THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale 649 :
« Rosalind FRANKLIN » - Energie – Environnement – Biosanté

Secteur de Recherche : **Biologie, Médecine, Santé**
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Sarah FOURNIER

Implication de GJA1-20k, une isoforme courte de la Connexine 43, dans l'adaptation des cellules cancéreuses au sein de la niche métastatique osseuse

ꕥꕥꕥ

REMERCIEMENTS

Il est tout naturel que mes premiers remerciements s'adressent à mes deux directeurs de thèse, Laurent Cronier et Arnaud Monvoisin. Depuis le stage de Master 2 vous m'avez encadrée, conseillée et supportée. Vous avez toujours été présents pour le moindre de mes questionnements et soutenue lors des différents congrès, MT180. Les réunions de la Houille team, qui ne dépassaient jamais trente minutes de sérieux avant qu'une référence de film ne vienne détendre l'atmosphère, me manqueront… tout comme les après-midis passés au confocal. Je considère avoir bénéficié du meilleur encadrement de thèse possible : vous m'écoutiez, me laissiez tester mes hypothèses. Vous avez su trouver le parfait équilibre entre encadrement et liberté. Comme vous me l'avez dit un jour, « en science, il faut s'amuser », et grâce à vous, j'ai pu le faire, tout en conservant le sérieux et la rigueur qu'exige une thèse. Je souhaite à tout doctorant d'avoir des directeurs comme vous ! 😊

Je remercie également les autres membres de l'équipe, Isabelle Courtin pour son aide aux manips. Nicolas Delannoye pour les fous-rires depuis le début de la thèse, notre petit duo des pipelettes du 5ème. Eh mon pâté ! 😉

Je remercie également l'ensemble du laboratoire 4CS, et plus particulièrement Thomas Harnois et Laetitia Cousin, pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur quotidienne.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres du jury, examinateurs et rapporteurs, que j'aurai le plaisir de rencontrer pour la première fois lors de ma soutenance de thèse.

J'adresse mes remerciements aux différents collaborateurs du projet : Madame Clarisse Vandebrouck, Monsieur Jérôme Piquereau, Madame Jenny Colas du laboratoire Préti ; Monsieur Jonathan Clarhaut du laboratoire PHAR2 ; Madame Anne Becq d'ImageUP ; Monsieur Sébastien Giraud, Monsieur Luc Pellerin et Madame Estelle Lemarie du laboratoire IRMETIST. Je tiens également à remercier Madame Valérie Desquiret et Madame Naïg Gueguen, avec qui j'ai eu la chance de passer une semaine de formation au MITOLAB d'Angers, pour approfondir les techniques d'étude des mitochondries. Et bien-sûr Maleaume de OrgaPrint pour la bio-impression 3D.

Je remercie chaleureusement Ludivine Bourdeau, pour son aide précieuse lors des travaux pratiques et pour nos longues discussions passionnantes qui ponctuaient nos journées.

Merci également à Madame Sandra Mirval, pour sa joie de vivre communicative et l'ambiance incomparable que tu sais instaurer au PBS !

Arnaud, toujours sympathique, tu as été la personne du labo qui a le plus fait preuve d'empathie. Je te souhaite tout le bonheur avec Marion et la réussite dans tes projets professionnels.

Les stagiaires, aaaaaaaaaaaaaahh les stagiaires : Les M2 Paul, Alexandre et Aurélien, les M1 avec Elora, Andréa, Nawel, Lucas, Anne-Laure, Marine … L'ambiance était autre avec vous … 😂😅😭

Merci également à vous les filles : Nadine, Laura, Annie, Mélissa, Israa et Mahdia ! GIRL POWER

Viennent ensuite les autres doctorants du bâtiment :

Aymerick, qu'est-ce qu'on a pu rigoler avant ton départ pour les États-Unis ! Merci d'avoir été présent au labo, toujours prêt à aider quand j'en avais besoin 😊.

Alice, petite mais tellement courageuse, tu réussiras tout ce que tu entreprendras, j'en suis certaine. On aura bien rigolé, surtout cette dernière année 😘

Julien, tu te doutes bien que je n'allais certainement pas t'oublier ! Sans toi, je n'aurais pas autant ri, ni autant profité de ces moments au labo. Et surtout, sans toi, je n'aurais probablement jamais réussi à monter dans cet avion pour mon congrès à Washington, ce fameux jour d'ouverture des JO de Paris ! Toujours là quand on a besoin de toi, tu as été un véritable soutien. Je te souhaite sincèrement tout le meilleur pour la suite !

Inès, je pense que tu fais partie de mes rencontres les plus inoubliables. Nos discussions, aussi drôles que passionnantes, que ce soit au labo, aux TP ou au sport, resteront de très bons souvenirs. Comme Julien, tu es toujours là pour les autres, gentille, attentionnée et profondément altruiste. Après mon départ, le clan des chipies doit résister !!! 💪😉

Mes remerciements vont ensuite aux personnes de mon quotidien à Poitiers, qui ont fait de cette période un moment chaleureux et agréable. Annie et Mohammed, vos magnifiques fleurs ont apporté couleur et sérénité à mon espace de vie. Pascal et sa dame, merci pour ce délicieux poulet du samedi, qui m'a redonné de l'énergie avant de retourner au labo ou traiter mes résultats. Et enfin, à mes boulangères préférées du dimanche, chez qui je venais faire le plein de sucre pour alimenter mes neurones, merci pour vos sourires et vos douceurs ! 🍰

Vous allez tous me manquer… J'ai vécu quatre années formidables à Poitiers grâce à vous tous. Et si, par malheur, j'ai oublié quelqu'un, sache que je te remercie également.

Papa, maman, merci de m'avoir donné la vie, pour que je puisse vivre autant de choses passionnantes. Ma passion pour les sciences remonte à l'enfance, et vous m'avez toujours encouragée et soutenue dans tout ce que j'entreprenais. Je vous aime, et je vous aimerai toujours ❤️ Même toi, ma sœurette 😘.

Mes derniers remerciements vont à ceux qui ne sont plus là, partis pendant mes études et mon doctorat : mes grands-parents, mère-grand, mais aussi mes loulous qui ont vécu à mes côtés depuis l'enfance et ont empli ma vie de joie (Poupoune, Lilly, Noirro, Némo et Utah). 💕 J'aurais tant aimé que vous soyez présents à mes côtés.

Ma passion pour le sujet qu'est le cancer est née lors d'un cours de Licence à l'université de Picardie Jules Verne, intitulé « Dérégulation tissulaire », dispensé par Monsieur Gautier, où a été présenté le fameux schéma de la cascade métastatique, suivi du diagramme de Hanahan & Weinberg, qui m'ont impressionnée. Depuis ce cours, j'ai su que je voulais consacrer ma thèse à cette thématique. Je l'ai fait et je vous en remercie tous.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 1
INDEX DES FIGURES ET TABLES 4
LISTE DES ABBREVIATIONS 8
INTRODUCTION 11
I. Cancer de la prostate 11
1. Anatomie et Physiologie de la prostate 11
2. Epidémiologie du cancer de la prostate 15
3. Dépistage et traitements 17
4. Classification du cancer de la prostate 19
5. Traitements du cancer de la prostate 23
6. Tumeur primitive et progression tumorale 24
7. Tumeur secondaire : Métastase osseuse 28
8. La niche métastatique osseuse 32
9. Conclusion « Cancer de la prostate » 40
II. Connexine 43 et cancer 41
1. Historique des connexines 41
2. Structure des connexines 45
3. Fonction canalaire des connexines 48
4. Régulations fonctionnelles des hémicanaux et canaux intercellulaires 52
5. Rôle de la partie C-terminale – Focus sur la Cx43 57
6. Connexine 43 et cancer de la prostate 61
7. Conclusion « Connexine 43 et cancer » 62
III. GJA1-20k, isoforme majoritaire de la Connexine 43 64
1. Un ARNm, sept protéines 64
2. Expression, structure et régulation 66
3. Rôle dans les pathologies 68
4. Rôle dans la dynamique du cytosquelette 70
5. Rôle dans la dynamique mitochondriale 72
6. Conclusion du chapitre – la revue : “GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression” 74
MATERIEL ET METHODES 105
I. Modèles cellulaires 105

1. Lignée cellulaire PC-3 105
2. Autre lignée : LNCaP 109
3. Entretien 109
4. Obtention du microenvironnement osseux 110
II. Analyses protéiques 112
1. Extraction protéique totale 112
2. Extraction protéique fractionnée 113
3. Western-blot 113
4. Immunofluorescence 116
5. Extraction d'ARN et RT-qPCR 116
III. Etude de la fonctionnalité 117
1. Hémicanaux : Test d'incorporation du Lucifer Yellow 117
2. Canaux : Test du parachute 118
IV. Etude du phénotype cancéreux 120
1. Migration collective 120
2. Invasion 120
3. Prolifération /viabilité cellulaire 121
4. Anoïkis 122
5. Capacité de résistance aux stress cellulaires 123
V. Etude du réseau mitochondrial 124
1. Activité mitochondriale 124
2. Quantité de mitochondries 125
3. Etude de la fonction mitochondriale 127
VI. Etude de l'état de quiescence des cellules 130
1. Quantification du Ki67 130
2. Cytométrie en flux 131
VII. Etude du calcium 131
1. Analyse des oscillations calciques 131
VIII. Analyse statistique 132
RÉSULTATS 133
I. Validation des modèles de surexpression de GJA1-20k 133
1. Validation protéique 133
2. Validation fonctionnelle 139
II. Caractérisation phénotypique des modèles de surexpression de GJA1-20k 141

1. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la viabilité et la prolifération cellulaire 141
2. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la transition épithélio-mésenchymateuses des cellules cancéreuses prostatiques 144
3. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur les capacités de migration et invasion des cellules cancéreuses prostatiques 146
4. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la résistance à l'anoïkis 148
5. Impact de GJA1-20k sur l'activité mitochondriale des cellules cancéreuses métastatiques prostatiques 150
6. Impact de surexpression de GJA1-20k sur le métabolisme glucidique 156

III. Etude de l'expression de GJA1-20k dans les conditions de la niche métastatique osseuse 159

1. Modulation de l'expression de GJA1-20k par le milieu conditionné osseux 159
2. Expression de GJA1-20k en condition hypoxique 161
3. Expression de GJA1-20k en condition de niche ostéogénique 164
4. Rôle de GJA1-20k dans l'adhérence aux ostéoblastes 166
5. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur l'agressivité des cellules en présence d'ObCM 169
6. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la quiescence cellulaire 171
7. Impact de du microenvironnement osseux sur la dynamique mitochondriale 175
8. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la signature calcique 177

DISCUSSION 180

CONCLUSION 216

ANNEXE 219

BIBLIOGRAPHIE 246

INDEX DES FIGURES ET TABLES

Figure 1 : Anatomie et organisation cellulaire de la prostate 14
Figure 2 : Epidémiologie du cancer de la prostate 16
Figure 3 : Les différents sites métastatiques du cancer de la prostate 18
Figure 4 : Tableau de classification TNM 20
Figure 5 : Classification du cancer de la prostate selon le score de Gleason 22
Figure 6 : Progression tumorale du cancer de la prostate 27
Figure 7 : Structure osseuse et composition 29
Figure 8 : Le remodelage osseux 31
Figure 9 : Organisation de la niche ostéogénique 35
Figure 10 : Parallèle entre le microenvironnement et acteurs cellulaires de la niche de la tumeur solide et celui de la moelle osseuse 39
Figure 11 : Schéma de la distribution des différentes connexines dans le corps humain 44
Figure 12 : Exemples de structure de gène de connexine et de mécanisme d'épissage 45
Figure 13 : De connexine à Jonction GAP 47
Figure 14 : Mécanisme d'ouverture/fermeture des hémicanaux/canaux et techniques d'études associées 49
Figure 15 : Mécanisme de régulation des connexines 53
Figure 16 : les différents sites de phosphorylation de la Cx43 55
Figure 17 : Modifications post-traductionnelles dans le cycle de vie des connexines 56
Figure 18 : Interactions protéiques de la CT de la Cx43 58
Figure 19 : Isoformes de la Cx43 issues de la traduction alternative 65
Figure 20 : Principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de GJA1-20k 68
Figure 21 : Altération de la formation des jonctions GAP et de la traduction au cours de l'EMT induite par le TGF-β 69
Figure 22 : Rôle de GJA1-20k dans le transport de la Cx43 à la membrane plasmique 71
Figure 23 : Effet de la GJA1-20k sur la dynamique mitochondriale 73
Figure 24 : Récapitulation des transfections sur les PC-3 107
Figure 25 : Carte des plasmides utilisés pour la 2ème série de transfection (GJA1-20k) 108
Figure 26 : Facteurs de croissance et matriciels présents dans le milieu conditionné osseux 111
Figure 27 : schéma récapitulatif des tests de fonctionnalité 119
Figure 28 : Macro ImageJ pour la quantification de signaux en Z avec masque des noyaux 126
Figure 29 : Chaîne respiratoire mitochondriale et du cycle de Krebs 129
Figure 30 : Validation des modèles de surexpression de GJA1-20k 135
Figure 31 : La surexpression de GJA1-20k induit une localisation membranaire de la Cx43 136
Figure 32 : La surexpression de GJA1-20k induit une localisation membranaire de la Cx43 138

