d'une fibre optique de 50µm de diamètre de cœur afin de provoquer son photoblanchiment progressif suite à l'émission d'une lumière laser d'intensité de faible puissance (quelques dizaines de nW) émettant précisément des séquences d'impulsions courtes (500ms) et de pause (4500ms). Le traitement

des données consistait à retracer la courbe d'atténuation de fluorescence en fonction des séquences d'éclairements pour apprécier son évolution. Pour ce faire, une instrumentation à l'échelle maquette de laboratoire a été réalisée au sein de l'équipe de recherche. Cette instrumentation était équipée des modules suivants : un laser Argon (Beam Lock – SPECTRA-PHYSICS) réglé à la longueur d'onde de 488 nm, un micromanipulateur, une fibre optique (silice/silice, SEDI) de 50µm de diamètre de cœur, un filtre dichroïque passe-haut de 495 nm (FF495-DIO2, THORLABS) placé devant l'entrée d'un spectromètre (USB2000, IDIL SPECTRALINE), un montage électronique et un programme informatique spécifiquement développés au laboratoire pour réaliser les expériences.

L'optimisation du paramétre temps pour l'évaluation de la fonctionnalité des jonctions communicantes par la technique de gap-FRAP nécessitera à la fois une durée de photoblanchiment minimisée par une excitation laser suffisante sans endommager le tissu, ainsi qu'une information significative déduite des premières valeurs du recouvrement de fluorescence. Un cahier des charges ainsi qu'un synoptique ont été proposés figure 22. La conception de l'instrument serait basée sur l'utilisation d'une diode laser argon émettant à 488nm, et du capteur de type CPM choisi, de plusieurs fibres optiques réservées pour une part, à des zones cibles et pour une autre part, à des zones témoins, ainsi que de l'électronique et de l'informatique de commande d'actionneurs (shutters, moteurs, etc.), de réglage de la puissance d'émission de lumière laser, du séquençage, de l'acquisition et du traitement des données.

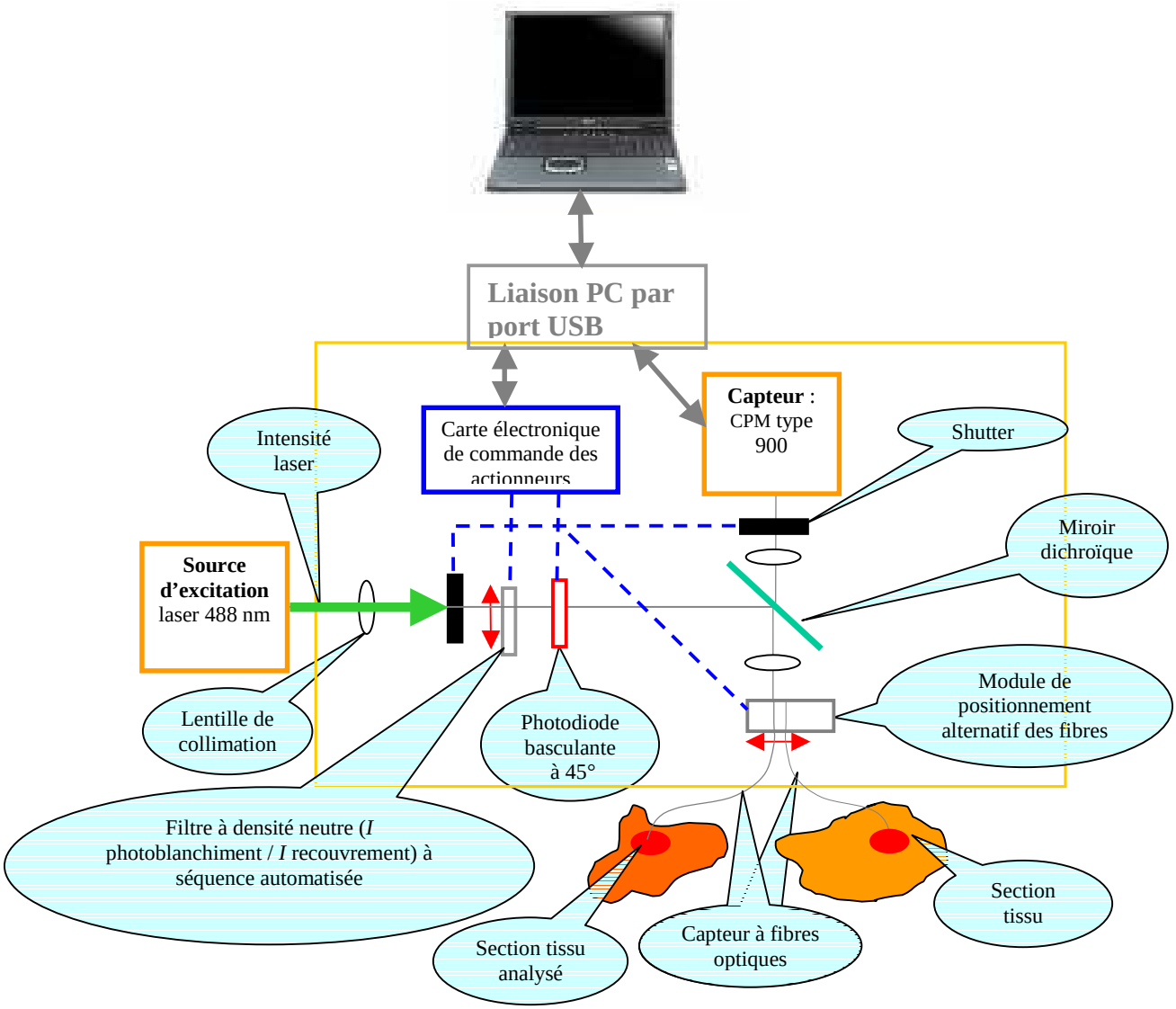

Figure 22 : Vue d'ensemble du synoptique de l'instrument proposé, dédié à la technique endoscopique fibrée de *gap*-FRAP.

L'étude de l'instrument a en partie été réalisée au niveau opto-mécanique et électronique. Reste l'informatique et surtout le concept du capteur optique, qui est l'une des clés essentielles de cet outil car il doit être de type endoscope et pouvoir se placer aisément sur la zone tissulaire à examiner. Il devra probablement posséder une distribution géométrique de plusieurs micro-fenêtres cibles/témoins, à définir pour une surface propre à chaque type d'organe, pour lequel cette technique pourra être appliquée.

VII BIBLIOGRAPHIE

Al Moustafa, A.E., Alaoui-Jamali, M.A., Batist, G., Hernandez-Perez, M., Serruya, C., Alpert, L., *et al.* (2002). Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* **21,** 2634-2640.

Allagnat, F., Krattinger, N., Nicod, P., Meda, P. and Haefliger, J.-A. (2005). Jonctions communicantes et pathologies. *Rev. Med.Suisse* **1,** 1126-1133.

Alves, L.A., de Carvalho, A.C. and Savino, W. (1998). Gap junctions: a novel route for direct cell-cell communication in the immune system? *Immunol. Today* **19,** 269-275.

Amharref, N., Beljebbar, A., Dukic, S., Venteo, L., Schneider, L., Pluot, M. and Manfait, M. (2007). Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1768,** 2605-2615.

Anzini, P., Neuberg, D.H.H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., *et al.* (1997). Structural Abnormalities and Deficient Maintenance of Peripheral Nerve Myelin in Mice Lacking the Gap Junction Protein Connexin 32. *J. Neurosci.* **17,** 4545-4551.

Arens, C., Reußner, D., Neubacher, H., Woenckhaus, J. and Glanz, H. (2006). Spectrometric measurement in laryngeal cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **263,** 1001-1007.

Armstrong, J.J., Leigh, M.S., Sampson, D.D., Walsh, J.H., Hillman, D.R. and Eastwood, P.R. (2006). Quantitative Upper Airway Imaging with Anatomic Optical Coherence Tomography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173,** 226-233.

Asamoto, M., Takahashi, S., Imaida, K., Shirai, T. and Fukushima, S. (1994). Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis* **15,** 2163-2166.

Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Krutovskikh, V., Cohen, S.M. and Tsuda, H. (1998). Enhanced Tumorigenicity of Rat Bladder Squamous Cell Carcinoma Cells after Abrogation of Gap Junctional Intercellular Communication. *Cancer Sci.* **89,** 481-486.

Ascencio, M., Collinet, P., Cosson, M. and Mordon, S. (2007). Place et intérêt de la tomographie par cohérence optique en gynécologie. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* **36,** 749-755.

Aveline BM., Calzavara-Pinton P., Szeimies RM. and B., O. (2001) Chapter 2 Primary processes in photosensitization mechanisms. In *Comprehensive Series in Photosciences*. Elsevier Science B.V., pp. 17-37.

Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* **16,** 1055-1069.

Bager, Y., Kenne, K., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Traub, O. and Warngard, L. (1994). Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3',4'-pentachiorobiphenyl. *Carcinogenesis* **15,** 2439-2443.

Benedetti, E.L. and Emmelot, P. (1965). Electron microscopic observations on negatively stained plasma membranes isolated from rat liver. *J. Cell Biol.* **26,** 299-305.

Bennett, M.V. (1997). Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol* **26,** 349-366.

Bennett, M.V.L., Barrio, L.C., Bargiello, T.A., Spray, D.C., Hertzberg, E. and Saez, J.C. (1991). Gap junctions: New tools, new answers, new questions. *Neuron* **6,** 305-320.

Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., *et al.* (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262,** 2039-2042.

Berthoud, V.M., Beyer, E.C., Kurata, W.E., Lau, A.F. and Lampe, P.D. (1997). The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. *Eur. J. Biochem.* **244,** 89-97.

Berthoud, V.M., Minogue, P.J., Laing, J.G. and Beyer, E.C. (2004). Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc. Res.* **62,** 256-267.

Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K. and Harris, A.L. (1998). Isoform Composition of Connexin Channels Determines Selectivity among Second Messengers and Uncharged Molecules. *J. Biol. Chem.* **273,** 2808-2816.

Beyer, E.C., Paul, D.L. and Goodenough, D.A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* **105,** 2621-2629.

Bloom and Fawcett (1994) A Textbook of Histology New York, Chapman & Hall, pp. Figure 2-14.

Borek, C. and Sachs, L. (1966). The Difference in Contact Inhibition of Cell Replication between Normal Cells and Cells Transformed by Different Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56,** 1705-1711.

Bourg-Heckly, G. (2002) La spectroscopie tissulaire appliquée à la détection des états précancéreux et cancéreux précoces. Application de l'optoélectronique Paris, Hermés Science, pp. 103-168.

Braeckmans, K., Peeters, L., Sanders, N.N., De Smedt, S.C. and Demeester, J. (2003). Three-Dimensional Fluorescence Recovery after Photobleaching with the Confocal Scanning Laser Microscope. *Biophys. J.* **85,** 2240-2252.

Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M., Zuppan, C.W. and Fletcher, W.H. (1995). Mutations of the Connexin43 Gap-Junction Gene in Patients with Heart Malformations and Defects of Laterality. *N. Engl. J. Med.* **332,** 1323-1330.

Brown, S.B., Brown, E.A. and Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5,** 497-508.

Bruzzone, R., White, T.W. and Goodenough, D.A. (1996a). The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* **18,** 709-718.

Bruzzone, R., White, T.W. and Paul, D.L. (1994). Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. *J. Cell Sci.* **107,** 955-967.

Bruzzone, R., White, T.W. and Paul, D.L. (1996b). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **238,** 1-27.

Budunova, I.V. and Williams, G.M. (1994). Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.* **10,** 71-116.

Carcenac, M., Gutowski, M., Rouanet, P., Larroque, C. and Pelegrin, A. (2000). [Cancer immunophotodetection and immunophototherapy]. *Bull Cancer* **87,** 804-812.

Carrero, G., McDonald, D., Crawford, E., de Vries, G. and Hendzel, M.J. (2003). Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods* **29,** 14-28.

Carruba, G., Stefano, R., Cocciadiferro, L., Saladino, F., Di Cristina, A., Tokar, E., *et al.* (2002). Intercellular communication and human prostate carcinogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **963,** 156-168.

Caspar, D.L., Goodenough, D.A., Makowski, L. and Phillips, W.C. (1977). Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* **74,** 605-628.

Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M.J., Malkinson, A.M. and Ruch, R.J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* **19,** 61-67.

Charvet, I., Meda, P., Genet, M., Pelte, M.F. and Vlastos, A.T. (2004). [Optical diagnosis of cervical dysplasia]. *Bull. Cancer* **91,** 45-53.

Chary, S.R. and Jain, R.K. (1989). Direct Measurement of Interstitial Convection and Diffusion of Albumin in Normal and Neoplastic Tissues by Fluorescence Photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 5385-5389.

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

Clairmont, A., Tessmann, D., Stock, A., Nicolai, S., Stahi, W. and Sies, H. (1996). SHORT COMMUNICATION: Induction of gap junctional intercellular communication by vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear vitamin D receptor. *Carcinogenesis* **17,** 1389-1391.

Conklin, C., Huntsman, D., Yorida, E., Makretsov, N., Turbin, D., Bechberger, J.F., *et al.* (2007). Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Cancer Lett.* **255,** 284-294.

Cooper, C.D., Solan, J.L., Dolejsi, M.K. and Lampe, P.D. (2000). Analysis of Connexin Phosphorylation Sites. *Methods* **20,** 196-204.

Cottrell, G.T. and Burt, J.M. (2005). Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1711,** 126-141.

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

DaCosta, R.S., Wilson, B.C. and Marcon, N.E. (2005). Optical techniques for the endoscopic detection of dysplastic colonic lesions. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **21,** 70-79.

Davies, M.J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3,** 17-25.

De Maio, A., Vega, V.L. and Contreras, J.E. (2002). Gap junctions, homeostasis, and injury. *J. Cell. Physiol.* **191,** 269-282.

Deleze, J., Delage, B., Hentati-Ksibi, O., Verrecchia, F. and Herve, J.C. (2001). Fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol. Biol.* **154,** 313-327.

Diez, J.A., Ahmad, S. and Evans, W.H. (1999). Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur. J. Biochem.* **262,** 142-148.

Döring, B., Shynlova, O., Tsui, P., Eckardt, D., Janssen-Bienhold, U., Hofmann, F., *et al.* (2006). Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition. *J. Cell Sci.* **119,** 1715-1722.

Dubina, M.V., Iatckii, N.A., Popov, D.E., Vasil'ev, S.V. and Krutovskikh, V.A. (2002). Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* **21,** 4992-4996.

Duffy, H.S., Sorgen, P.L., Girvin, M.E., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., *et al.* (2002). pH-Dependent Intramolecular Binding and Structure Involving Cx43 Cytoplasmic Domains. *J. Biol. Chem.* **277,** 36706-36714.

Eckert, R., Dunina-Barkovskaya, A. and Hulser, D.F. (1993). Biophysical characterization of gap-junction channels in HeLa cells. *Pflugers Arch.* **424,** 335-342.

Eghbali, B., Kessler, J.A., Reid, L.M., Roy, C. and Spray, D.C. (1991). Involvement of Gap Junctions in Tumorigenesis: Transfection of Tumor Cells with Connexin 32 cDNA Retards Growth In vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 10701-10705.

Eiberger, J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K. and Sohl, G. (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun. Adhes.* **8,** 163-165.

El-Sabban, M.E. and Pauli, B.U. (1994). Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* **14,** 164-176.

Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., *et al.* (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129,** 805-817.

Esser, A.T., Smith, K.C., Weaver, J.C. and Levin, M. (2006). Mathematical model of morphogen electrophoresis through gap junctions. *Dev. Dyn.* **235,** 2144-2159.

Evans, W.H. and Martin, P.E.M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* **19,** 121 - 136.

Ezumi, K., Yamamoto, H., Murata, K., Higashiyama, M., Damdinsuren, B., Nakamura, Y., *et al.* (2008). Aberrant Expression of Connexin 26 Is Associated with Lung Metastasis of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **14,** 677-684.

Falk, M.M. (2000). Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur. J. Cell Biol.* **79,** 564-574.

Falk, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* **16,** 2703-2716.

Fang, T., Naguib, K.S., Peyman, G.A. and Khoobehi, B. (1990). Comparative study of three fluorescent dyes for angiography: sodium fluorescein, carboxyfluorescein, and calcein. *Ophthalmic. Surg.* **21,** 250-257.

Fishman, G.I., Moreno, A.P., Spray, D.C. and Leinwand, L.A. (1991). Functional Analysis of Human Cardiac Gap Junction Channel Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88,** 3525-3529.

Foote, C.S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54,** 659-659.

Fukushima, S., Hirose, M., Tsuda, H., Shirai, T. and Hirao, K. (1976). Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* **67,** 81-90.

Furshpan, E.J. and Potter, D.D. (1957). Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature* **180,** 342-343.

Furshpan, E.J. and Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* **145,** 289-325.

Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., *et al.* (2002). Multicolor and Electron Microscopic Imaging of Connexin Trafficking. *Science* **296,** 503-507.

Gambichler, T., Moussa, G., Sand, M., Sand, D., Altmeyer, P. and Hoffmann, K. (2005). Applications of optical coherence tomography in dermatology. *J. Dermatol. Sci.* **40,** 85-94.

Garber, S.A., Fernstrom, M.J., Stoner, G.D. and Ruch, R.J. (1997). Altered gap junctional intercellular communication in neoplastic rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis* **18,** 1149-1153.

Gee, J., Tanaka, M. and Grossman, H.B. (2003). Connexin 26 is Abnormally Expressed in Bladder Cancer. *J. Urol.* **169,** 1135-1137.

Goldberg, G.S., Valiunas, V. and Brink, P.R. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1662,** 96-101.

Golshani, M.R., Khoobehi, B., Peyman, G.A. and Aras, C. (1994). Calcein fluorophotometry in streptozocin-induced diabetic rats. *Ophthalmic Surg.* **25,** 526-531.

González, D., Gómez-Hernández, J.M. and Barrio, L.C. (2007). Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: An integrative appraisal. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 66-106.

Goodenough, D.A. and Revel, J.P. (1970). A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J. Cell Biol.* **45,** 272-290.

Govindarajan, R., Zhao, S., Song, X.-H., Guo, R.-J., Wheelock, M., Johnson, K.R. and Mehta, P.P. (2002). Impaired Trafficking of Connexins in Androgen-independent Human Prostate Cancer Cell Lines and Its Mitigation by alpha -Catenin. *J. Biol. Chem.* **277,** 50087-50097.

Graeber, S.H.M. and Hulser, D.F. (1998). Connexin Transfection Induces Invasive Properties in HeLa Cells. *Exp. Cell Res.* **243,** 142-149.

Grossman, H.B., Liebert, M., Lee, I.W. and Lee, S.W. (1994). Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. *Cancer Res.* **54,** 3062-3065.

Gupta, S., Bhawna, Goswami, P., Agarwal, A. and Pradhan, A. (2004). Experimental and theoretical investigation of fluorescence photobleaching and recovery in human breast tissue and tissue phantoms. *Appl. Opt.* **43,** 1044-1052.

Habermann, H., Ray, V., Habermann, W. and Prins, G.S. (2002). Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J. Urol.* **167,** 655-660.

Haefliger, J.A., Tissieres, P., Tawadros, T., Formenton, A., Beny, J.L., Nicod, P., *et al.* (2002). Connexins 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction. *Exp. Cell Res.* **274,** 216-225.

Harris, A.L. (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q. Rev. Biophys.* **34,** 325-472.

Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 120-143.

Henderson, D., Eibl, H. and Weber, K. (1979). Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J. Mol. Biol.* **132,** 193-218.

Hentati-Ksibi, O. (1999) comparaison des perméabilités pour une série de molècules fluorescentes des canaux jonctionnels homotypiques constitués des connexines 43, 32 et 26 de rat induites par transfection de leurs gènes dans des lignées cellulaires non communicantes, PhD thesis. Poitiers, faculté des sciences fondamentales et appliquées.

Herman, C.J., Vegt, P.D., Debruyne, F.M., Vooijs, G.P. and Ramaekers, F.C. (1985). Squamous and transitional elements in rat bladder carcinomas induced by N-butyl-N-4-hydroxybutyl-nitrosamine (BBN). A study of cytokeratin expression. *Am. J. Pathol.* **120,** 419-426.

Hernandez-Blazquez, F.J., Joazeiro, P.P., Omori, Y. and Yamasaki, H. (2001). Control of Intracellular Movement of Connexins by E-Cadherin in Murine Skin Papilloma Cells. *Exp.Cell Res.* **270,** 235-247.

Hertzberg, E.L. and Gilula, N.B. (1979). Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **254,** 2138-2147.

Herve, J.-C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D. and Duffy, H.S. (2007). Gap junctional complexes: From partners to functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 29-65.

Heynkes, R., Kozjek, G., Traub, O. and Willecke, K. (1986). Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein. *FEBS Lett.* **205,** 56-60.

Hirschi, K.K., Xu, C.E., Tsukamoto, T. and Sager, R. (1996). Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth. Differ.* **7,** 861-870.

Hoh, J.H., Sosinsky, G.E., Revel, J.P. and Hansma, P.K. (1993). Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **65,** 149-163.

Houtsmuller, A.B. (2005). Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **95,** 177-199.

Hsieh, C.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B. and Francke, U. (1991). Distribution of genes for gap junction membrane channel proteins on human and mouse chromosomes. *Somat. Cell Mol. Genet.* **17,** 191-200.

Huang, R.P., Fan, Y., Hossain, M.Z., Peng, A., Zeng, Z.L. and Boynton, A.L. (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). *Cancer Res.* **58,** 5089-5096.

Huang, R.P., Hossain, M.Z., Huang, R., Gano, J., Fan, Y. and Boynton, A.L. (2001). Connexin 43 (Cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* **92,** 130-138.