Figure 33 : La surexpression de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des canaux jonctionnels des cellules métastatiques prostatiques 139

Figure 34 : La surexpression de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des hémicanaux des cellules métastatiques prostatiques 140

Figure 35 : La surexpression de GJA1-20k diminue la prolifération des cellules métastatiques prostatiques 142

Figure 36 : La surexpression de GJA1-20k augmente la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses métastatiques 143

Figure 37 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression de la E- et de la N- cadhérine dans les cellules prostatiques métastatiques 144

Figure 38 : Expression et localisation des cadhérines dans les cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k 145

Figure 39 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur les capacités migratoires et invasives des cellules prostatiques métastatiques 147

Figure 40 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la survie des cellules prostatiques métastatiques en condition d'anoïkis 149

Figure 41 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur le nombre de mitochondries et la production de ROS dans les cellules prostatiques métastatiques 151

Figure 42 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la distribution mitochondriale dans les cellules prostatiques métastatiques 152

Figure 43 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la respiration mitochondriale et la glycolyse des cellules prostatiques métastatiques 154

Figure 44 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la capacité oxydative maximale des cellules prostatiques métastatiques 155

Figure 45 : Profil énergétique des cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k) 155

Figure 46 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la consommation de glucose et la production de lactate dans les cellules prostatiques métastatiques 156

Figure 47 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la concentration intracellulaire d'ATP dans les cellules prostatiques métastatiques 157

Figure 48 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'acidification du milieu extracellulaire 158

Figure 49 : Effet du microenvironnement osseux sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules PC3 160

Figure 50 : Validation des conditions expérimentales d'hypoxie 161

Figure 51 : Effet de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules prostatiques métastatiques 162

Figure 52 : Effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm GJA1 dans les cellules prostatiques métastatiques 163

Figure 53 : Effet du stress oxydatif sur l'expression de GJA1-20k dans les cellules prostatiques métastatiques 163

Figure 54 : Effet des conditions de la niche ostéogénique et de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules prostatiques métastatiques 166

Figure 55 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'adhérence des cellules prostatiques métastatiques 167

Figure 56 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression de la cadhérine-11 dans les cellules prostatiques métastatiques 168

Figure 57 : Effet du microenvironnement osseux sur la migration des cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k 169

Figure 58 : Effet du microenvironnement osseux sur l'invasion des cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k 170

Figure 59 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur la prolifération des cellules prostatiques métastatiques 171

Figure 60 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur l'expression de p21 dans les cellules prostatiques métastatiques 172

Figure 61 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression du récepteur membranaire Axl dans les cellules prostatiques métastatiques 173

Figure 62 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur la répartition des cellules prostatiques métastatiques dans le cycle cellulaire 174

Figure 63 : Effet des conditions de la niche ostéogénique et de l'hypoxie sur la distribution mitochondriale dans les cellules prostatiques métastatiques 176

Figure 64 : Profil calcique spontané des cellules PC3 et PC3-20k 177

Figure 65 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur le profil calcique des cellules métastatiques prostatiques 178

Figure 66 : L'expression de GJA1-20k modifie le profil calcique des cellules métastatiques prostatiques 179

Figure 67 : La surexpression de la Cx43 et de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des hémicanaux et canaux jonctionnels des cellules métastatiques prostatiques 182

Figure 68 : La surexpression de GJA1-20k augmente la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses métastatiques quel que soit le niveau de Cx43 188

Figure 69 : La surexpression de GJA1-20k diminue la migration et l'invasion des cellules métastatiques prostatique, quel que soit le niveau d'expression de Cx43 189

Figure 70 : La surexpression de GJA1-20k et de Cx43 augmente la résistance des cellules métastatiques prostatiques à l'anoïkis 193

Figure 71 : Expression de la beta-caténine et de mTOR dans les cellules PC3 adhérentes et non adhérentes 196

Figure 72 : La surexpression de GJA1-20k induit une augmentation progressive et significative de la mitophagie dans les cellules cancéreuses métastatiques prostatiques 197

Figure 73 : La surexpression de GJA1-20k favorise la survie des cellules métastatiques prostatiques en absence de glucose 202

Figure 74 : La surexpression de GJA1-20k induit une baisse significative des capacités migratoires et invasives des cellules métastatiques prostatiques, quel que soit le niveau de Cx43 204

Figure 75 : La périostine stimule l'expression de GJA1-20k dans les cellules tumorales prostatiques des lignées cellulaire PC-3 et LNCaP 207

Figure 76 : Implication de la voie mTOR dans le contrôle d'expression de GJA1-20k dans différentes lignées cancéreuses prostatiques 209

Figure 77 : La voie Mnk1/2 ne modifie pas l'expression de GJA1-20k dans les cellules PC-3 210

Figure 78 : La surexpression de GJA1-20k dans les cellules métastatiques prostatiques induit une augmentation d'expression de l'IP3R2 213

Figure 79 : Bio-impression 3D 215

Figure 80 : Synthèse sur les rôles de GJA1-20k dans le cadre du cancer métastatique prostatique et principales perspectives 218

Table 1 : Classification d'Amico et traitements 24

Table 2 : Les connexines, une famille multigénique 43

Table 3 : Les différentes molécules passant par les hémicanaux/Jonctions GAP 51

Table 4 : Résumé des caractéristiques des différentes traductions 66

Table 5 : Caractéristiques principales des lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et LNCaP 105

Table 6 : Anticorps utilisés 115

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AKT *: protein kinase B (*PKB*)*

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AMPK : *AMP-activated Protein Kinase*

AR : Récepteur aux androgènes

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

B

B2M : β2-microglobuline

BMP7 : *Bone Morphogenic Protein 7*

BMU : *Basic Multicellular Unit*

BrdU : Bromodésoxyuridine

BSA : *Bovine Serum Albumin*

C

CAF : Fibroblastes Associés au Cancer

CaM : Calmoduline

CK1 : *Casein Kinase 1*

CSF-1 : *(Macrophage) Colony Stimulating Factor-1(M-CSF)*

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CT : Extrémité C-terminale

αCT1 : *α-Connexin Carboxy-Terminus 1*

Cx43 : Connexine 43

CXCL12 *: Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12*

CXCR : *Chemokine (C-X-C motif) Receptor*

D

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DHT *: dihydrotestostérone*

DMSO : Dimethylsulfoxide

DRP1 : *Dynamin-Related Protein 1*

E

ECAR *: Extracellular Acidification Rate*

EDTA *: Ethylene diaminetetraacetic acid*

EGFR *: Epidermal Growth Factor Receptor*

EL : *Extracellular Loop*

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

F

FAK : *Focal Adhesion Kinase*

FCCP : carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FGF *: Fibroblast Growth Factor*

G

GAPDH *: Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*

Gas6 *: Growth arrest-specific 6*

GJA1 : *Gap Junction protein alpha 1*

GJIC *: Gap Junctional Intercellular Communication*

GLUT1 : Transporteur de glucose de classe 1

H

HIF-1alpha *: Hypoxia-Inductible Factor 1 alpha*

Hsc70 *: Heat-shock cognate 70*

I

IL : Interleukine / *Intracellular Loop*

IP_3 : Inositol Trisphosphate

IRES *: Internal Ribosome Entry Site*

L

LATS1/2 : *Large tumor suppressor kinase 1/2*

LNCaP *: Lymph Node Cancer Prostate*

LY : Lucifer Yellow

M

MAGUK *: Membrane-Associated Guanylate Kinase*

MAPK *: Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant protein 1*

MCU : Uniporter Mitochondrial de Calcium

MEC : Matrice Extracellulaire

miRNA *: micro RNA*

MMP : Métalloprotéinases

Mnk1/2 *: Mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2*

MT-MD4 : Mitochondrial NADH déshydrogénase sous-unité 4

mTOR *: mammalian Target Of Rapamycin*

N

ND1 : NADH déshydrogénase sous-unité 1

NDRG1 : *N-myc down regulated gene 1*

NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells*

NLS : *Nuclear Localization Signa*l

NT : Extrémité N-terminale

O

ObCM *: Osteoblastic Conditoned Medium* (milieu conditionné osseux)

OCR *: Oxygen Comsumption Rate*

P

PAL : Phosphatase Alcaline

PBS *: Phosphate Buffered Saline*

PC-3 : *Prostate Cancer-3*

PCa : *Prostate Cancer*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDGF *: Platelet-derived growth factors*

PGC1-alpha : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K *: Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIN : Néoplasie Intra-épithéliale Prostatique

PINK1 : *PTEN-Induced Kinase 1*

PKA, C ou G : Protéine Kinase A, C ou G

POLG : *ADN Polymérase Gamma*

PolyHEMA : poly(2-hydroxyéthyl-méthacrylate)

PSA *: Prostate Specific Antigen*

PST : Périostine

PTH : Hormone Parathyroïdienne

R

RANKL *: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*

RE : Réticulum Endoplasmique

RIP3 : Récepteur à l'Inositol Triphosphate

ROS *: Reactive Oxygen Species*

RT *: Room Temperature*

S

SERCA : *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*

SVF : Sérum de veau fœtal

siRNA *: small interfering RNA*

T

TAM : Macrophages associés au cancer

TAZ : *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*

TBI : *Traumatic Brain Injuries*

TGF-β*: Tumor Growth Factor beta*

TFAM : *Mitochondrial Transcription Factor A*

TM : Domaine Transmembranaire

TME : Microenvironnement tumoral

TMRE : Tétraméthylrhodamine éthyl ester

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNM *: Tumor Nodes Metastasis (classification)*

TNTs *: Tunneling NanoTubes*

TOM20 *: Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane 20*

TRAP : *Tartrate-resistant acid phosphatase*

U

UTR *: UnTranslated*

V

VEGF *: Vascular Endothelial Growth Factor*

X

XeC : Xestospongine C

XTT : 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Y

YAP : *Yes-associated protein*

Z

ZO-1 *: Zonula Occludens-1*

INTRODUCTION

I. Cancer de la prostate

1. Anatomie et Physiologie de la prostate

La prostate est une glande exocrine appartenant à l'appareil urogénital masculin. Chez l'adulte jeune, elle présente un poids moyen d'environ 15 grammes, une longueur de 3 cm, une largeur de 4 cm et une épaisseur de 2,5 cm. Elle est située sous la vessie, en avant du rectum, à l'intersection des voies urinaire et génitale, et est entourée d'une capsule fibreuse (Figure 1A). Sa fonction physiologique est de participer à la production du liquide séminal, composant essentiel du sperme, jouant ainsi un rôle majeur dans le processus de reproduction. Lors de la puberté, la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig, situées dans les testicules, stimule le développement de la prostate. Cette stimulation est principalement due à la dihydrotestostérone (DHT), forme biologiquement active de la testostérone, qui agit directement sur les cellules prostatiques.

Le modèle anatomique de référence, proposé par McNeal en 1968, repose non seulement sur la morphologie mais également sur l'histologie (McNeal, 1968). En pratique clinique, la prostate est généralement décrite comme possédant trois lobes : deux latéraux (gauche et droit) et un médian. Toutefois, d'un point de vue anatomique, elle est constituée de cinq lobes distincts (Figure 1B) : un lobe antérieur situé en avant de l'urètre, principalement fibreux et musculaire ; un lobe postérieur en arrière de l'urètre ; un lobe médian entre le canal éjaculateur et l'urètre ; deux lobes latéraux (gauche et droit), principalement glandulaires (Seisen *et al.*, 2012). La prostate est constituée en grande partie de tissu glandulaire tubulo-alvéolaire et d'un stroma fibromusculaire. Selon le modèle zonal de McNeal (McNeal, 1981, 1988), elle s'organise en quatre zones entourant l'urètre :

- **Zone périphérique :** située dans la partie postéro-inférieure de la glande, elle entoure la zone centrale et l'urètre distal jusqu'à l'apex. Elle représente environ 70% de la masse glandulaire, constituée de glandes de petite taille et d'un stroma peu dense. Elle est le siège principal des adénocarcinomes prostatiques (≈ 70% des cas).

- **Zone centrale :** en forme de cône, elle occupe la partie postéro-supérieure de la glande, avec un sommet où s'abouchent les canaux éjaculateurs qu'elle entoure sur tout leur trajet. Sa base correspond à celle de la prostate. Elle représente 25% de la masse prostatique, avec des glandes de grande taille et un stroma dense. Elle est le siège privilégié des infections prostatiques et de 10 % des cancers.

- **Zone de transition :** composée de deux lobes entourant les faces postérolatérales et inférieure de l'urètre proximal. Elle représente 5% de la masse glandulaire et contient des glandes semblables à celles de la zone périphérique, mais avec un stroma plus dense. C'est dans cette zone que se développe principalement l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) ainsi qu'environ 20 % des cancers prostatiques.

- **Zone fibromusculaire antérieure :** dépourvue de glandes, elle tapisse la face antérieure de la prostate, du col vésical jusqu'au sphincter strié, en avant de l'urètre. Elle est constituée essentiellement de fibres musculaires lisses assurant un rôle mécanique dans la miction.

La prostate est donc composée d'un épithélium glandulaire et d'un stroma fibromusculaire (Figure 1C). L'épithélium glandulaire est organisé en acini (structures glandulaires en forme de petits sacs) entourant une lumière (lumen). Ces acini reposent sur une lame basale, riche en laminine et en collagène, qui assure le soutien structurel de l'épithélium.