Ito, A., Katoh, F., Kataoka, T.R., Okada, M., Tsubota, N., Asada, H., *et al.* (2000). A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J. Clin. Invest.* **105,** 1189-1197.

Ito, A., Koma, Y., Uchino, K., Okada, T., Ohbayashi, C., Tsubota, N. and Okada, M. (2006). Increased expression of connexin 26 in the invasive component of lung squamous cell carcinoma: Significant correlation with poor prognosis. *Cancer Lett.* **234,** 239-248.

Jamakosmanovic, A. and Loewenstein, W.R. (1968). Cellular uncoupling in cancerous thyroid epithelium. *Nature* **218,** 775.

Jamieson, S., Going, J.J., D'Arcy, R. and George, W.D. (1998). Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J. Pathol.* **184,** 37-43.

Jocham, D., Stepp, H. and Waidelich, R. (2008). Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. *Eur. Urol.* **53,** 1138-1150.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R. and Laird, D.W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell Sci.* **114,** 763-773.

Kähler, C.M., Wechselberger, J., Hilbe, W., Gschwendtner, A., Colleselli, D., Niederegger, H., *et al.* (2007). Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. *Respir. Res.* **8,** 50.

Kang, K.S., Kang, B.C., Lee, B.J., Che, J.H., Li, G.X., Trosko, J.E. and Lee, Y.S. (2000). Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H(2)O(2). *Cancer Lett.* **152,** 97-106.

Kanno, Y. and Loewenstein, W.R. (1966). Cell-to-cell passage of large molecules. *Nature* **212,** 629-630.

Kanno, Y. and Matsui, Y. (1968). Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium. *Nature* **218,** 775-776.

Kapoor, P., Saunders, M.M., Li, Z., Zhou, Z., Sheaffer, N., Kunze, E.L., *et al.* (2004). Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int. J. Cancer.* **111,** 693-697.

Kausch, I., Doehn, C. and Jocham, D. (2006). Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **6,** 1301-1311.

Kelsell, D., Di, W.L. and Houseman, M. (2001). Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.* **68,** 559-568.

Kendall, D.A. and MacDonald, R.C. (1982). A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J. Biol. Chem.* **257,** 13892-13895.

King, T.J. and Bertram, J.S. (2005). Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1719,** 146-160.

King, T.J., Fukushima, L.H., Donlon, T.A., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A. and Bertram, J.S. (2000a). Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. *Carcinogenesis* **21,** 311-315.

King, T.J., Fukushima, L.H., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A., Sakr, W.A. and Bertram, J.S. (2000b). Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis* **21,** 1097-1109.

Knosel, T., Emde, A., Schluns, K., Chen, Y., Jurchott, K., Krause, M., *et al.* (2005). Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer. *Neoplasia* **7,** 741-747.

Koenig, F., Knittel, J., Schnieder, L., George, M., Lein, M. and Schnorr, D. (2003). Confocal laser scanning microscopy of urinary bladder after intravesical instillation of a fluorescent dye. *Urology* **62,** 158-161.

Köster, M., Frahm, T. and Hauser, H. (2005). Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP technologies. *Current Opinion in Biotechnology* **16,** 28-34.

Kovacs, J.A., Baker, K.A., Altenberg, G.A., Abagyan, R. and Yeager, M. (2007). Molecular modeling and mutagenesis of gap junction channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 15-28.

Krutovskikh, V., Asamoto, M., Takasuka, N., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. (1997). Differential Dose-dependent Effects of Carotenes and Lycopene on Gap-junctional Intercellular Communication in Rat Liver in vivo. *Cancer Sci.* **88,** 1121-1124.

Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.M., Mesnil, M., *et al.* (1994). Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int. J. Cancer* **56,** 87-94.

Krutovskikh, V.A., Mesnil, M., Mazzoleni, G. and Yamasaki, H. (1995). Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *Lab. Invest.* **72,** 571-577.

Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* **103,** 767-776.

Kyo, N., Yamamoto, H., Takeda, Y., Ezumi, K., Ngan, C.Y., Terayama, M., *et al.* (2008). Overexpression of connexin 26 in carcinoma of the pancreas. *Oncol. Rep.* **19,** 627-631.

Laemmel, E., Genet, M., Le Goualher, G., Perchant, A., Le Gargasson, J.F. and Vicaut, E. (2004). Fibered Confocal Fluorescence Microscopy (Cell-viZio) Facilitates Extended Imaging in the Field of Microcirculation. *J. Vasc. Res.* **41,** 400-411.

Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **394,** 527-543.

Laird, D.W., Fistouris, P., Batist, G., Alpert, L., Huynh, H.T., Carystinos, G.D. and Alaoui-Jamali, M.A. (1999). Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* **59,** 4104 - 4110.

Lampe, P.D., Kurata, W.E., Warn-Cramer, B.J. and Lau, A.F. (1998). Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J. Cell Sci.* **111,** 833-841.

Lampe, P.D. and Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36,** 1171-1186.

Lau, D.P., Huang, Z., Lui, H., Man, C.S., Berean, K., Morrison, M.D. and Zeng, H. (2003). Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings. *Lasers Surg. Med.* **32,** 210-214.

Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C. and Falk, M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99,** 10446-10451.

Leithe, E., Sirnes, S., Omori, Y. and Rivedal, E. (2006). Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Crit. Rev. Oncog.* **12,** 225-256.

Levin, M. (2007). Gap junctional communication in morphogenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 186-206.

Lin, J.H., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., *et al.* (2002). Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J. Neurosci.* **22,** 4302-4311.

Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2,** 444-456.

Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J., Steel, K.P. and Brown, S.D. (1997). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* **16,** 188-190.

Loewenstein, W.R. (1966). Permeability of membrane junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **137,** 441-472.

Loewenstein, W.R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* **560,** 1-65.

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

Loewenstein, W.R. and Kanno, Y. (1967). InterceIlular communication and tissue growth: I. Cancerous growth *J. Cell Biol.* **33,** 225-234.

Loewenstein, W.R. and Rose, B. (1992). The cell-cell channel in the control of growth. *Semin. Cell Biol.* **3,** 59-79.

Lovat, L.B., Johnson, K., Mackenzie, G.D., Clark, B.R., Novelli, M.R., Davies, S., *et al.* (2006). Elastic scattering spectroscopy accurately detects high grade dysplasia and cancer in Barrett's oesophagus. *Gut* **55,** 1078-1083.

Lyng, F.M., de Feijter-Rupp, H.L., Hayashi, T., O'Malley, K., Murphy, D.M., Cottell, D.C., *et al.* (1996). Effect of a tobacco-related nitrosamine on intercellular communication in human urothelial cells: a possible factor in smoking-related bladder carcinogenesis. *Oncol. Res.* **8,** 371-378.

MacAulay, C., Lane, P. and Richards-Kortum, R. (2004). *In vivo* pathology: microendoscopy as a new endoscopic imaging modality. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **14,** 595-620.

Makowski, L., Caspar, D.L.D., Phillips, W.C. and Goodenough, D.A. (1977). Gap junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* **74,** 629-645.

Mang, T., Kost, J., Sullivan, M. and Wilson, B.C. (2006). Autofluorescence and Photofrin-induced fluorescence imaging and spectroscopy in an animal model of oral cancer. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **3,** 168-176.

Manjunath, C.K., Goings, G.E. and Page, E. (1985). Proteolysis of cardiac gap junctions during their isolation from rat hearts. *J. Membr. Biol.* **85,** 159-168.

Manyak, M.J., Gladkova, N.D., Makari, J.H., Schwartz, A.M., Zagaynova, E.V., Zolfaghari, L., *et al.* (2005). Evaluation of superficial bladder transitional-cell carcinoma by optical coherence tomography. *J. Endourol.* **19,** 570-574.

Martin, P.E. and Evans, W.H. (2004). Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc. Res.* **62,** 378-387.

Martin, P.E.M., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R.J. and Evans, W.H. (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.

Martinez, A.D., Hayrapetyan, V., Moreno, A.P. and Beyer, E.C. (2003). A Carboxyl Terminal Domain of Connexin43 Is Critical for Gap Junction Plaque Formation but not for Homo- or Hetero-Oligomerization. *Cell Comm. Adhes.* **10,** 323 - 328.

Matthews and Favard (2007). Théorie, principes et applications des techniques de fluorescence en biologie cellulaire et cancérologie. *Bull. cancer* **94,** 115-125.

Mayinger, B., Jordan, M., Horner, P., Gerlach, C., Muehldorfer, S., Bittorf, B.R., *et al.* (2003). Endoscopic light-induced autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of colorectal cancer and adenoma. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **70,** 13-20.

Mayinger, B., Neumann, F., Kastner, C., Degitz, K., Hahn, E.G. and Schwab, D. (2008). Early detection of premalignant conditions in the colon by fluorescence endoscopy using local sensitization with hexaminolevulinate. *Endoscopy* **40,** 106-109.

Mazet, V. (2005) Développement de méthodes de traitement de signaux spectroscopiques : estimation de la ligne de base et du spectre de raies. Nancy, Université Henri Poincaré

McLaren, W.J., Anikijenko, P., Thomas, S.G., Delaney, P.M. and King, R.G. (2002). In vivo detection of morphological and microvascular changes of the colon in association with colitis using fiberoptic confocal imaging (FOCI). *Dig. Dis. Sci.* **47,** 2424-2433.

Meda, P. (1996). Connexines, canaux jonctionnels et communication cellulaire. *Med. Sci.* **12,** 909-920.

Mehta, P.P., Perez-Stable, C., Nadji, M., Mian, M., Asotra, K. and Roos, B.A. (1999). Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev. Genet.* **24,** 91-110.

Mesnil, M. (2002). Connexins and cancer. *Biol. Cell* **94,** 493-500.

Mesnil, M. (2004). [Gap junctions and cancer: implications and perspectives]. *Med. Sci.* **20,** 197-206.

Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J.-L. and Zaidan-Dagli, M.-L. (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1719,** 125-145.

Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Elfgang, C., Traub, O., Willecke, K. and Yamasaki, H. (1995). Negative Growth Control of HeLa Cells by Connexin Genes: Connexin Species Specificity. *Cancer Res.* **55,** 629-639.

Milks, L.C., Kumar, N.M., Houghten, R., Unwin, N. and Gilula, N.B. (1988). Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* **7,** 2967-2975.

Momiyama, M., Omori, Y., Ishizaki, Y., Nishikawa, Y., Tokairin, T., Ogawa, J. and Enomoto, K. (2003). Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci.* **94,** 501-507.

Mordon, S. (2000). Imagerie medicale: les techniques photoniques. *ITBM-RBM* **21,** 196-204.

Mordon, S., Maunoury, V., Bulois, P., Desreumaux, P. and Colombel, J.-F. (2005). La tomographie par cohérence optique en gastroentérologie. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **29,** 618-620.

Moreno, A.P. and Lau, A.F. (2007). Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **94,** 107-119.

Morley, G.E., Taffet, S.M. and Delmar, M. (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* **70,** 1294-1302.

Morris, H.P., Sidransky, H., Wagner, B.P. and Dyer, H.M. (1960). Some Characteristics of Transplantable Rat Hepatoma No. 5123 Induced by Ingestion of N-(2-fluorenyl)phthalamic Acid. *Cancer Res.* **20,** 1252-.

Muller, D.J., Hand, G.M., Engel, A. and Sosinsky, G.E. (2002). Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. *EMBO J.* **21,** 3598-3607.

Murray, A.W. and Fitzgerald, D.J. (1979). Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91,** 395-401.

Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. and Goodenough, D.A. (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.* **111,** 2077-2088.

Musil, L.S. and Goodenough, D.A. (1991a). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* **115,** 1357-1374.

Musil, L.S. and Goodenough, D.A. (1991b). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* **115,** 1357-1374.

Musil, L.S. and Goodenough, D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* **74,** 1065-1077.

Na, H.K., Wilson, M.R., Kang, K.S., Chang, C.C., Grunberger, D. and Trosko, J.E. (2000). Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line. *Cancer Lett.* **157,** 31-38.

Naoi, Y., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Kim, S.J., Arai, T., Maruyama, N., *et al.* (2008). Connexin26 expression is associated with aggressive phenotype in human papillary and follicular thyroid cancers. *Cancer Lett.* **262,** 248-256.

Naoi, Y., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Kim, S.J., Arai, T., Tamaki, Y. and Noguchi, S. (2007). Connexin26 expression is associated with lymphatic vessel invasion and poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **106,** 11-17.

Nicolai, S., Sies, H. and Stahl, W. (1997). Stimulation of gap junctional intercellular communication by thalidomide and thalidomide analogs in human skin fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* **53,** 1553-1557.

Nicolson, G.L., Dulski, K.M. and Trosko, J.E. (1988). Loss of Intercellular Junctional Communication Correlates with Metastatic Potential in Mammary Adenocarcinoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85,** 473-476.

Nielsen, M., Ruch, R.J. and Vang, O. (2000). Resveratrol Reverses Tumor-Promoter-Induced Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275,** 804-809.

Nitsche, J.M., Chang, H.-C., Weber, P.A. and Nicholson, B.J. (2004). A Transient Diffusion Model Yields Unitary Gap Junctional Permeabilities from Images of Cell-to-Cell Fluorescent Dye Transfer Between Xenopus Oocytes. *Biophys. J.* **86,** 2058-2077.

Novikoff, A.B. (1955). Some aspects of hepatoma NK. *J. Natl. Cancer Inst.* **15,** 1533-1534.

Ogawa, T., Hayashi, T., Kyoizumi, S., Ito, T., Trosko, J.E. and Yorioka, N. (1999). Up-regulation of gap junctional intercellular communication by hexamethylene

bisacetamide in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Lab. Invest.* **79,** 1511-1520.

Oh, S., Rivkin, S., Tang, Q., Verselis, V.K. and Bargiello, T.A. (2004). Determinants of Gating Polarity of a Connexin 32 Hemichannel. *Biophys. J.* **87,** 912-928.

Okada, M. and Ishidate, M. (1977). Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and its analogues. Selective induction of urinary bladder tumours in the rat. *Xenobiotica* **7,** 11-24.

Omori, Y., Zaidan Dagli, M.L., Yamakage, K. and Yamasaki, H. (2001). Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. *Mutat. Res.* **477,** 191-196.

Oyamada, M., Oyamada, Y. and Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1719,** 6-23.

Pataki, A., Muller, K., Green, J.R., Ma, Y.F., Li, Q.N. and Jee, W.S. (1997). Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* **249,** 458-468.

Paul, D.L. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* **103,** 123-134.

Paznekas, W., Boyadjiev, S., Shapiro, R., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C., *et al.* (2003). Connexin 43 (GJA1) Mutations Cause the Pleiotropic Phenotype of Oculodentodigital Dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* **72,** 408-418.

Penn, R.D. (1966). Ionic communication between liver cells. *J. Cell Biol.* **29,** 171-174.

Perelman, L.T. (2006). Optical diagnostic technology based on light scattering spectroscopy for early cancer detection. *Expert Rev. Med. Devices* **3,** 787-803.

Pery E. (2007) Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancers. Nancy Université-INPL.

Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P. and Di Lisa, F. (1999). Transient and Long-Lasting Openings of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Can Be Monitored Directly in Intact Cells by Changes in Mitochondrial Calcein Fluorescence. *Biophys. J.* **76,** 725-734.

Pollmann, M.-A., Shao, Q., Laird, D. and Sandig, M. (2005). Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res.* **7,** R522 - R534.

Qin, H., Shao, Q., Curtis, H., Galipeau, J., Belliveau, D.J., Wang, T., *et al.* (2002). Retroviral Delivery of Connexin Genes to Human Breast Tumor Cells Inhibits in Vivo Tumor Growth by a Mechanism That Is Independent of Significant Gap Junctional Intercellular Communication. *J. Biol. Chem.* **277,** 29132-29138.

Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S.A., Alaoui-Jamali, M.A. and Laird, D.W. (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.

Ramanujam, N. (2000). Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia* **2,** 89-117.

Rancourt (2003). Delivery of herpes simplex thymidine kinase bystander effect by engineered human mesothelial cells for the treatment of ovarian cancer. *Cytotherapy* **5,** 509 - 522.

Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., *et al.* (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* **267,** 1831-1834.

Reits, E.A. and Neefjes, J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* **3,** E145-147.

Ren, P., de Feijter, A.W., Paul, D.L. and Ruch, R.J. (1994). Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis* **15,** 1807-1813.

Revel, J.P. and Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* **33,** C7-12.

Ridgway, J.M., Armstrong, W.B., Guo, S., Mahmood, U., Su, J., Jackson, R.P., *et al.* (2006). In Vivo Optical Coherence Tomography of the Human Oral Cavity and Oropharynx. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **132,** 1074-1081.

Risek, B., Guthrie, S., Kumar, N. and Gilula, N.B. (1990). Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J. Cell Biol.* **110,** 269-282.

Robertson, J.D. (1963). The occurence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell Biol.* **19,** 201-221.

Rogers, M., Berestecky, J.M., Hossain, M.Z., Guo, H.M., Kadle, R., Nicholson, B.J. and Bertram, J.S. (1990). Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Mol. Carcinog.* **3,** 335-343.

Rosendaal, M., Green, C.R., Rahman, A. and Morgan, D. (1994). Up-regulation of the connexin43+ gap junction network in haemopoietic tissue before the growth of stem cells. *J. Cell Sci.* **107,** 29-37.

Rubin, J.B., Verselis, V.K., Bennett, M.V.L. and Bargiello, T.A. (1992). A Domain Substitution Procedure and its use to Analyze Voltage Dependence of Homotypic Gap Junctions Formed by Connexins 26 and 32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89,** 3820-3824.

Ruch, R.J. (1994). The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **24,** 216-231.

Ruch, R.J., Madhukar, B.V., Trosko, J.E. and Klaunig, J.E. (1993). Reversal of ras-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication, transformation, and tumorigenesis by lovastatin. *Mol. Carcinog.* **7,** 50-59.

Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D. and Beyer, E.C. (2003). Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol. Rev.* **83,** 1359-1400.

Sai, K., Kanno, J., Hasegawa, R., Trosko, J.E. and Inoue, T. (2000). Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis* **21,** 1671-1676.

Saito-Katsuragi, M., Asada, H., Niizeki, H., Katoh, F., Masuzawa, M., Tsutsumi, M., *et al.* (2007). Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* **110,** 1162-1172.

Saltzman, W.M., Radomsky, M.L., Whaley, K.J. and Cone, R.A. (1994). Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys. J.* **66,** 508-515.

Sandmair, A.-M., Loimas, S., Puranen, P., Immonen, A., Kossila, M., Puranen, M., *et al.* (2000). Thymidine Kinase Gene Therapy for Human Malignant Glioma, Using Replication-Deficient Retroviruses or Adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* **11,** 2197-2205.

Sarma, J.D., Wang, F. and Koval, M. (2002). Targeted Gap Junction Protein Constructs Reveal Connexin-specific Differences in Oligomerization. *J. Biol. Chem.* **277,** 20911-20918.

Saunders, M.M., Seraj, M.J., Li, Z., Zhou, Z., Winter, C.R., Welch, D.R. and Donahue, H.J. (2001). Breast Cancer Metastatic Potential Correlates with a Breakdown in

Homospecific and Heterospecific Gap Junctional Intercellular Communication. *Cancer Res.* **61,** 1765-1767.

Schneider, B., Teschner, M., Sudermann, T., Pikula, B. and Lautermann, J. (2002). Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* **64,** 324-329.

Segretain, D. and Falk, M.M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1662,** 3-21.

Sharman, W.M., Allen, C.M. and van Lier, J.E. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* **319,** 376-400.

Shim, M.G., Song, L.M., Marcon, N.E. and Wilson, B.C. (2000). In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. *Photochem. Photobiol.* **72,** 146-150.

Sigler, K. and Ruch, R.J. (1993). Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea. *Cancer Letters* **69,** 15-19.

Silva, J.N., Filipe, P., Morliere, P., Maziere, J.C., Freitas, J.P., Cirne de Castro, J.L. and Santus, R. (2006). Photodynamic therapies: principles and present medical applications. *Biomed. Mater. Eng.* **16,** S147-154.

Sjostrand, F.S., Andersson-Cedergren, E. and Dewey, M.M. (1958). The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J. Ultrastruct. Res.* **1,** 271-287.

Sjostrand, F.S. and Andersson, E. (1954). Electron microscopy of the intercalated discs of cardiac muscle tissue. *Experientia* **10,** 369-370.

Söhl, G. and Willecke, K. (2003). An Update on Connexin Genes and their Nomenclature in Mouse and Man. *Cell Communication & Adhesion* **10,** 173 - 180.

Söhl, G. and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **62,** 228-232.

Solan, J.L. and Lampe, P.D. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1711,** 154-163.

Soroceanu, L., Manning, T.J., Jr. and Sontheimer, H. (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* **33,** 107-117.

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

Stewart, W.W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* **14,** 741-759.

Studeny, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J. and Andreeff, M. (2002). Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon-{beta} Delivery into Tumors. *Cancer Res.* **62,** 3603-3608.

Su, Y.A., Bittner, M.L., Chen, Y., Tao, L., Jiang, Y., Zhang, Y., *et al.* (2000). Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. *Mol. Carcinog.* **28,** 119-127.

Sung, K.B., Liang, C., Descour, M., Collier, T., Follen, M., Malpica, A. and Richards-Kortum, R. (2002). Near real time in vivo fibre optic confocal microscopy: sub-cellular structure resolved. *J. Microsc.* **207,** 137-145.

Swenson, K.I., Piwnica-Worms, H., McNamee, H. and Paul, D.L. (1990). Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regul.* **1,** 989-1002.

Swindle, L.D., Thomas, S.G., Freeman, M. and Delaney, P.M. (2003). View of normal human skin in vivo as observed using fluorescent fiber-optic confocal microscopic imaging. *J. Invest. Dermatol.* **121,** 706-712.