L'épithélium comporte deux couches cellulaires principales :

- La couche basale, en contact avec la lame basale, composée de :

    - Cellules épithéliales multipotentes permettant de générer des cellules basales, qui assurent un rôle de soutien et sécrètent les constituants de la lame basale
    - Cellules neuroendocrines qui synthétisent de la sérotonine
    - Cellules intermédiaires, représentant des états de différenciation entre cellules basales et luminales
    - Cellules progénitrices pour le renouvellement cellulaire

- La couche luminale (apicale) : proche du lumen, constituée de cellules luminales/sécrétrices exprimant les récepteurs des androgènes (AR). Elles sont responsables de la production des composants du liquide séminal, et également celle de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA, *Prostate Specific Antigen*), une protéase liquéfiant le sperme facilitant la motilité des spermatozoïdes (Barron and Rowley, 2012).

Le stroma est un tissu de soutien composé de fibroblastes synthétisant la matrice extra-cellulaire, de cellules musculaires lisses responsables des contractions lors de l'éjaculation, de cellules dendritiques et de lymphocytes (défense immunitaire), de cellules nerveuses et de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

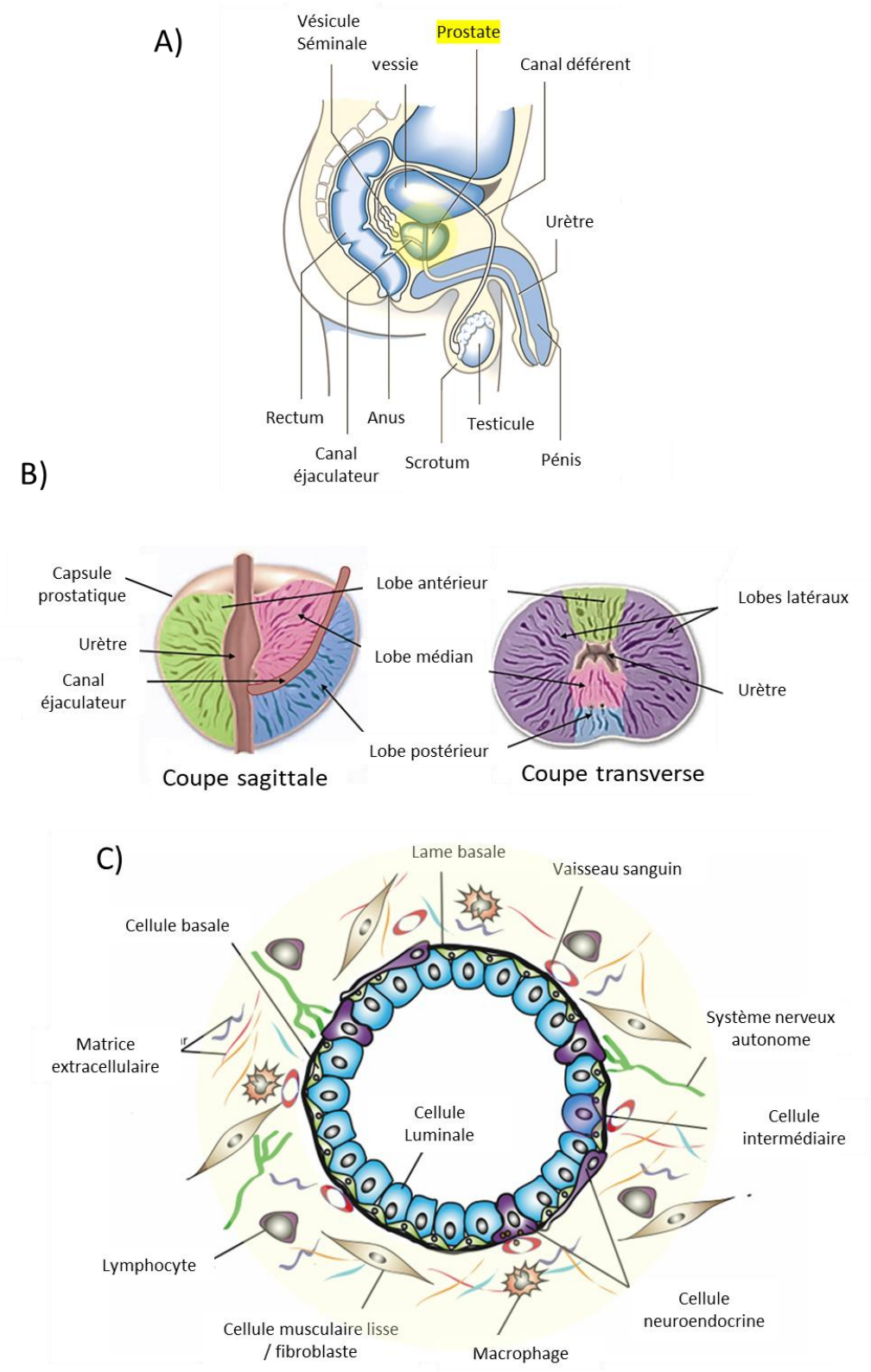


Figure 1 : Anatomie et organisation cellulaire de la prostate

A) Localisation de la prostate au sein de l'appareil uro-génital masculin. **B)** Histologie et subdivision en lobes prostatiques. **C)** Composition cellulaire de l'épithélium glandulaire et du stroma fibromusculaire (jaune clair). Inspiré et adapté de D.A Barron et al., Endocr. Relat. Cancer, 2012 ; T.Seisen et al, et Progrès en urologie (2012).

2. Epidémiologie du cancer de la prostate

En termes d'incidence, le cancer de la prostate est le deuxième cancer masculin le plus fréquent dans le monde après le cancer du poumon, avec environ 1,5 million de nouveaux cas recensés en 2022 (GLOBOCAN 2022). Il représente la 5ème cause de décès par cancer. En France, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes, avec près de 60 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2022 (Figure 2A). En termes de mortalité, il représente la 5ème cause de décès par cancer (Figure 2B). Chaque année, en France, il est responsable du décès de 9000 personnes environ. Ce cancer est fortement lié à l'âge car il se développe rarement avant 50 ans, l'âge moyen au diagnostic est de 64 ans. De plus, l'augmentation du nombre de cas observée est en partie liée à l'allongement de l'espérance de vie de la population au cours des dernières décennies. Chez les hommes, celle-ci est passée de 75,3 ans en 2000 à 80 ans en 2024 (Insee, Espérance de vie à la naissance, hommes). La plupart des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes acineux, qui représentent environ 95 à 99 % de tous les cancers de la prostate, le reste est un mélange de tumeur rare (Guo and Czerniak, 2023). Enfin, l'incidence et la mortalité du cancer de la prostate varient selon l'indice de développement humain (IDH) : dans les pays développés (fort HDI), elles sont généralement plus faibles que pour d'autres cancers (Figure 2C) (Bray *et al.*, 2024).

Le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle dont le risque augmente avec l'âge (même si il est d'évolution lente), les antécédents familiaux, notamment lorsque des proches parents ont été diagnostiqués, suggérant une composante génétique renforcée par la présence de mutations dans des gènes tels que BRCA1 ou BRCA2 (Kirchhoff *et al.*, 2004). L'origine ethnique constitue également un facteur déterminant, les hommes d'origine afro-américaine présentant une incidence plus élevée et un pronostic plus sévère comparé aux populations asiatiques, où l'incidence est plus faible (Hansen *et al.*, 2022). Ce cancer est hormonodépendant, car les androgènes peuvent influencer la prolifération cellulaire (Debes and Tindall, 2002). Par ailleurs, des facteurs liés au mode de vie comme les régimes riches en graisses, la faible consommation de fruits et légumes ou l'obésité, augmentent le risque. Enfin, des expositions environnementales, notamment à certains pesticides ou métaux lourds comme le cadmium, pourraient également contribuer au développement de la maladie (Mohammadian-Hafshejani *et al.*, 2024).

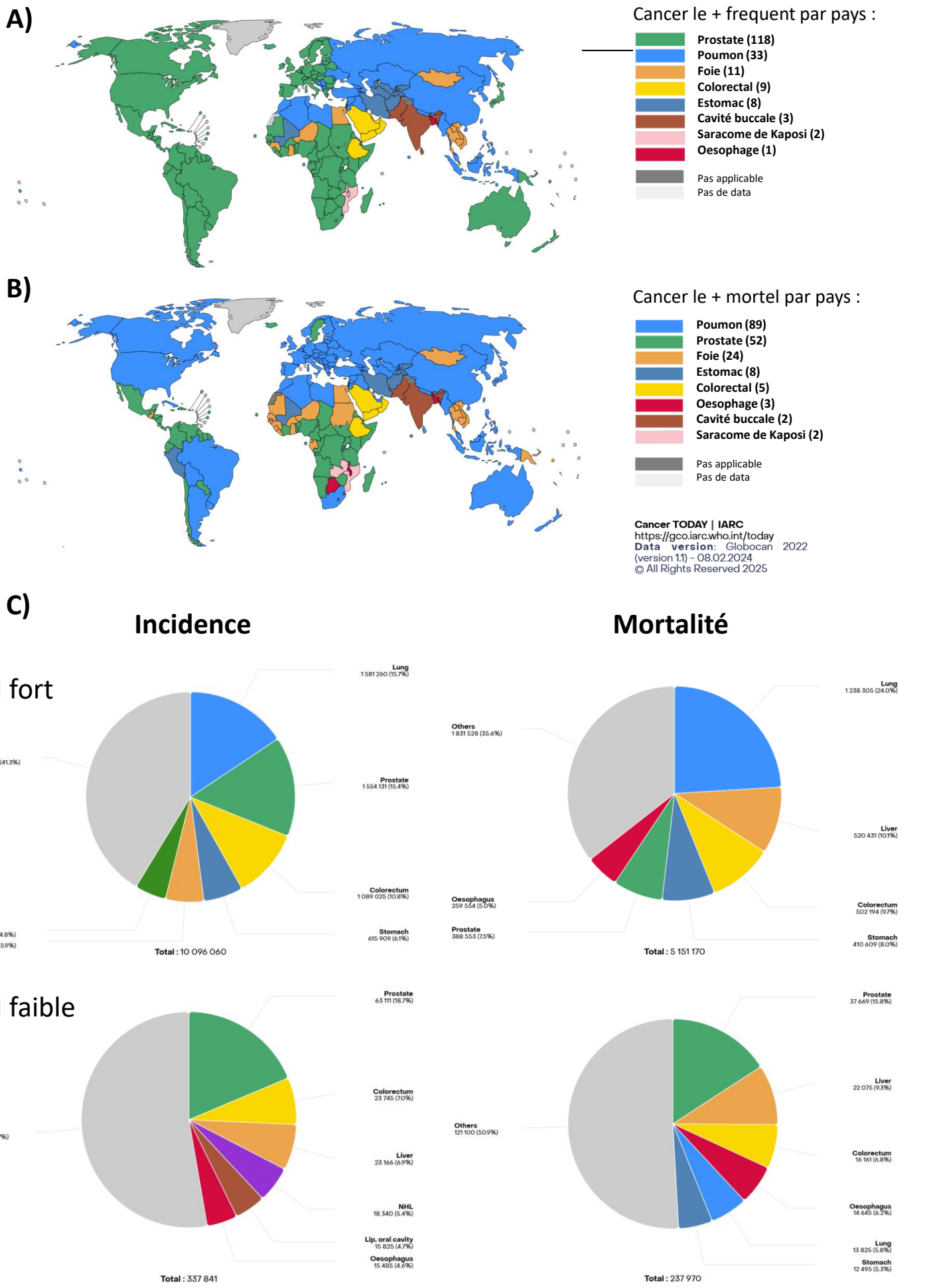


Figure 2 : Epidémiologie du cancer de la prostate

Les cartes mondiales montrent, pour chaque pays, le cancer le plus fréquent chez les hommes en 2022, en termes d'incidence **A)** et de mortalité **B)**. **C)** Diagramme circulaire de l'incidence et mortalité des cancers en fonction de l'HDI (Indice de Développement Humain). Données issues et adaptées du site du Globocan 2022.

3. Dépistage et traitements

Malgré son incidence élevée, le cancer de la prostate possède un bon taux de survie à 5 ans, supérieur à 90% lorsqu'il est détecté à un stade localisé. Ce pourcentage chute à 30% lorsque la maladie est à un stade plus avancé, comme par exemple lors de la survenue de métastases osseuses. Ces chiffres illustrent l'importance d'un dépistage précoce afin de permettre une prise en charge rapide et efficace.

En raison d'une évolution lente et asymptomatique lors des premiers stades de développement, il faut être attentif après 50 ans aux différents signes pouvant orienter le diagnostic, comme des problèmes urinaires (dysurie, pollakiurie, nycturie) liés à l'augmentation de la taille de la prostate (hyperplasie). D'autres symptômes comme du sang dans les urines ou le sperme, ainsi que des douleurs dans le bas du dos, au niveau du bassin, peuvent déjà indiquer un stade tardif (métastases osseuses) (La ligue contre le cancer – cancer de la prostate et dépistage précoce).