Takahashi, C., Kikuchi, N., Katou, N., Miki, T., Yanagida, F. and Umeda, M. (1995). Possible anti-tumor-promoting activity of components in Japanese soybean fermented food, Natto: effect on gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* **16,** 471-476.

Tan, J., Delaney, P. and McLaren, W.J. (2007). Confocal endomicroscopy: a novel maging technique for in vivo histology of cervical intraepithelial neoplasia. *Expert Rev. Med. Devices* **4,** 863-871.

Teh, S.K., Zheng, W., Ho, K.Y., Teh, M., Yeoh, K.G. and Huang, Z. (2008). Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. *Br. J. Cancer* **98,** 457-465.

Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.-D., Nelles, E., Schwarz, M. and Willecke, K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Current Biology* **7,** 713-716.

Thiberville, L., Moreno-Swirc, S., Vercauteren, T., Peltier, E., Cave, C. and Bourg Heckly, G. (2007). In Vivo Imaging of the Bronchial Wall Microstructure Using Fibered Confocal Fluorescence Microscopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175,** 22-31.

Thiberville, L., Salun, M., Corne, F. and Bota, S. (2006). [Diagnosis of lung cancer. Fluorescence bronchoscopy]. *Rev. Mal. Respir.* **23,** 16S17-16S22.

Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hulser, D. and Willecke, K. (1989). Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* **108,** 1039-1051.

Traub, O., Look, J., Paul, D. and Willecke, K. (1987). Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **43,** 48-54.

Trosko, J.E. (2007). Gap junctional intercellular communication as a biological "rosetta stone" in understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy. *J. Membr. Biol.* **218,** 93-100.

Trosko, J.E. and Ruch, R.J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* **3,** d208-236.

Trosko, J.E. and Ruch, R.J. (2002). Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr. Drug Targets* **3,** 465-482.

Ueda, F., Ban, K. and Ishima, T. (1995). Irsogladine activates gap-junctional intercellular communication through M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274,** 815-819.

Uhl, M., Weiler, M., Wick, W., Jacobs, A.H., Weller, M. and Herrlinger, U. (2005). Migratory neural stem cells for improved thymidine kinase-based gene therapy of malignant gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328,** 125-129.

Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B. and Yeager, M. (1999). Three-Dimensional Structure of a Recombinant Gap Junction Membrane Channel. *Science* **283,** 1176-1180.

Van Velthoven, M.E.J., Faber, D.J., Verbraak, F.D., van Leeuwen, T.G. and de Smet, M.D. (2007). Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **26,** 57-77.

VanSlyke, J.K. and Musil, L.S. (2000). Analysis of Connexin Intracellular Transport and Assembly. *Methods* **20,** 156-164.

Veenstra, R.D. (1996). Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28,** 327-337.

Verselis, V.K., Ginter, C.S. and Bargiello, T.A. (1994). Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* **368,** 348-351.

Vinken, M., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Snykers, S., Henkens, T. and Rogiers, V. (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell. Signal.* **18,** 592-600.

Wade, M.H., Trosko, J.E. and Schindler, M. (1986). A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* **232,** 525-528.

Warn-Cramer, B.J., Lampe, P.D., Kurata, W.E., Kanemitsu, M.Y., Loo, L.W.M., Eckhart, W. and Lau, A.F. (1996). Characterization of the Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on the Connexin-43 Gap Junction Protein. *J. Biol. Chem.* **271,** 3779-3786.

Wei, C.-J., Xu, X. and Lo, C.W. (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20,** 811-838.

Weidmann, S. (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol.* **118,** 348-360.

White, J. and Stelzer, E. (1999a). Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* **9,** 61-65.

White, T.W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L. and Goodenough, D.A. (1994). Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* **125,** 879-892.

White, T.W. and Paul, D.L. (1999b). Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu. Rev. Physiol.* **61,** 283-310.

White, T.W., Paul, D.L., Goodenough, D.A. and Bruzzone, R. (1995). Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell.* **6,** 459-470.

Wilgenbus, K.K., Kirkpatrick, C.J., Knuechel, R., Willecke, K. and Traub, O. (1992). Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer.* **51,** 522-529.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., *et al.* (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* **383,** 725-737.

Willecke, K., Eiberger, J. and Maltzahn, J. (2005) Connexin and Pannexin Genes in the Mouse and Human Genome. In *Gap Junctions in Development and Disease*, Springer (ed.). Berlin Heidelberg, pp. 1-12.

Yancey, S.B., John, S.A., Lal, R., Austin, B.J. and Revel, J.P. (1989). The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. *J. Cell Biol.* **108,** 2241-2254.

Yeager, M. and Nicholson, B.J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 183-192.

Yotti, L.P., Chang, C.C. and Trosko, J.E. (1979). Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* **206,** 1089-1091.

Yum, S.W., Zhang, J., Valiunas, V., Kanaporis, G., Brink, P.R., White, T.W. and Scherer, S.S. (2007). Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **293,** C1032-1048.

Zaidan Dagli, M.L. and Hernandez-Blazquez, F.J. (2007). Roles of Gap Junctions and Connexins in Non-Neoplastic Pathological Processes in which Cell Proliferation Is Involved. *J. Membr. Biol.* **218,** 79-91.

Zhang, L.-X., Cooney, R.V. and Bertram, J.S. (1992). Carotenoids Up-Regulate Connexin43 Gene Expression Independent of Their Provitamin A or Antioxidant Properties. *Cancer Res.* **52,** 5707-5712.

Zhang, W., Couldwell, W.T., Simard, M.F., Song, H., Lin, J.H.C. and Nedergaard, M. (1999). Direct Gap Junction Communication between Malignant Glioma Cells and Astrocytes. *Cancer Res.* **59,** 1994-2003.

Zhang, X. and Takenaka, I. (1998a). Apoptosis and carcinogenesis: morphologic observations in the rat bladder treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Int. J. Urol.* **5,** 262-267.

Zhang, Y.-W., Kaneda, M. and Morita, I. (2003). The Gap Junction-independent Tumor-suppressing Effect of Connexin 43. *J. Biol. Chem.* **278,** 44852-44856.

Zhang, Z.Q., Lin, Z.X. and Lu, Y.Y. (1994). [Studies on the reduction of malignant phenotypes in a highly metastatic human lung carcinoma--correlated changes of intercellular communication, cytoskeletons, oncogenes and antioncogene]. *Chin. J. Oncol.* **16,** 88-92.

Zhang, Z.Q., Zhang, W., Wang, N.Q., Bani-Yaghoub, M., Lin, Z.X. and Naus, C.C. (1998b). Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis* **19,** 1889-1894.

Zhiwei Huang, McWilliams, A., I., H.L.D., Stephen, M. and Zeng, L.H. (2003). Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *Int. J. Cancer* **107,** 1047-1052.

Zhou, L. and Griffin, J.W. (2003). Demyelinating neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* **16,** 307-313.

VIII ANNEXES

VIII.1 PROCEEDINGS SPIE

IN VITRO CHARACTERIZATION OF GAP JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION BY GAP-FRAP TECHNIQUE

M. Abbaci [1], J-R. Stines [1], M. Barberi-Heyob [1], W. Blondel [2], D. Dumas [3], F. Guillemin[1]and J. Didelon [1]

[1] Centre Alexis Vautrin, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, France;
[2] UHP- Nancy 1, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy;
[3] UHP- Nancy 1, LEMTA - UMR 7563 CNRS-INPL-UHP et IFR 111, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy.

ABSTRACT

Gap junctional intercellular communication (GJIC) has been shown to be involved in the carcinogenesis process. Gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) technique could be used to estimate gap junctions functionality and their potential involvement for distinguish normal and cancer cells. In this study, the gap-FRAP technique was used to analyse functional gap-junction-mediated communication for cell lines with different GJIC status. Gap-FRAP data and connexin 43 protein expression decreased for FaDu cancer cell line, in contrast to fibroblast and KB positives cell lines. To check the involvement and functionality of gap junctions in the restitution of the fluorescence after photobleaching, we used a gap junction channel inhibition assay with 18 α-glycyrrhetinic acid. Our results indicate that the degree of gap junctional intercellular communication could be estimated by this technique *in vitro.*

Keywords: gap junction, gap-FRAP, connexin 43

INTRODUCTION

Gap junction channels provide a direct intercellular communication. The juxtaposition of two half channels, called connexons, constitutes this junction. Each connexon is inserted into the cytoplasmic membrane of two neighbouring cells. It is made of six protein sub-units called connexins (Cx) [1]. The family of the Cx is composed of 21 types of proteins classified according to their molecular weight [2]. The Cx43 is the protein sub-unit the most extensively expressed in human tissues. A link between an impairment of intercellular communication and the process of carcinogenesis seems to be defined. In fact, the majority of malignant cells are characterized by a decrease of the number and functionality of gap junctions, compared to their healthy counterparts [3, 4]. The distinction between cancerous and healthy cell populations appears possible in studying functionality of gap junction channels.

We used the gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) technique which enlarges the FRAP technique to study the functionality of gap junctional intercellular communication channels [5]. After exposure with a specific fluorescent tracer *in vitro*, a gradient of concentration is generated, followed by a light irradiation leading to dye photobleaching in the targeted cell. If the tracer is hydrophilic and its molecular weight lower than 1.2 kDa, the relaxation of concentration gradient means that the dye intercellular flux was made by gap junctions [6].

In this study, we have used FRAP approach, which has been validated as a reliable technique to analyse functional gap-junction-mediated communication, because of several advantages that it offers over alternative techniques. To investigate the relationship between intercellular communication of fibroblast cells and two head and neck carcinoma cell lines, FRAP was used to detect function of gap junctional intercellular communication (GJIC).

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Culture media and additives were obtained from life technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) except for foetal calf serum (FCS), which was obtained from Costar. 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Anti-Cx43 mouse monoclonal antibody (reference number 13-8300) and Cy5-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin serum were provided from Zymed Laboratories Inc (Clinisciences, Montrouge, France).
All others chemicals were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

CELL LINES AND CELL CULTURE

FaDu and KB, human head and neck carcinoma cell lines were obtained from Pr. A. Hanauske as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. Fibroblast cells (CCD-1137Sk) were provided from ATCC (CRL 2703). Cancer cell lines were grown in 75cm^2 and fibroblasts in 175 cm^2 plastic tissue culture flasks. All cell lines were grown in RPMI 1640 complemented with 9% of heat inactivated fetal calf serum, 1% of L-Glutamine and 1% of penicilline/streptomycine.
The co-culture (fibroblast and FaDu) was optimized with a fixed number of fibroblasts (1.10^5 cells/mL), mixed with FaDu at a cell number *ratio* of 1:1 and 1:0.5, and cultured for 48 h [7].