Les deux principales méthodes de dépistage demeurent le dosage sérique du PSA et le toucher rectal. Un taux de PSA inférieur à 4 ng/mL est généralement considéré comme normal. Au-delà de 10 ng/mL, le risque de cancer augmente, justifiant des examens complémentaires. Un taux élevé peut aussi être associé à une hypertrophie bénigne (HBP), une infection ou une prostatite (inflammation) et inversement, un taux normal n'exclut pas le cancer. Pour approfondir le diagnostic, d'autres marqueurs sanguins peuvent être dosés : PSA total puis PSA libre/total (un ratio inférieur à 15-20% peut indiquer une néoplasie plutôt qu'une hypertrophie bénigne) ; phosphatase alcaline (PAL) et calcium sanguin, en particulier pour la recherche de métastases que se situent le plus fréquemment (84%) au niveau des os. Environ 20% des patients présentent déjà des métastases osseuses au moment du diagnostic (Figure 3) (Gandaglia *et al.*, 2014).

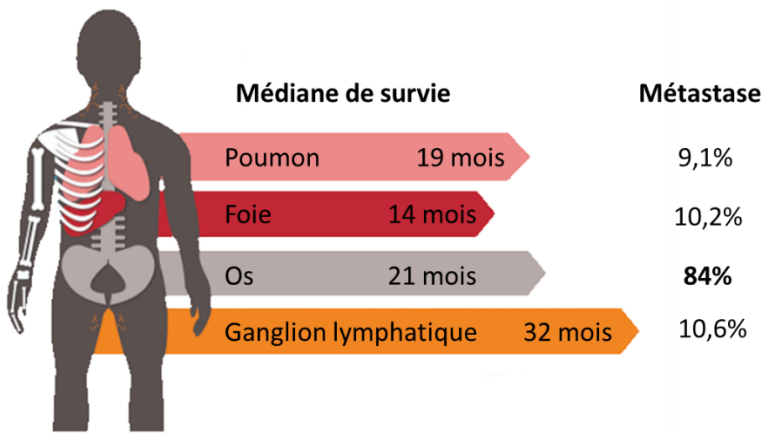


Figure 3 : Les différents sites métastatiques du cancer de la prostate

Médiane de survie en fonction du type de métastases et pourcentage de répartition de ces métastases. Les taux dépassent 100% car un patient présente en général plusieurs types de métastases.

Le toucher rectal permet d'apprécier, du fait de l'accessibilité de la glande à travers la paroi rectale, le volume prostatique, sa régularité et sa consistance (détection de nodules, d'indurations, d'asymétries suspectes).

La recherche de gènes de prédisposition, tels que *BRAC1/2* cités précédemment ou encore *ATM, CHEK2, BRCA1, HOXB13, MSH2, MSH6, PALB2, TP53* et *NBN,* a montré leur association avec un risque accru de développement du cancer de la prostate (Khan and Cheng, 2022). Toutefois, la part des formes héréditaires reste limitée, représentant environ 5% des cas. 20% des patients présentent des antécédents familiaux, mais la majorité des cas est sporadique (75%) (Cussenot and Cancel-Tassin, 2004).

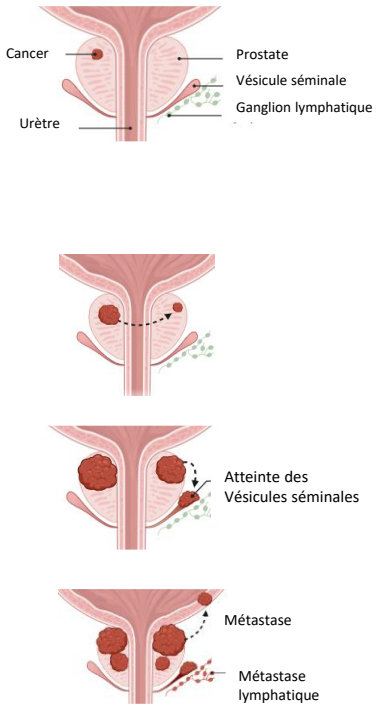
En cas d'anomalie au toucher rectal ou d'un taux de PSA, des examens complémentaires sont réalisés afin de préciser le diagnostic et l'extension de la maladie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) prostatique est utilisée pour visualiser les zones suspectes et guider les biopsies ciblées. La scintigraphie osseuse intervient pour détecter d'éventuelles métastases osseuses. Enfin, les biopsies permettent d'évaluer le grade tumoral.

4. Classification du cancer de la prostate

La classification TNM est un système international standardisé, mis au point dans les années 1940-1950, pour classifier l'évolution des cancers. Ce système repose sur trois critères :

- **T (*Tumor*)** pour la taille et l'extension locale de la tumeur dans l'organe concerné et des tissus adjacents
- **N (*Nodes*)** pour l'atteinte au niveau des ganglions lymphatiques
- **M (*Metastasis*)** pour décrire les tumeurs secondaires (Figure 4).

Au stade T1, la tumeur est non-palpable et invisible à l'imagerie. À T2 la tumeur est palpable mais limitée à la prostate. À T3, la tumeur s'étend au-delà de la capsule prostatique ou atteint les vésicules séminales. À T4, les structures périphériques (rectum, paroi pelvienne…) sont envahies. De N1 à N3, il s'agit de l'invasion progressive des ganglions adjacents. Le stade M1 (a, b et c) correspond à la présence de métastases à distance de la prostate, notamment dans les os (Schröder *et al.*, 1992).



Stade T	Définition
T1	Tumeur non palpable ni visible à l'imagerie
T1a	Découverte fortuite lors de l'examen histologique après traitement chirurgical d'un adénome, la tumeur est inférieure à 5% du tissu réséqué
T1b	Découverte fortuite, ≥ 5 % du tissu réséqué
T1c	Elévation du PSA, il n'est pas palpable au toucher rectal
T2	Tumeur palpable mais limitée à la prostate
T2a	Elle atteint moins de 50% d'un seul lobe prostatique
T2b	Elle atteint un seul lobe mais plus de 50% du lobe
T2c	Atteinte des deux lobes
T3	La tumeur est palpable et s'étend en dehors de la capsule prostatique
T3a	Extension extra-capsulaire unilatérale ou bilatérale
T3b	Atteinte des vésicules séminales
T4	Invasion de structures adjacentes : vessie, rectum, muscles du plancher pelvien

Stade N	Définition
N0	Pas d'atteinte ganglionnaire régionale
N1	Présence de métastases ganglionnaires régionales (ganglion pelvien attient mais de moins de 2 cm de diamètre)
N2	Un ou plusieurs ganglion(s) envahi(s) mais dépassant 5 cm
N3	Un ganglion envahi de plus de 5 cm

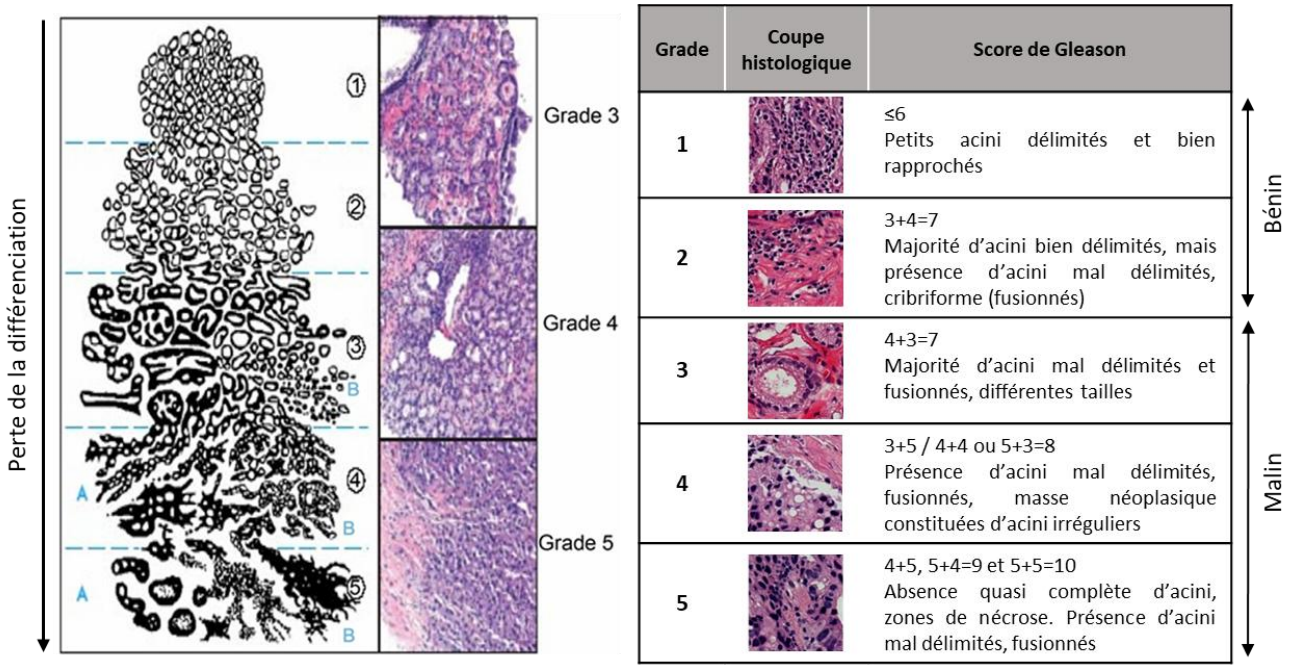
Stade M	Définition
M0	Aucune métastase à distance
M1	Présence de métastases à distance
M1a	Ganglions lymphatiques non régionaux atteints
M1b	Métastases osseuses
M1c	Métastases autres que osseuse en plus ou non (ex : foie, poumon, cerveau)

Figure 4 : Tableau de classification TNM

Tableau résumant les caractéristiques des différentes étapes au sein des stades T, N et M spécifique au cancer de la prostate. D'après *« The TNM classification of prostate cancer »*. Tableau adapté de Schröder, et al, 1992.

Parallèlement, le score de Gleason, développé dans les années 1960, évalue l'agressivité tumorale à partir de l'étude histologique de la prostate (Gleason, 1966; Samaratunga *et al.*, 2016). Il repose sur une classification en 5 grades, du grade 1 (correspondant à des cellules différenciées et peu agressives) au grade 5 (correspondant à des cellules dédifférenciées et donc agressives). Après biopsie, l'aspect différencié ou non des cellules permet d'attribuer un grade en fonction du statut tissulaire (notamment glandulaire, plus propice au développement tumoral) (Bhattacharjee *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021; Kamadjou *et al.*, 2022). En raison de la forte hétérogénéité intratumorale, deux grades sont combinés : le grade prédominant, placé en premier, et le grade secondaire. Leur addition fournit un score de 6 à 10, où « 6 » correspond à un risque faible et une faible agressivité, tandis que « 10 » indique un risque très élevé et une forte agressivité (Figure 5).

Ces deux systèmes de classification sont complémentaires et permettent de mieux évaluer le stade de développement, et d'orienter la prise en charge et le plan de traitement de façon à s'adapter au mieux aux caractéristiques du cancer.



Grade	Coupe histologique	Score de Gleason
1		≤6 Petits acini délimités et bien rapprochés
2		3+4=7 Majorité d'acini bien délimités, mais présence d'acini mal délimités, cribriforme (fusionnés)
3		4+3=7 Majorité d'acini mal délimités et fusionnés, différentes tailles
4		3+5 / 4+4 ou 5+3=8 Présence d'acini mal délimités, fusionnés, masse néoplasique constituées d'acini irréguliers
5		4+5, 5+4=9 et 5+5=10 Absence quasi complète d'acini, zones de nécrose. Présence d'acini mal délimités, fusionnés

Figure 5 : Classification du cancer de la prostate selon le score de Gleason

Illustration et description de la classification en grade de Gleason et de la classification correspondante du stade du cancer selon l'International Society of Urological Pathology (ISUP). Le score de Gleason évalue l'agressivité du cancer de la prostate en fonction de l'aspect architectural des acini observés au microscope. Deux chiffres sont attribués : le premier correspond au pattern prédominant, et le second, au pattern le plus observé. Leur somme donne le score total (par exemple : 3 + 4 = 7). Plus les chiffres sont élevés, plus la tumeur est peu différenciée et agressive. Depuis la révision de l'ISUP, le score de Gleason est complété par une classification en cinq groupes de grade allant de 1 (tumeur bien différenciée, bon pronostic) à 5 (tumeur très agressive). Adapté de C. Kamadjou *et al.* 2022, et Bhattacharjee *et al,* 2019.

5. Traitements du cancer de la prostate

Adapté à chaque patient, le traitement du cancer de la prostate dépend de plusieurs paramètres, notamment l'âge et l'espérance de vie, le stade tumoral (classification TNM), le score de Gleason, le taux de PSA ainsi que les comorbidités associées. Ceci souligne l'importance d'un dépistage précoce, d'un diagnostic précis et d'une classification rigoureuse du cancer avant toute décision thérapeutique.

Classiquement, les tumeurs sont réparties en fonction du classement d'Amico en 3 catégories : faible, intermédiaire et à haut risque (D'Amico *et al.*, 1998). Cette classification repose sur le taux de PSA, le score de Gleason et le stade clinique TNM (Table 1).

Les options thérapeutiques comprennent la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie, seules ou en association, selon le profil du patient et la sévérité du cancer.

- **Chirurgie :** la prostatectomie radicale consiste à retirer la prostate, les vésicules séminales et parfois les ganglions lymphatiques ilio-obturateurs ;

- **Radiothérapies externe conformationnelle ou interne :** ces techniques consistent à administrer des rayonnements ionisants de manière ciblée afin d'éliminer les cellules cancéreuses et réduire la tumeur. Elles peuvent être utilisées comme traitement principal ou en adjuvant à la chirurgie.

- **Hormonothérapie :** Ce traitement vise à réduire la production ou l'effet des androgènes, principalement la testostérone, qui favorisent la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. Cette suppression peut être réalisée i) de façon chirurgicale par ablation de la partie centrale des testicules (pulpectomie), ii) de façon chimique par l'administration d'agonistes du GnRH, une hormone naturelle produite par l'hypothalamus stimulant la libération de LH (Hormone lutéinisante) provoquant la libération de la testostérone par les testicules ou iii) par l'utilisation d'anti-androgènes. L'hormonothérapie est souvent utilisée dans les formes avancées ou métastatiques, ou en complément de la radiothérapie ou de la chirurgie.

- **Chimiothérapie :** Des molécules chimiques anti-cancéreuses comme le Docétaxel ou le Cabazitaxel sont utilisées chez les patients résistants à l'hormonothérapie, présentant des métastases ou en rechute afin de limiter la progression tumorale et prolonger la survie.

Après le traitement, une surveillance active est mise en place pour prévenir toute récidives.

Critère	Faible risque	Risque intermédiaire	Haut risque
PSA	< 10 ng/mL	10–20 ng/mL	> 20 ng/mL
Score de Gleason	≤ 6	= 7 (3+4 ou 4+3)	8 à 10
Stade TNM	T1–T2a	T2b–T2c	≥ T3a
Traitements	Surveillance active Prostatectomie Radiothérapie	Surveillance active Prostatectomie + curage ganglionnaire Radiothérapie et hormonothérapie courte (4-6 mois)	Surveillance active Prostatectomie + curage ganglionnaire Radiothérapie et hormonothérapie longue durée (18-36 mois) Chimiothérapies ou thérapies ciblées

Table 1 : Classification d'Amico et traitements

Ce tableau résume les traitements mis en place en fonction du classement d'Amico qui repose sur le dosage du PSA, le score de Gleason et le stade TNM.

6. Tumeur primitive et progression tumorale

Environ 95 % des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes, développés à partir du tissu glandulaire épithélial, et près de 70 à 75 % d'entre eux siègent dans la zone périphérique, riche en cellules épithéliales androgéno-sensibles. Le processus tumoral débute par une hyperplasie et évolue vers un état précancéreux appelé néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) qui peut être de bas (LGPIN) ou de haut grade (HGPIN). Ce dernier grade correspond à une prolifération anormale des cellules épithéliales non invasives au niveau des acini prostatiques, décrite pour la première fois en 1987 (Bostwick and Brawer, 1987). La progression des PINs vers le développement d'un adénocarcinome se caractérise par i) des altérations morphologiques comme la perte de l'intégrité de la membrane basale et la perte de la polarité cellulaire, et ii) des altérations génétiques : mutations au niveau de l'ADN, surexpression d'oncogènes (MYC), inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (P53, PTEN,

RB), fusion de gènes (TMPRSS2–ERG) (Figure 6, étape 2). Cette étape correspond à la phase d'initiation tumorale. Irréversible, elle est caractérisée par une accumulation progressive des altérations épigénétiques et génétiques qui confèrent aux cellules cancéreuses une capacité de prolifération accrue et une résistance à l'apoptose. Le développement simultané de plusieurs PINs participe par ailleurs à l'hétérogénéité de la tumeur (Knudsen and Vasioukhin, 2010).

L'étape de promotion tumorale est marquée par l'expansion clonale des cellules anormales sous l'influence de facteurs hormonaux, principalement la testostérone via le récepteur des androgènes. Cette phase peut être réversible par l'inhibition des facteurs hormonaux impliqués. En effet, l'activation du récepteur aux androgènes (AR) est un mécanisme clé de la progression tumorale et explique la dépendance hormonale de la majorité des tumeurs prostatiques au stade initial (Figure 6, début de l'étape 3).

Le microenvironnement tumoral (TME) joue un rôle très important au cours de cette cascade métastatique. Il est composé de cellules stromales comme les fibroblastes, adipocytes ou les cellules musculaires lisses, de cellules immunitaires comme les macrophages ou lymphocytes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de matrice extracellulaire et de facteurs solubles (cytokines, facteurs de croissance, androgènes…) (Shiao, Chu and Chung, 2016).

Lors de l'initiation tumorale, l'inflammation chronique favorise la libération de cytokines pro-prolifératives telles que le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et l'IL-6. Ces médiateurs contribuent à un stress oxydatif qui crée un environnement favorable aux dommages de l'ADN (Smith *et al.*, 2001; Archer, Dogra and Kyprianou, 2020).

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) participent à la phase de promotion tumorale en sécrétant des facteurs de croissance comme le TGF-β (*Tumor Growth Factor*) (Kalluri, 2016; Bedeschi *et al.*, 2023). Ils peuvent en parallèle induire une angiogenèse par production de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), ce qui va favoriser l'apport d'O_2 et de nutriments nécessaires à la survie et à la croissance tumorale (De Palma, Biziato and Petrova, 2017). Ils peuvent également permettre un résistance aux traitements par la sécrétion de cytokines, et faciliter la dissémination métastatique via la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Bedeschi *et al.*, 2023). Les macrophages associés au cancer (TAM), particulièrement ceux de type M2, sont associés à la progression tumorale, l'angiogenèse, l'immunosuppression et à l'invasion (Chen *et al.*, 2023).

La progression tumorale vers la dissémination métastatique repose sur une succession d'étapes importantes qui définissent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Au cours de ce processus, les cellules épithéliales, sous l'influence de facteurs extracellulaires du microenvironnement tumoral, perdent progressivement leur phénotype épithélial pour acquérir un phénotype mésenchymateux. Cette transformation favorise la migration et l'invasion des tissus adjacents et à distance de la tumeur primaire (Figure 6, étape 4) (Thiery, 2002). Cette transition est caractérisée par l'induction de l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Snail1/2, Twist1/2, ZEB1/2…) qui vont réprimer la transcription de gènes « épithéliaux » comme la E-cadhérine tout en activant l'expression de gènes mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine ou la fibronectine (Montanari *et al.*, 2017). Elle s'accompagne aussi d'une réorganisation du cytosquelette, d'une perte de la polarité apico-basale et des jonctions intercellulaires comme les jonctions GAP, de la production de protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire comme les MMPs facilitant ainsi la migration individuelle des cellules tumorales.

La progression tumorale se poursuit par l'étape d'intravasation, c'est-à-dire l'entrée des cellules cancéreuses soit directement dans la circulation sanguine (Figure 6, étape 5) ou soit indirectement via le système lymphatique et sa chaine ganglionnaire (Figure 6, étape 7). Ce processus est favorisé par la mise en place d'une néo(lymph)angiogenèse tumorale induite principalement par la famille des facteurs de croissance vasculaire (VEGF). Une fois dans la circulation, les cellules tumorales circulantes (CTC) font face à des contraintes mécaniques, notamment la pression sanguine et le cisaillement, ainsi qu'à la mort cellulaire induite par la perte d'adhérence, l'anoïkis, à laquelle elles peuvent résister par la mise en place d'une signalisation intracellulaire spécifique (Figure 6, étape 6). Enfin, le processus d'extravasation permettant la sortie des CTC de la circulation sanguine conduit à l'arrivée des cellules cancéreuses prostatiques sur des sites secondaires, préférentiellement dans les os (Figure 6, étape 8).

Les stades avancés, métastatiques, ou soumis depuis plusieurs années à des traitements hormonaux, induisent une évolution vers une androgéno-indépendance des cellules tumorales, complexifiant alors la prise en charge du patient.

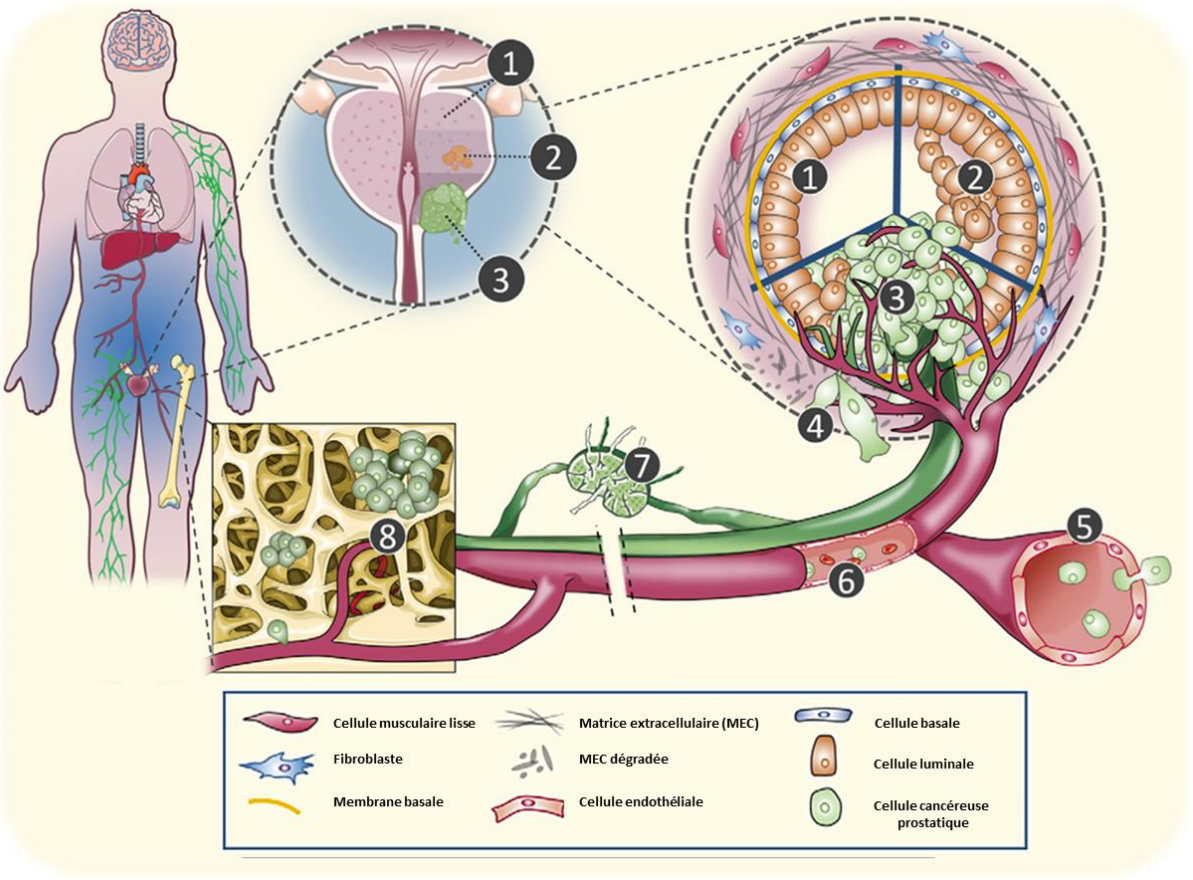


Figure 6 : Progression tumorale du cancer de la prostate

(1) Tissu épithélial normal, (2) néoplasie intraépithéliale prostatique, (3) adénocarcinome localisé avec prolifération incontrôlée de cellules tumorales. Les cellules cancéreuses peuvent se propager de la prostate à d'autres tissus, en particulier les os et les ganglions lymphatiques par l'acquisition progressive de traits et d'étapes spécifiques de progression du cancer (4 à 8) : (4) Transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT) et acquisition des capacités de migration et d'invasion, (5) Intravasation dans la circulation sanguine (rouge) ou lymphatique (verte) après angio- ou lymphangiogenèse induite par la tumeur, (6) cellules cancéreuses prostatiques circulantes, (7) métastases ganglionnaires, (8) micro à macrométastases dans l'os. Adapté de Boucher *et al,* 2018.

7. Tumeur secondaire : Métastase osseuse

Environ 80 % des patients atteints d'un cancer de la prostate avancé présentent des métastases osseuses, principalement au niveau du squelette axial (rachis, bassin, côtes). Le foie et les poumons constituent également des sites métastatiques mais leur atteinte est beaucoup moins fréquente. Le développement de ces métastases s'accompagne souvent de douleurs osseuses invalidantes, de fractures pathologiques et, dans certains cas, de compression médullaire. La prise en charge repose essentiellement sur des traitements systémiques (hormonothérapie, chimiothérapie, agents ciblant l'os comme les bisphosphonates ou le dénosumab) et des soins palliatifs visant à soulager la douleur et améliorer la qualité de vie.

a) L'os et le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé caractérisé par une matrice extracellulaire (MEC) minéralisée à 70% composée de cristaux d'hydroxyapatite qui confèrent à l'os sa dureté et sa résistance mécanique. La partie organique de la MEC est principalement composée de collagène de type I et de glycoprotéines telles que l'ostéopontine et l'ostéonectine, jouant un rôle dans la minéralisation et l'adhésion cellulaire. Le tissu osseux contient trois types cellulaires spécifiques :

- Les ostéoblastes synthétisant l'ostéoïde et favorisant sa minéralisation
- Les ostéocytes
- Les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse

Sur le plan structural, l'os s'organise en deux parties :

- L'os compact (cortical) : tissu dense et rigide situé en périphérie, constitué d'ostéons (unités structurales de base du système de Havers)

- L'os spongieux (trabéculaire) : situé à l'intérieur de l'os, formé d'un réseau de trabécules délimitant des cavités contenant la moelle osseuse (Figure 7).