IMMUNOCYTOCHEMISTRY FOR CX43 DETECTION

Cells were plated on 8-well glass chamber slides at 3.10^{4}cells/mL Cultures were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and then permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 15 min. The cells were incubated with $^1/_{50}$ dilution of anti-Cx43 mouse monoclonal antibody for 45 min, specific for the nonphosphorylated form of Cx43 followed by Cy5-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin serum exposure for 45 min. Cultures were analysed with a confocal microscope (SP2-AOBS Leica TCS SP2-AOBS, Germany).

GAP-FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING (GAP-FRAP)

The cells were loaded for 15 min at 37°C with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (5,6 CFDA, 6µg/mL). Inside the cells, the dye is retained due to the hydrolysis by cytoplasmic esterases (Fig. 1) into 5(6)- carboxyfluorescein (5,6 CF) [8].

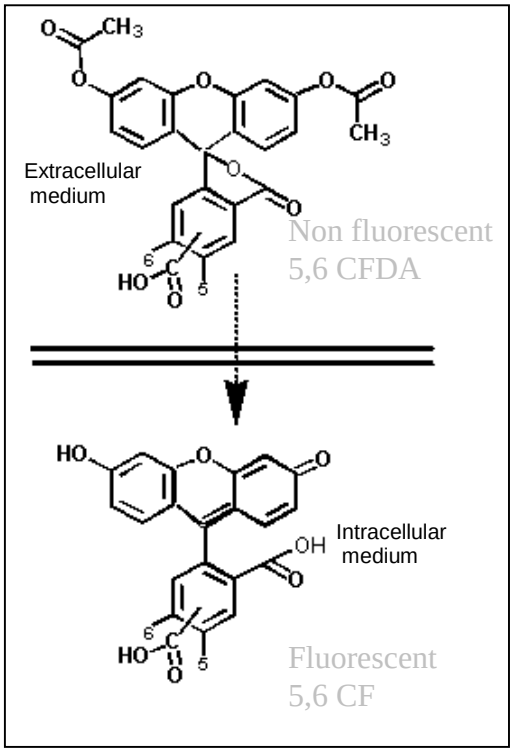

Figure 1: Hydrolysis of 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (5,6 CFDA) into 5(6)-carboxyfluorescein (5,6 CF).

FRAP was achieved using a confocal laser scanning microscope (SP2-AOBS Leica TCS SP2-AOBS, Germany), constituted by a reversed microscope (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B) equipped with an argon laser source

at 488nm. The intensity of the fluorescence signal was measured between 500 and 560 nm (emission band-pass filter) with an objective 63X (oil/1.32 NA). The laser power was measured in the focus plane by a power meter (Newport models 2835-C). The laser output power was adjusted to 65 µW during 45 s and 13 µW during 15 min for cells photobleaching and fluorescence recovery analysis, respectively.

The exponential fluorescence recovery for bleached cells was analyzed by perturbation-relaxation equation [9], fitting the function with nonlinear least squares fitter for normalized experimental data:

$$F(t) = Fo + (F\infty - Fo)(1 - e^{-t/\tau}) \qquad (1)$$

F(t) is the normalized fluorescence intensity at time t after photobleaching, $F\infty$ is the asymptotic value to which the fluorescence intensity recovers, *Fo i*s the theoretic fluorescence intensity estimated at t=0s after photobleaching which is closed to its experimental value taking into account the fitting quality (R^2 >0.98) and τ is time constant.

Then, knowing the fluorescence intensity before photobleaching *Fi* , we can calculate the mobile fraction (R) according to [10]:

$$R = \frac{F\infty - Fo}{Fi - Fo} \qquad (2)$$

GAP JUNCTION CHANNEL INHIBITION ASSAY

Inhibition of gap junctional communication has been reported using 18α acid glycyrrhetinic (18α-GA) [11]. 18α-GA was added to culture medium at 100 µM after 5,6 CFDA exposure. Gap-FRAP measurements were initiated 20 min after the treatment with 18α-GA. Measurements were done without washing the medium. The measure of control is performed on cells of the neighbouring well having been marked 5,6 CFDA, without addition of inhibitor.

STATISTICAL ANALYSIS

Mann and Whitney U test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS AND DICUSSION

Healthy cells displayed a significantly higher expression of Cx43 than KB or FaDu cancer cell lines (p=0.0052; p=0.0002, respectively; Fig.2A). Fluorescence emission values, corresponding to Cx43 protein expression, appeared restricted to the perinuclear compartment with no detectable membrane staining observed for FaDu cells. The Cx43 staining was shown in the cytoplasmic membrane and inside the cytoplasm compartment for fibroblasts. Surprisingly, the Cx43 protein expression was also evidenced in KB intercellular communication (data not shown).

In the coculture experimentations, we showed a distinct difference of Cx43 cellular distribution between fibroblasts and FaDu cell lines (Fig.2B), in accordance with their Cx43 expression levels (Fig.2A).

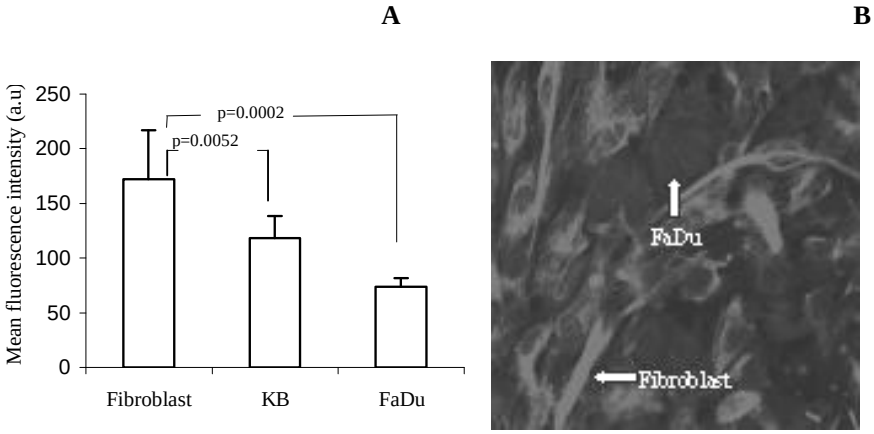

Figure 2: Variations of mean fluorescence intensity by immunofluorescence detection of Cx43 for different cell types (mean ± S.D. of 10 independent experiments) **(A)**. Distribution of Cx43 staining in the case of a coculture between fibroblasts and FaDu cells **(B)**.

Figure 3 showed images from FaDu, KB and fibroblast cell lines, before photobleaching, just after and 15 min after photobleaching, respectively.

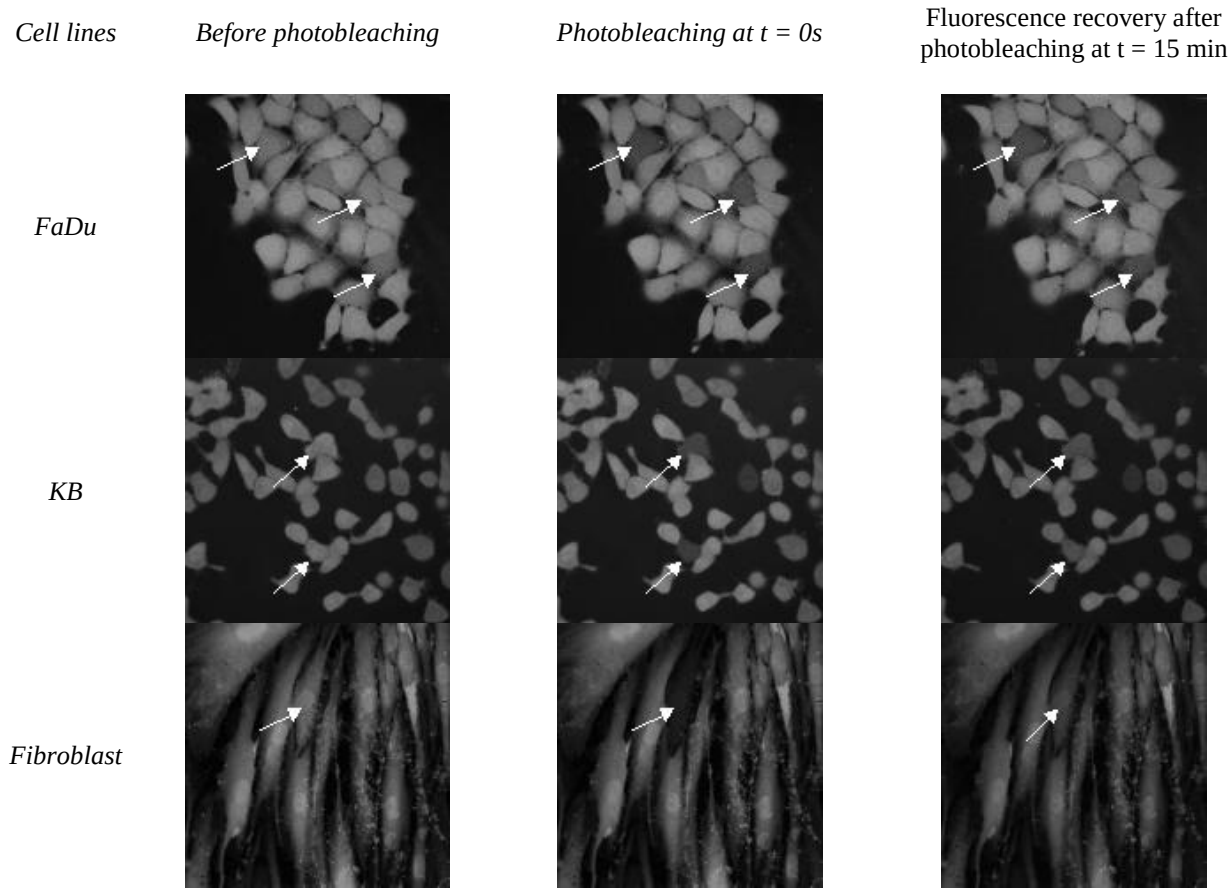

Figure 3: *Fluorescence images for FaDu, KB and fibroblast cell lines during gap-FRAP analysis.*

We observed qualitatively a weak recovery of fluorescence for bleached FaDu cells in comparison with the two others cell lines (Fig. 3). Variability of fluorescence intensity before photobleaching was measured in cells from the same cell line. It could be explain by the difference of no specific esterases activity.