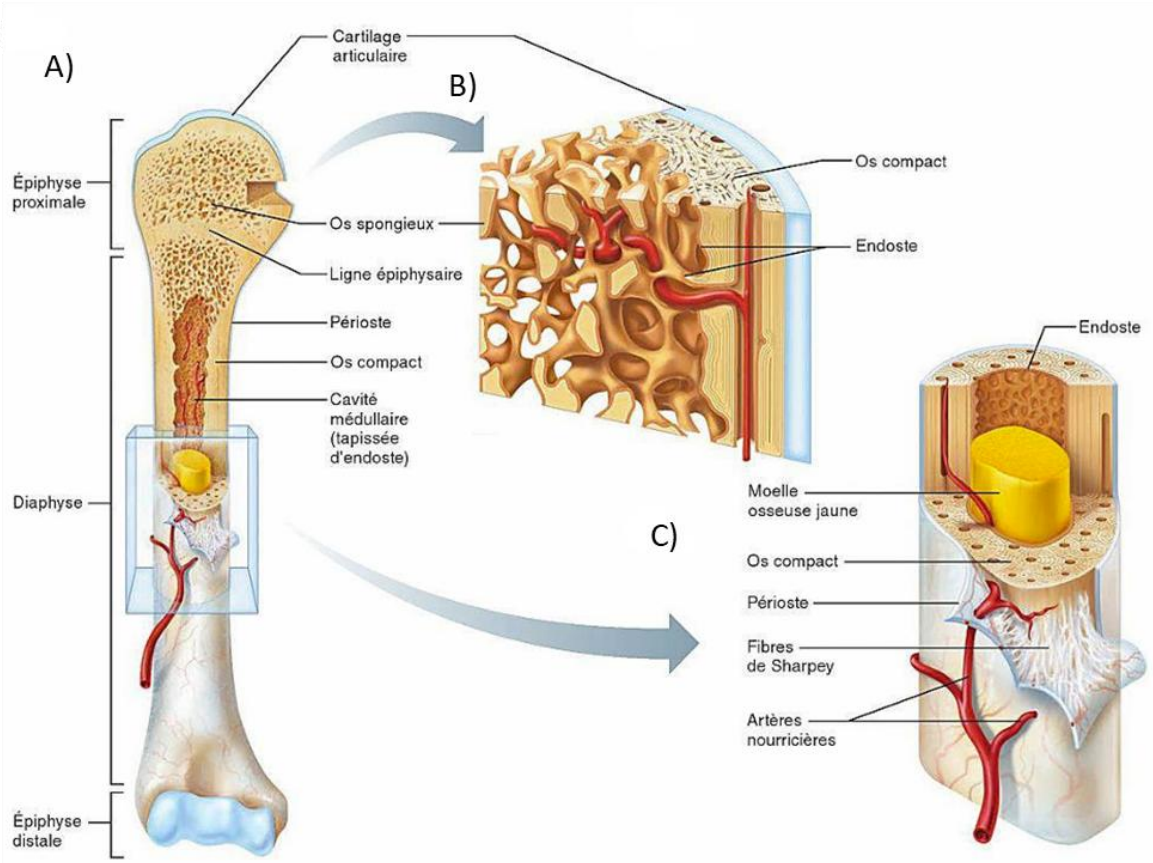


Figure 7 : Structure osseuse et composition

A) Vue antérieure en coupe frontale montrant l'intérieur de l'extrémité proximale. **B)** Zoom de l'épiphyse en vue 3D de l'os spongieux et de l'os compact. **C)** Zoom en coupe transversale de la diaphyse. La surface externe de la diaphyse est recouverte de périoste, tandis que la surface articulaire de l'épiphyse est recouverte de cartilage articulaire (hyalin, spécialisé pour résister aux frottements et à la pression). D'après E. N. Marieb et K. Hoehn, « Anatomie et Physiologie humaine », 9e édition, 2013.

Le remodelage osseux est un processus lent, local et séquentiel de résorption puis de formation osseuse qui s'effectue au niveau de structures transitoires appelées BMU (*Basic Multicellular Unit*) (Figure 8) et qui assure le remplacement d'un os ancien ou endommagé par un os néoformé, sans modifier la forme globale. Il se décompose en cinq phase :

- **Phase 1 : activation**

L'initiation de cette phase peut résulter d'un signal mécanique détecté par les ostéocytes ou d'un signal systémique comme la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH) sous l'effet d'une hypocalcémie qui va activer les ostéoblastes, ou la libération de facteurs circulants comme RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor NF-κB Ligand*).

- **Phase 2 : résorption**

Cette étape est caractérisée par la sécrétion de chimiokines par les ostéoblastes telles que MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) qui va attirer les pré-ostéoclastes et CSF-1 (*Colony Stimulating Factor-1,* également appelé M-CSF) et RANKL qui vont se fixer sur leurs récepteurs respectifs (CSF-1R et RANK) et stimuler la différenciation des pré-ostéoclastes. Ceux-ci vont alors proliférer et fusionner, donnant naissance à des cellules matures multinucléées. Ces ostéoclastes matures adhèrent à la MEC osseuse via des intégrines présentes dans des podosomes et acquièrent une polarité baso-apicale (Zambonin-Zallone *et al.*, 1988; Mulari, Väräniemi and Väänänen, 2003). Suite à l'activation de pompes à protons au niveau apical, l'acidification du milieu entraine la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Ce pH acide permet également une activité optimale de certaines protéases comme la cathepsine K, capable alors de dégrader le collagène-1. D'autres protéases sont aussi sécrétées comme les MMPs et TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase*) qui vont aussi participer à la résorption osseuse, créant ainsi une lacune de résorption (ou lacune de Howship).

- **Phase 3 : inversion**

Cette phase correspond d'une part à la disparition par apoptose des ostéoclastes qui se détachent des lacunes et d'autre part à l'élimination des débris cellulaires et matriciels de la zone de digestion par des macrophages spécialisés et au recrutement des pré-ostéoblastes.

- **Phase 4 : formation osseuse**

Au cours de cette phase, les ostéoblastes matures fabriquent la nouvelle matrice organique, l'ostéoïde, qui se minéralisera secondairement par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite sous le contrôle de la phosphatase alcaline (PAL). La lacune de résorption va être comblée, ce qui va restaurer l'architecture initiale de l'os.

- **Phase 5 : terminale**

Durant cette dernière phase, les ostéoblastes matures entrent en apoptose ou sont incorporés dans la nouvelle matrice minéralisée et se différencient alors en ostéocytes ou en cellules bordantes (Raggatt and Partridge, 2010).

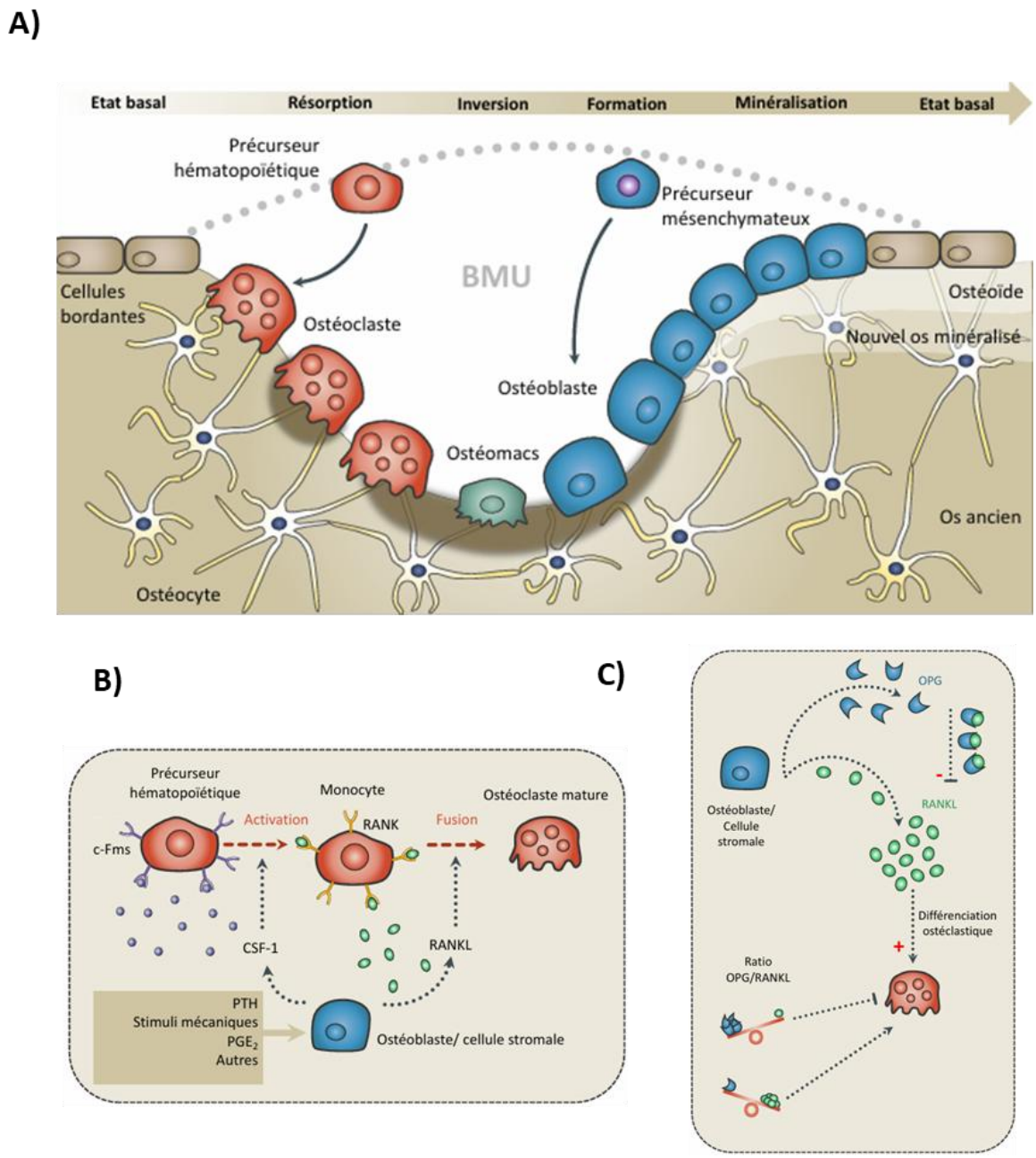


Figure 8 : Le remodelage osseux

A) Illustration décrivant les différentes étapes du remodelage osseux au sein de la BMU (*Basic Multicellular Unit*) et ses différents acteurs cellulaires. **B)** Origine cellulaire des cellules ostéoclastiques et leur voie de différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques : rôle de CSF-1 et de RANKL. **C)** L'ostéoblaste est l'initiateur de la différenciation ostéoclastique : balance RANKL/OPG. OPG : Ostéoprotégérine ; RANK : *Receptor Activator of Nuclear Factor* B; RANKL, RANK Ligand ; CSF-1, *Colony Stimulating Factor-1* ; c-Fms, CSF-1 receptor ; PTH, hormone parathyroïdienne ; PGE_2, Prostaglandine E2. Figure adaptée de la thèse de Jonathan Boucher (2018).

b) L'ostéotropisme du cancer de la prostate

Le tropisme osseux du cancer de la prostate s'explique en partie par la théorie du « seed and soil » formulée par le Docteur Stephen Paget en 1889, selon laquelle la dissémination métastatique n'est pas aléatoire mais dépend de l'interaction entre la cellule tumorale (« seed ») et un microenvironnement favorable à la survie et à la prolifération (« soil ») (Paget, 1989).

Ainsi, le tissu osseux constitue un « sol » particulièrement favorable à l'établissement des métastases du cancer de la prostate, car il est richement vascularisé et contient des facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse, comme le TGF-β ou le PDGF (*Platelet-derived growth factor*), qui sont libérés lors de la résorption osseuse et qui peuvent alors stimuler la prolifération des cellules cancéreuses (Horner *et al.*, 1996).

Plusieurs mécanismes d'interaction favorisent le tropisme osseux des cellules cancéreuses prostatiques. Parmi eux, l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle central : les cellules stromales de la moelle osseuse sécrètent la chimiokine CXCL12 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 12*) qui va attirer les cellules cancéreuses circulantes exprimant le récepteur CXCR4 (*Chemokine (C-X-C motif) Receptor*). Une expression élevée de CXCR4 est corrélée à un score de Gleason élevé, à un pronostic défavorable et à un risque accru de développement des métastases, conduisant souvent à un échec thérapeutique (Singh *et al.*, 2004).

8. La niche métastatique osseuse

Au cours de la dissémination métastatique du cancer de la prostate, la moelle osseuse représente un site privilégié de colonisation. Les tumeurs secondaires ne s'y développent pas de manière autonome mais évoluent au sein de microenvironnements spécialisés, appelés niches tumorales, qui régulent leur survie, leur plasticité et leur potentiel métastatique.

Après leur entrée dans la circulation, les cellules tumorales prostatiques migrent vers l'os et s'y établissent durablement au sein de deux niches complémentaires : la niche ostéogénique et la niche périvasculaire (Chen, Han and Kang, 2021). La niche ostéogénique, localisée à la surface osseuse, est riche en ostéoblastes et en composants matriciels osseux. Elle constitue le principal site d'implantation des métastases (Wang *et al.*, 2015). La niche périvasculaire (ou vasculaire),

plus interne est organisée autour des sinusoïdes et des cellules endothéliales. Les interactions dans ces sites entre les cellules tumorales et le microenvironnement osseux, régulent de manière fine l'entrée en dormance ou la réactivation des cellules tumorales disséminées.