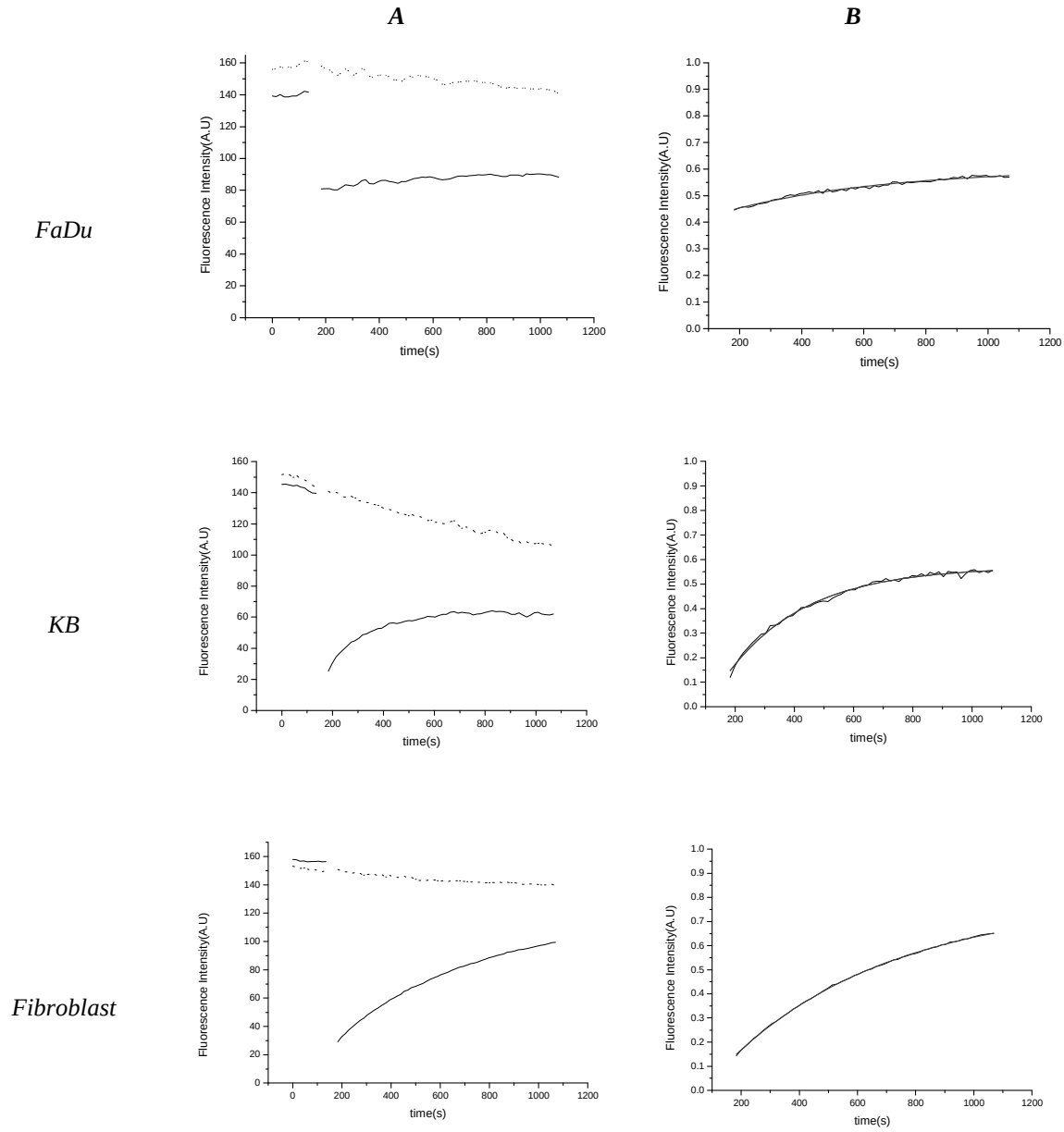

***Figure 4**: Fluorescence recovery curves of FaDu, KB and fibroblast cell lines.*
*Fluorescence recovery kinetics of non treated data displayed from target cells for each cell line (unbroken line). Dotted line corresponded to control cells **(A)**. The same fluorescence recovery kinetics obtained from a mathematical model (see materials & methods) after normalization and photobleaching correction during acquisition. Dark grey line corresponded to a fitting curve and black line to target cells **(B)**.*

We observed a decrease of fluorescence intensity from control cells during the fluorescence recovery measurements as shown in Fig.4A. This loss of fluorescence intensity is in relation with the laser irradiation needed to perform the measurements. To correct it for each experiment, fluorescence intensity of the target cell was divided by the fluorescence intensity of a control cell at each time. This corrected value of fluorescence allowed us to eliminate the photobleaching effect independent to gap-FRAP technique.
Fig. 4A showed typical 5.6 CF fluorescence recovery obtained from each cell line. Each curve was normalized and fitted to an exponential function as described in materials & methods.
We noticed a clear differentiation between the kinetics profiles corresponding to fluorescence recovery of FaDu cell line and both KB and fibroblast cell lines (Fig.4B).

Figure 5 summarizes data obtained by gap-FRAP analysis performed in fibroblast cells, KB and FaDu head and neck cancer cell lines. Fluorescence recovery for fibroblasts was on average about 2-fold higher compared to FaDu (p=0.0026). The mobile fraction values between FaDu and fibroblasts correlate with the variations in Cx43

staining and cellular distribution. However, the mobile fraction was comparable between fibroblasts and KB cancer cells, corroborating the Cx43 intercellular staining also obtained for this cell line. Cx43 expression is known to occur in phosphorylated as well as in nonphosphorylated forms and the state of phosphorylation can modulate Cx43 trafficking, assembly/disassembly in gap junctional plaques, turnover, degradation and gating [12]. We planned to assess Cx43 expression with polyclonal antibody that cross-reacts with both phosphorylated and non phosphorylated Cx43.

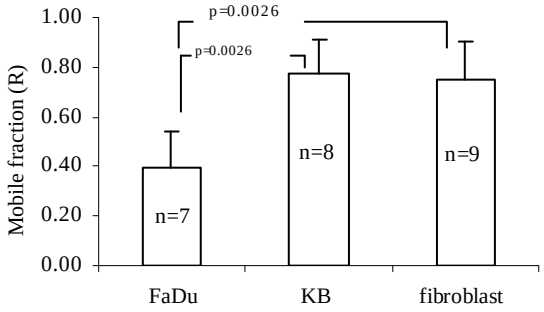

Figure 5: *Gap-FRAP measurements for FaDu, KB and fibroblasts cell lines with confocal microscopy.*

In order to validate the involvement and functionality of gap junctions in the restitution of the fluorescence after photobleaching (Fig. 3), we used a gap junction channel inhibition assay with 18α-GA (Fig. 6). After a 18α-GA fibroblasts exposure, mobile fraction was significantly 2.7-fold decreased (p=0.0054) (Fig. 7). 5,6 CF appeared as a good indicator of intercellular communication.

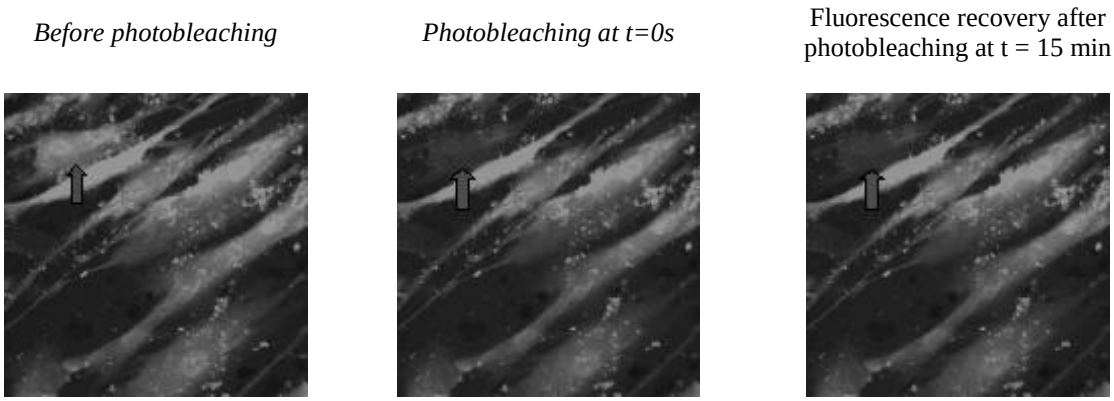

Figure 6: Images of fibroblast cells treated with a gap channel inhibitor (18αAG) by gap-FRAP technique.

Despite inhibition of intercellular junctional communication by 18α-GA, we noticed a residual fluorescence which could suggest a 5,6 CF efflux gap junctional intercellular communication-independent. To improve this point, another fluorescent dye as calcein-AM has to be tested [13].

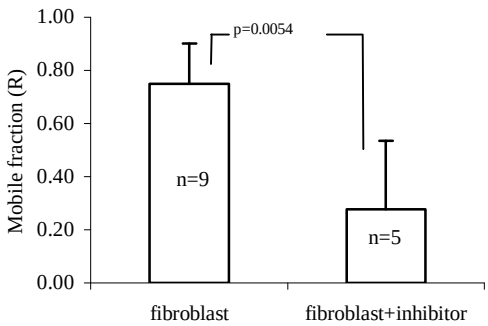

Figure7: Inhibition of gap junction intercellular communication by 18α-GA for fibroblast cells.

CONCLUSION

Both the mobile fraction and Cx43 staining decreased for FaDu cancer cell line, in contrast to normal cell line the fluorescence recovery rates increased in relation with Cx43 cell membrane expression. Moreover, gap junctional intercellular communication inhibition correlates with a decrease of the mobile fraction after photobleaching. FRAP is a non-invasive technique and thus, is expected to avoid some of the cell injuries that may occur during cell injections or manipulation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the French "Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains".

REFERENCES

[1] R. Bruzzone, TW. White, DA. Goodenough, "The cellular internet: on-line with connexins", *BioEssays* **18**, 709-718, 1996.
[2] G. Sohl, K. Willecke, "Gap junction and the connexin protein family", *Cardiovas Res*, **62**, 228-232, 2004.
[3] XD. Ma, X. Ma, YF. Sui, WL. Wang, CM.Wang, "Signal transduction of gap junctional genes, connexin 32, connexin 43 in human hepatocarcinogesis", *World J Gastroenterol*, **9**, 946-950, 2003.
[4] HB. Grossman, M. Liebert, IW. Lee, SW. Lee, "Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells", *Cancer Res*, **54**, 3062-3065, 1994.
[5] MH. Wade, JE. Trosko, M. Schindler, "A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells", *Science*, **232**, 525-528, 1986.
[6] J. Deleze, B. Delage, O. Hentati-Ksibi, F. Verrechia, JC. Herve, "Fluorescence Recovery After Photobleaching", *Methods Mol Biol*, **154**, 313-327, 2001.
[7] S Suzuki, M Sato, H Senoo, K Ishikawa, "Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in coculture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP", *Exp Cell Res*, **293**, 259-256, 2004.
[8] D. Hoefel, WL. Grooby, PT. Monis, S. Andrews, CP. Saint, "A comparative study of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity", *J Microbiol Methods*, **52**, 379-388, 2003.
[9] ED. Salmon, RJ. Leslie, WM Saxton, ML. Karow, JR. McIntosk, "Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching", *J Cell Biol*, **99**, 2164-2174, 1984.
[10] EAJ. Reits, JJ. Neefjes, "From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells", *Nat Cell Biol*, **3**, e145-e147, 2001.
[11] JS. Davidson, IM. Baumgarten, "Glycyrrhetinic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-Activity relationships", *J Pharmacol Exp Ther*, **246**, 1104-1107, 1988.
[12] JC. Saez, JA. Connor, DC. Spray, VL. Bennett, "Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and to calcium ions", *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 2708-2712, 1989.
[13] RP. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Product*s, *.9th Ed*., Molecular Probes, Eugene, OR, 2002.

VIII.2 ITBM-RBM

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT

ITBM-RBM 26 (2005) 279–281

ITBM RBM

http://france.elsevier.com/direct/RBMRET/

Forum de recherche en GBM

Optimisation instrumentale de la technique de Gap-FRAP visant à discriminer différents types cellulaires selon l'activité des jonctions communicantes

Instrumental optimization of Gap-FRAP technique related to gap junctions functionality for different cell types

J.R. Stines [a], M. Abbaci [a], W. Blondel [b], M. Barberi-Heyob [a], D. Dumas [c], F. Guillemin [a], J. Didelon [a,*]

[a] *CRAN-UMR CNRS 7039, centre de recherche en automatique de Nancy–CAV, centre Alexis-Vautrin, 54511 Vandoeuvre, France*
[b] *CRAN-UMR CNRS 7039, centre de recherche en automatique de Nancy–INPL, institut national polytechnique de Lorraine, 54511 Vandoeuvre, France*
[c] *LEMTA-UMR CNRS 7563 et équipe IFR 111, laboratoire de mécanique et ingénierie cellulaire et tissulaire, plateau technique d'imagerie cellulaire, faculté de médecine, 54511 Vandoeuvre, France*

Disponible sur internet le 06 juillet 2005

Abstract

Gap junctional intercellular communication has been shown to be involved in the carcinogenesis process. Gap-FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) technique could be used to estimate gap junctions functionality and their potential involvement for distinguish normal and cancer cells. We developed a sensitive microspectrofluorimetric method to characterize the kinetics of fluorescence recovery after photobleaching. We used a positive control cell line (fibroblast), a negative control (FaDu) and an intermediate (KB) head and neck cancer cell lines. Our results indicate that using our approach, the fluorescence kinetic profiles remain comparable with the method widely used by confocal microscopy.
© 2005 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

La communication intercellulaire se fait chez l'homme par l'intermédiaire de canaux transmembranaires appelés jonctions communicantes (*gap junctions*), reliant directement de cytoplasme à cytoplasme, deux cellules adjacentes [1]. La majorité des cellules cancéreuses présente une diminution du nombre et de la fonctionnalité des *gap junctions*, par comparaison à leurs homologues saines [2,3] accompagnée d'une plus importante prolifération cellulaire. Le lien présumé entre la perte de la communication intercellulaire et le processus de cancérogenèse, nous permet d'envisager le développement d'une technique spectrale qui discriminerait des populations saines et cancéreuses. L'objectif de cette étude a été de comparer les réponses des lignées cellulaires choisies sur deux instrumentations différentes.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : sfgbm@enst-bretagne.fr

1297-9562/$ - see front matter © 2005 Elsevier SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.rbmret.2005.06.015

2. Matériels et méthodes

2.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Nous avons utilisé des fibroblastes de type CCD1137Sk (ATCC CRL 2703), des FaDu (carcinome de pharynx humain, ATCC HTB 43) et des KB (carcinome épidermoïde de l'oropharynx, ATCC CCL 17). Les fibroblastes utilisés représentent dans ce travail, la lignée positive de référence en termes de communication intercellulaire via les *gap junctions* [4]. Nous avons préalablement montré que la lignée de fibroblastes exprimait un fort marquage membranaire en connexines (Cx) 43, par opposition à la lignée FaDu qui sera considérée comme notre lignée négative. Une distribution des Cx43 au niveau membranaire et cytoplasmique a été mise en évidence pour les KB. Les lignées ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), supplémenté à 9 % de sérum de veau fœtal inactivé (Costar).

2.2. Implication des jonctions communicantes

La communication intercellulaire gap jonctionnelle (GJIC) est appréhendée sur des cellules vivantes à l'aide de la technique de Gap-FRAP [5] en utilisant une sonde rendue fluorescente après clivage enzymatique intracellulaire. Les cellules ont été préparées 72 heures avant application de la technique de FRAP. Les différentes lignées ont été marquées au 5,6-carboxyfluoresceine diacetate (5,6-CFDA) (*Molecular Probes, Oregon, USA*) à 6 μg/mL pendant 15 minutes à 37 °C, puis rincées trois fois avec du RPMI complémenté afin d'éliminer l'excédent de sonde fluorescente non incorporé dans les cellules. Ce produit est hydrolysé par des estérases cytoplasmiques aspécifiques en 5,6-carboxyfluoresceine (5,6-CF). Cette molécule fluorescente de caractère hydrophile et de poids moléculaire 376 Da, diffuse à travers les *gap junctions*.

2.3. Instrumentation en microscopie confocale

Le microscope confocal SP2-AOBS Leica (IFR 111) est utilisé comme matériel de référence dans un premier temps. Il est constitué d'un microscope inversé (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B), associé à trois sources laser :

- Argon (548, 476, 488 et 514 nm) ;
- Hélium–Néon (543 nm) ;
- Hélium–Néon (633 nm).

La source d'irradiation utilisée provient du laser Argon à 488 nm. Les mesures ont été réalisées avec un objectif 63 à immersion d'huile et l'intensité du signal de fluorescence est mesurée dans une bande passante comprise entre 500 et 560 nm. La puissance laser a été mesurée en sortie d'objectif à l'aide d'un puissancemètre (Newport, modèle 2835-C). L'acquisition s'est déroulée en trois étapes et s'est adressée à des sites de traitements et d'observations choisis. Les mesures avant photoblanchiment ont été réalisées toutes les 15 secondes pendant 150 secondes. Le photoblanchiment a été provoqué par l'irradiation laser zoomée sur la cellule cible à la puissance de 65 μW durant 45 secondes. Les acquisitions du signal de fluorescence, avant et après photoblanchiment, ont été réalisées toutes les 15 secondes durant 900 secondes à une puissance de 13 μW.

2.4. Instrumentation en microscopie traditionnelle

Dans un deuxième temps, les mesures de Gap-FRAP ont été élaborées à l'aide d'un microscope traditionnel droit à épifluorescence (Olympus Provis AX70). Une source laser Argon (Spectraphysics, beamlock), une caméra CCD refroidie par effet peltier (Olympus DP50), un spectromètre haute sensibilité, refroidi par azote liquide (Jobin Yvon CP200) et un capteur à fibre optique ont été annexés au microscope (Fig. 1). Ce dispositif permet, par l'utilisation du capteur à fibres optiques, de focaliser le faisceau laser au niveau de l'échantillon aux dimensions minimales de 600 nm de diamètre.

Les mesures en Gap-FRAP, réalisées avec un objectif 10, proviennent d'une série d'images et de spectres obtenus simultanément ou uniquement après traitement de la série de spectres. Les mesures avant photoblanchiment sont réalisées toutes les 30 secondes pendant 120 secondes. Le photoblanchiment est obtenu par une irradiation laser Argon à 488 nm de 137 μW durant cinq secondes pour les cellules KB et FaDu et de 832 μW pour les fibroblastes. Les acquisitions du signal de fluorescence après photoblanchiment ont été réalisées toutes les 30 secondes pendant 750 secondes. L'intensité de fluo-

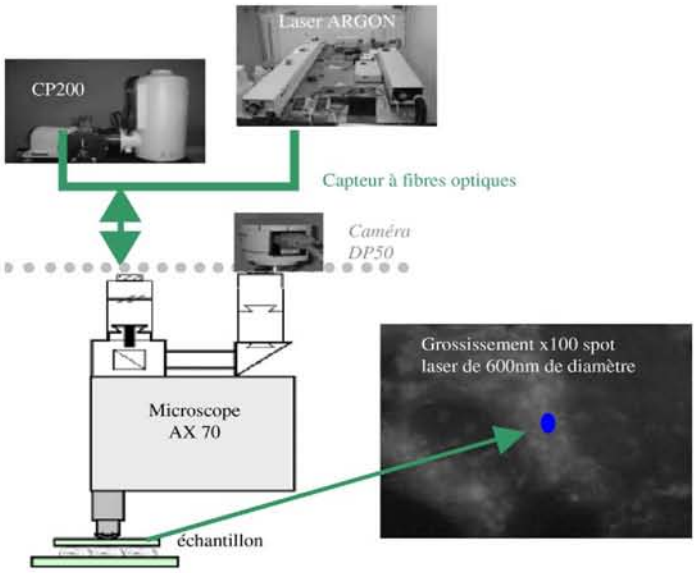

Fig. 1. Microspectrofluorimètre (MSF) à base de fibres optiques.

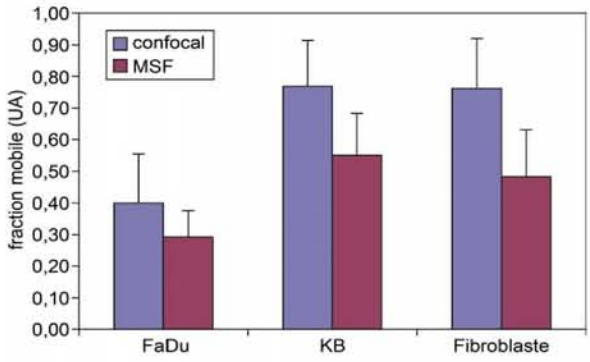

Fig. 2. Comparaison des mesures de Gap-FRAP sur les fibroblastes, KB et FaDu en microscopie confocale et traditionnelle.

rescence mesurée entre 510 et 550 nm est obtenue par excitation de la lampe à vapeur de mercure du microscope entre 460 et 490 nm, à une puissance de 490 µW répartie sur tout l'échantillon.

3. Résultats et conclusion

La Fig. 2 indique l'indice de fraction mobile (R) par lignées cellulaires et selon l'appareil de mesure utilisé (microscopie confocale, MSF traditionnelle) :

$$R = (If - I_0)/(Id - I_0)$$

Avec *If* = intensité de fluorescence finale, I_0 = intensité de fluorescence à t_0 (temps = 0 seconde) après photoblanchiment et *Id* = intensité de fluorescence avant photoblanchiment.

La comparaison des résultats instrumentaux permet de montrer d'une part, concernant la distinction des lignées par Gap-FRAP, des réponses comparables pour les deux instruments et d'autre part, des valeurs de fraction mobile en MSF traditionnelle inférieures à celles obtenues en microscopie confocale mais avec une sensibilité identique. Les résultats comparatifs obtenus avec les deux microscopes permettent à ce niveau d'étude d'être optimiste quant à l'utilisation du système étudié au laboratoire (MSF) et favorisent la poursuite du développement instrumental pour son utilisation dans la poursuite de la recherche en analyse tissulaire.

Références

[1] Goodenough DA. Annu Rev Biochem 1996;65:475–502.
[2] Ma XD. World J Gastroenterol 2003;9(5):946–50.
[3] Grossman HB. Cancer Res 1994;54(11):3062–5.
[4] De Feijter-Rupp HL. Carcinogenesis 1998;19(5):747–54.
[5] Wade MH. Science 1986;232:525–8.