Les mécanismes de homing engagés par ces cellules miment ceux des cellules souches hématopoïétiques (HSCs), de sorte qu'une compétition s'instaure entre cellules tumorales et HSCs pour l'accès aux niches, la quiescence, la survie, le renouvellement et la croissance (Ottewell, 2016; Shiozawa *et al.*, 2016). Après implantation, les cellules tumorales entrent fréquemment en dormance pendant des années avant d'être réactivées et former des micro- puis des macrométastases, ce qui explique des récidives tardives après prostatectomie. La niche endostéale tend à maintenir la dormance, tandis que la niche périvasculaire peut l'induire, la lever et soutenir la prolifération. Les ostéoblastes, présents au niveau de la niche ostéogénique (ou endostéale, terme principalement utilisé dans le cadre de l'hématopoïèse), favorisent l'entrée et le maintien des cellules tumorales en phase de dormance via des signaux moléculaires tels que BMP7 (*Bone Morphogenic Protein 7*), Wnt5a et SIAH2. Wnt5a sécrété par le microenvironnement, induit la dormance des cellules tumorales prostatiques en activant la voie ROR2/SIAH2, ce qui réprime la voie Wnt/β-caténine. Lorsque Wnt5a est inhibé, les cellules tumorales retrouvent leur capacité proliférative (Ren *et al.*, 2019). Par ailleurs, le TGF-β2 agit principalement par les voies impliquant p38 et p21, comme cela a été démontré sur la lignée PC-3 (Kobayashi *et al.*, 2011; Cackowski and Heath, 2022) (Figure 9A). L'activation de la voie p38 permet à la cellule tumorale de maintenir un état de quiescence, favorisant ainsi la dormance (Aguirre-Ghiso, 2007; Redoute-Timonnier and Auguste, 2024). À l'inverse, l'activation des ostéoclastes et le processus de résorption osseuse contribuent à la réactivation des cellules tumorales dormantes en libérant des facteurs de croissance matriciels (tel que le TGF-β1 ou l'IGF-1), créant ainsi un microenvironnement propice à leur prolifération (Figure 9B). Ce "switch" ostéoblastes/ostéoclastes constitue donc un mécanisme central dans le contrôle spatio-temporel des métastases osseuses (Dai *et al.*, 2022).

Une fois « réactivées », les cellules tumorales détournent le remodelage osseux et instaurent un cercle vicieux. Comme proposé par Mundy et Guise à la fin des années 1990, l'adaptation au microenvironnement osseux conduit les cellules à exploiter les propriétés des cellules résidentes pour amplifier leur propre croissance (Mundy, 1997; Guise, 2002). Dans le cadre du cancer de la prostate, ce processus conduit majoritairement à des métastases de type ostéoblastiques, en lien avec une inhibition relative de la biogénèse des ostéoclastes, et une

activité accrue des ostéoblastes. L'activité ostéoclastique demeure toutefois un prérequis essentiel à l'ostéogenèse métastatique, dans la mesure où les processus de résorption et de formation osseuse coexistent et se stimulent mutuellement (Keller and Brown, 2004). Les cellules tumorales sécrètent notamment ET-1, PDGF, BMP, IGF, FGF, TGF-β, VEGF, uPA et PTHrP, qui stimulent la différenciation ostéoblastique et la production d'une matrice non minéralisée riche en facteurs de croissance et protéines non collagéniques, ce qui favorise la survie, la prolifération et le recrutement de nouvelles cellules tumorales, accélère la boucle pro-tumorale. En parallèle, les ostéoclastes contribuent au phénotype ostéocondensant par leur activité de résorption qui crée des sites de recrutement pour les progéniteurs ostéoblastiques et libère des facteurs matriciels, tels que le TGF-β (*Transforming Growth Factor)* et IGF, qui renforcent la croissance tumorale. L'activation des ostéoclastes résulte principalement de la production de RANKL par les ostéoblastes, stimulée par plusieurs facteurs tumoraux tels que PTHrP, IL-6 et CCL2. A l'inverse, l'élévation des taux d'ostéoprotégérine (OPG) observée chez des patients porteurs de métastases prostatiques, suggère une sécrétion locale de ce facteur par les ostéoblastes. En antagonisant RANKL, l'OPG freine la résorption et favorise l'ostéocondensation caractéristique de ces lésions (Ibrahim *et al.*, 2010; Lacey *et al.*, 2012; David Roodman and Silbermann, 2015; Ottewell, 2016).

Ainsi, les cellules cancéreuses qui atteignent ces niches, notamment ostéogéniques, peuvent entrer en dormance, ce qui explique la latence de développement des métastases et la réapparition tardive du cancer. Cette dormance est induite par la sécrétion de facteurs ostéoblastiques comme TSP1 (Trombospondin-1), BMP7 (*Bone Morphogenic Protein 7*), TGF-β2 et GAS6 (*Growth Arrest-Specific 6*), ce dernier agissant via son récepteur membranaire Axl exprimé par les cellules tumorales (Taichman *et al.*, 2013; van der Toom, Verdone and Pienta, 2016).

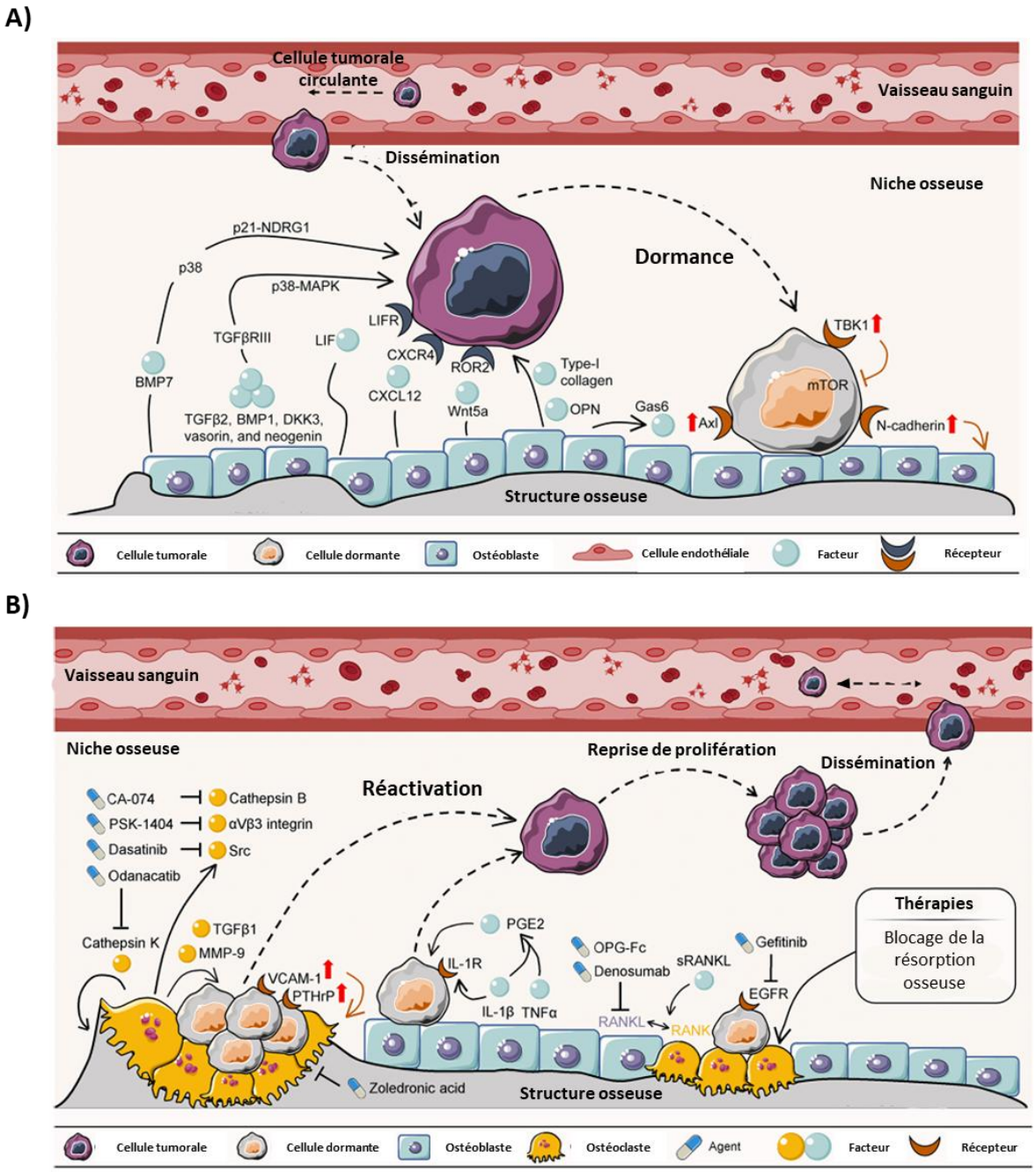


Figure 9 : Organisation de la niche ostéogénique

A) La formation osseuse médiée par les ostéoblastes peut initier et maintenir la dormance des cellules tumorales, via la sécrétion de différents facteurs comme CXCL12 ou Gas6. **B)** La résorption osseuse médiée par les ostéoclastes peut réactiver les cellules tumorales dormantes, via la sécrétion de différents facteurs comme le TGF-β1. Figure adaptée de Dai *et al*, 2022.

Au-delà de leur composition cellulaire, les niches osseuses se distinguent également par des paramètres physico-chimiques essentiels, notamment leur teneur en oxygène et en calcium, qui influencent fortement le comportement des cellules tumorales et leur interaction avec le microenvironnement osseux. La niche périvasculaire aussi faiblement oxygénée, mais pauvre en calcium et la niche ostéogénique qui présente également une hypoxie marquée mais possédant une forte concentration en calcium, exerçant une pression sélective importante sur les cellules tumorales (Wang *et al.*, 2015). Cette hypoxie module l'expression génique des cellules de cancer de la prostate, influence leur adaptation métabolique et leur réponse au stress, jouant ainsi un rôle déterminant dans la dynamique d'établissement des métastases osseuses (Thompson *et al.*, 2025).

Ainsi, le stress hypoxique va induire l'activation de la voie de signalisation HIF-1 (*Hypoxia-Inductible Factor 1*). Celui-ci est un facteur de transcription constitué de deux sous-unités, HIF-1α et HIF-1β. En normoxie, l'expression de HIF-1β est stable alors que HIF-1α est rapidement hydroxylé par les enzymes prolyl hydroxylases (PHD), qui utilisent l'oxygène comme cofacteur. Cette hydroxylation permet la reconnaissance de HIF-1α par la protéine pVHL (von Hippel-Lindau), qui recrute le complexe E3 ubiquitine ligase, entraînant la polyubiquitination et la dégradation par le protéasome. Lorsque la concentration en oxygène diminue, l'activité des protéines PHD est inhibée, empêchant l'hydroxylation de HIF-1α. Cette sous-unité échappe alors à la dégradation, s'accumule dans le cytoplasme, puis migre vers le noyau où elle s'associe à HIF-1β. Le complexe HIF-1 actif se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) dans les promoteurs de gènes cibles impliqués notamment dans l'angiogenèse (VEGF), le métabolisme glycolytique (transporteur de glucose de classe 1 : GLUT1) et la résistance au stress (Wang and Semenza, 1993; Dong *et al.*, 2022).

Physiologiquement, la stabilisation de son expression dans les niches hématopoïétiques endostéales permet le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (Takubo *et al.*, 2010; Suda, Takubo and Semenza, 2011). Dans le contexte métastatique, HIF-1α est fréquemment surexprimé et exerce différents effets comme stimuler l'expression de CXCR4, facilitant le homing des cellules tumorales vers le microenvironnement osseux riche en CXCL12 (Ishikawa *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2015), favoriser la dormance tumorale via l'augmentation de l'expression de p21 et TGF-β2 (Luo *et al.*, 2022; Diao *et al.*, no date), ou au contraire contribuer à la sortie de cet état de dormance par l'activation de HIF- α2 (Zhong *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2021).

L'hypoxie peut réguler positivement l'expression d'Axl (Nalwoga *et al.*, 2016), un récepteur surexprimé dans de nombreux cancers et aussi dans des lignées cancéreuses prostatiques métastatiques, comme les cellules PC-3 et DU-145, contrairement aux cellules LNCaP (lignée issue de métastases lymphatiques) (Mishra *et al.*, 2012). L'inhibition de l'expression de Axl dans ces cellules induit une diminution de l'expression de certains marqueurs de l'EMT tels que Snail, Slug et N-cadhérine, et en parallèle, et une augmentation de l'expression de E-cadhérine. De plus, Le ligand Gas6 induit un rétrocontrôle négatif sur l'expression d'Axl dans ces cellules, mais cet effet est inhibé en condition hypoxique induite par le $CoCl_2$.

Dans un contexte hypoxique mimant la niche ostéogénique (1% O_2), il a été montré que les vésicules extracellulaires (EV) sécrétées par des cellules cancéreuses prostatiques agressives (PC-3) induisent, chez des cellules moins invasives (LNCaP), une réponse pro-métastatique caractérisée par l'activation de la voie Wnt et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Ramteke *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2025).

De manière complémentaire, il a été rapporté que les exosomes sécrétés par des cellules cancéreuses prostatiques en condition hypoxique participent également à la préparation des niches pré-métastatiques en stimulant l'activité des MMPs. Cette activation enzymatique contribue au remodelage de la matrice extracellulaire, rendant le microenvironnement plus permissif à l'invasion et à la colonisation des cellules tumorales circulantes. Ainsi, l'hypoxie favorise non seulement la communication intercellulaire locale via les EVs, mais aussi la modification à distance des tissus cibles, renforçant le potentiel métastatique global des cellules prostatiques agressives (Deep *et al.*, 2020). Ce mécanisme suggère qu'en hypoxie, les cellules tumorales peuvent reprogrammer leur microenvironnement par la libération de messagers diffusibles tels que les EVs, favorisant la sortie de dormance et la progression métastatique dans l'os.

Dans une revue récente de 2021, les auteurs mettent en évidence les similarités entre les niches des cancers solides et hématologiques, notamment le rôle crucial des cellules stromales, vasculaires et immunitaires dans le maintien d'un dialogue bidirectionnel avec les cellules tumorales (Mancini *et al.*, 2021). Ces niches se caractérisent par des gradients d'oxygène, de nutriments et de cytokines qui modulent des voies clés telles que CXCL12/CXCR4, Wnt, ou encore HIF-α, influençant la dormance, la migration et la résistance thérapeutique des cellules cancéreuses (Figure 10). Les cellules de soutien du micro-environnement tumoral ne sont pas homogènes, ont des phénotypes variés, et jouent des rôles différents selon le type de tumeur : pro-prolifération, migration. Le microenvironnement sécrète des signaux (CXCL12, CXCR4,

IL-1β, etc) qui favorisent à la fois la survie, la quiescence ou la dissémination des cellules tumorales. Les cellules stromales peuvent transférer des mitochondries, ou des métabolites, aux cellules tumorales influençant l'agressivité des cellules cancéreuses. Ils soulignent que les mécanismes de remodelage matriciel, d'angiogenèse et de transfert de signaux intercellulaires sont partagés entre tumeurs solides et hématologiques, suggérant que la niche pré-métastatique constitue une cible thérapeutique majeure (Mancini *et al.*, 2021). Cette vision intégrée du microenvironnement tumoral offre ainsi un cadre conceptuel essentiel pour comprendre comment les interactions cellule-niche participent à la progression et à la dissémination tumorale.

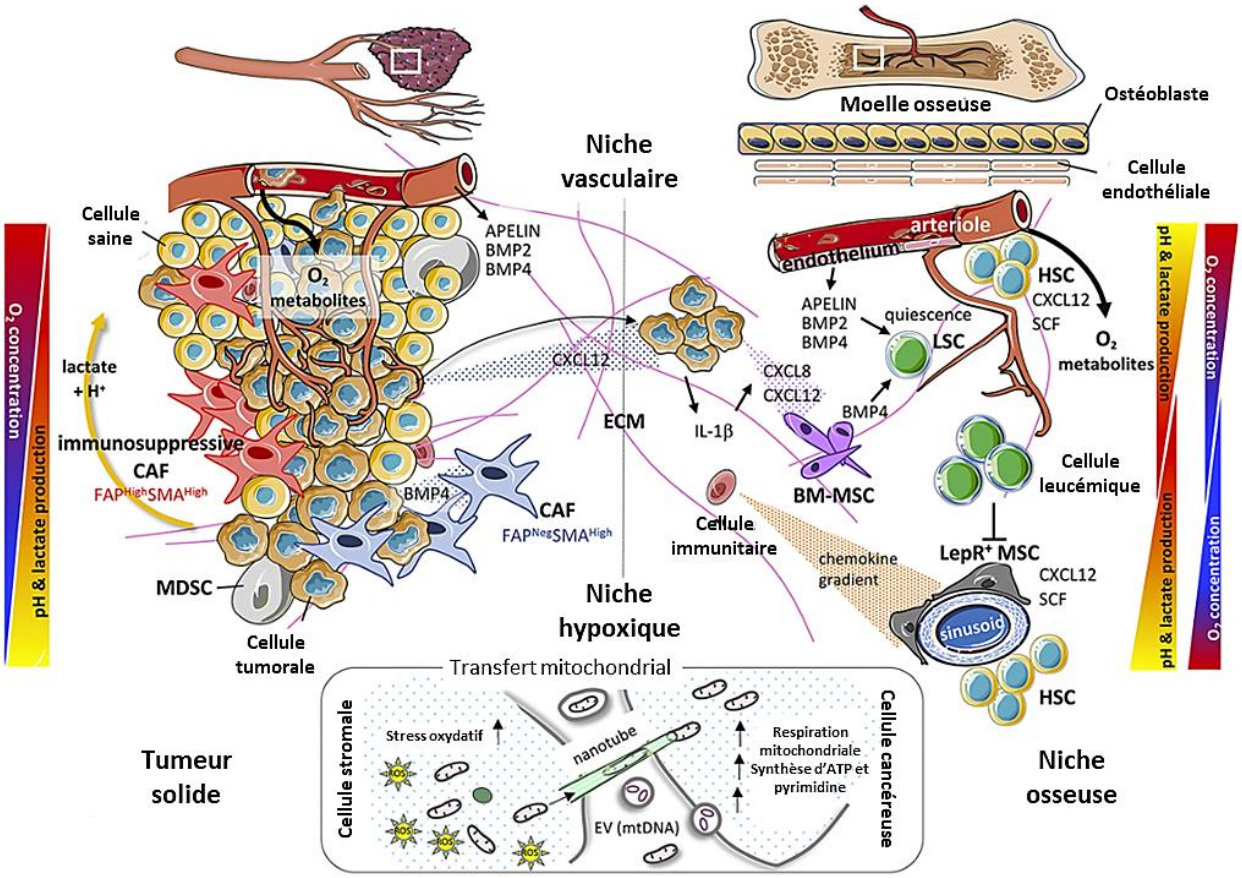


Figure 10 : Parallèle entre le microenvironnement et acteurs cellulaires de la niche de la tumeur solide et celui de la moelle osseuse

À gauche : la tumeur solide comprend des cellules tumorales, des cellules saines, des fibroblastes associés au cancer (CAF) et des cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC), évoluant dans des gradients d'oxygène, de pH et de facteurs de croissance (BMP2, BMP4) qui influencent la prolifération et la dissémination métastatique.

À droite : la niche médullaire contient des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des cellules stromales mésenchymateuses (BM-MSC), des cellules immunitaires et des cellules tumorales ou leucémiques, soumises à des gradients similaires (oxygène, pH, facteurs BMP2, BMP4, SCF, APELIN et cytokines CXCL8, CXCL12, IL-1β). Les gradients d'oxygène proviennent de la diffusion depuis les vaisseaux (niche vasculaire) et conditionnent l'adaptation métabolique des cellules, générant un gradient de pH via la production de lactate et de protons.

En bas : transfert horizontal de mitochondries des cellules stromales vers les cellules tumorales ou immunitaires par nanotubes, vésicules extracellulaires ou librement, permettant l'adaptation métabolique (respiration, ATP, synthèse de pyrimidines) face aux stress et besoins énergétiques.

Figure adaptée de Mancini *et al.*, 2021.

9. Conclusion « Cancer de la prostate »

Le cancer de la prostate est un adénocarcinome à évolution lente, touchant majoritairement les hommes de plus de 60 ans. Bien que son taux de survie à cinq ans soit élevé lorsqu'il est diagnostiqué à un stade localisé, il chute drastiquement lors de la survenue de métastases osseuses, qui constituent le principal site secondaire de dissémination. Ce cancer présente une forte hétérogénéité moléculaire et cellulaire, rendant le diagnostic et la prise en charge particulièrement complexes. Les interactions dynamiques entre les cellules tumorales prostatiques et la niche osseuse jouent un rôle déterminant dans la formation des métastases. Les cellules cancéreuses disséminantes sont attirées vers l'os par des signaux chimiotactiques, et s'y installent au sein d'un microenvironnement favorable. Dans cette niche, un cercle vicieux s'instaure entre cellules tumorales, ostéoblastes et ostéoclastes, favorisant la prolifération, la résistance thérapeutique et parfois la mise en dormance des cellules métastatiques. Ces foyers dormants peuvent persister plusieurs années avant de se réactiver, conduisant à des rechutes tardives du cancer de la prostate et un potentiel échec thérapeutique.

Dans ce contexte de dialogue intercellulaire étroit entre les cellules tumorales et les composants du microenvironnement osseux, apparait un acteur clef, la connexine 43 (Cx43). C'est une protéine structurelle des jonctions GAP qui permet le passage direct d'ions et de petites molécules entre cellules adjacentes, assurant ainsi la coordination des réponses tissulaires. Dans un contexte tumoral, le rôle de cette connexine se révèle ambivalent. Selon le stade et le microenvironnement, la Cx43 peut soit freiner la croissance tumorale en maintenant une certaine cohésion tissulaire, soit au contraire favoriser la migration et la dissémination des cellules cancéreuses. Lorsque les cellules cancéreuses sont localisées dans la tumeur primaire, la Cx43 est membranaire et permet aux cellules de proliférer. Lorsque les cellules cancéreuses deviennent migrantes et invasives, l'expression de la Cx43 est diminuée et relocalisée dans le cytoplasme. Arrivées sur le site métastatique osseux, elle est très fortement exprimée, permettant le développement de métastases.

Ainsi, la Cx43 représente un élément central du dialogue entre cellules prostatiques et niche osseuse, capable d'influencer la progression métastatique, la dormance ou la réactivation des cellules tumorales. Le chapitre suivant sera consacré à cette protéine multifonctionnelle, une protéine aux multiples facettes.

II. Connexine 43 et cancer

1. Historique des connexines

En 1936, en étudiant les phénomènes de transmission électrique entre cellules, le physiologiste Höber a constaté que certaines réponses cellulaires ne pouvaient pas être expliquées uniquement par des signaux extracellulaires (Höber, 1936). Il a alors été le premier à émettre l'hypothèse de l'existence de structures intercellulaires permettant un échange direct de molécules entre cellules. Par la suite, un autre physiologiste, Siegfried Weidmann, en 1952, est venu étayer cette hypothèse avec ses travaux sur les fibres de Purkinje qui ont permis de confirmer expérimentalement l'existence d'une connexion électrique intercellulaire, en observant la continuité de la propagation électrique entre cellules. Il a apporté une preuve fonctionnelle que les cellules du tissu cardiaque sont électriquement couplées, et que ce couplage ne dépend pas uniquement de mécanisme chimique ou extracellulaire. Il a démontré ainsi la présence de zones de moindre résistance électrique (Weidmann, 1952). En 1959, Furshpan et Potter ont mis en évidence, chez les crustacés, un mode de communication neuronale reposant sur une transmission électrique directe entre cellules, marquant ainsi la première démonstration fonctionnelle des synapses électriques. Grâce à leurs observations, ils ont été les premiers à suggérer l'existence de contacts intercellulaires spécialisés permettant un couplage électrique rapide (Furshpan and Potter, 1959). En 1965, Loewenstein a montré que dans des tissus non-excitables électriquement, comme des épithéliums de vessie ou de glande salivaire, que des mouvements ioniques avaient lieu entre les cellules via des jonctions, démontrant ainsi que ces échanges intercellulaires n'étaient pas uniquement de nature électrique (Loewenstein *et al.*, 1965). En 1967, à l'aide du lanthane, un marqueur utilisé en microscopie électronique pour détecter des espaces perméables (comme les espaces intermembranaires) entre les cellules adjacentes, ils ont révélé l'existence d'un espace de 20 Å (soit 2 nm) entre les cellules où ce traceur pouvait diffuser, confirmant l'existence de structures spécialisées. Revel et Karnovsky, ont ainsi démontré expérimentalement par l'observation microscopique de fine couche de cœur de souris, l'existence de structure intercellulaire (Revel and Karnovsky, 1967). Le terme « Gap junction » a été utilisé pour la première en 1969 pour désigner ces structures (Payton, Bennett and Pappas, 1969), et celui de « connexine », pour nommer les protéines constitutives de ces jonctions, est apparu pour la première fois en 1974 (Goodenough, 1974).

Les séquençages des gènes de connexines ont débuté dans les années 1980, avec notamment en 1986, la publication de la première séquence codante de connexines (Kumar and Gilula, 1986). Historiquement, c'est la Cx32 qui fût identifiée et caractérisée en premier (Paul, 1986). Depuis 2003, cette famille multigénique est décrite comme ayant 21 connexines différentes répertoriées chez l'Homme, et 20 chez la souris. Leur nomenclature se base historiquement sur le poids moléculaire apparent (Söhl and Willecke, 2003) (Table 2), bien qu'une classification phylogénique ait été proposée en 2006, mais reste peu utilisée (Eastman *et al.*, 2006). Ainsi, la connexine 43 (Cx43), décrite pour la première fois en 1987, codée par le gène *GJA1* (*Gap Junction protein alpha 1*), présente un poids moléculaire de 43 kDa. Son expression est ubiquitaire et c'est la connexine la plus répandue dans le corps humain et la plus étudiée (Figure 11) (Beyer, Paul and Goodenough, 1987).

Les innexines et les pannexines sont des familles de protéines apparentées aux connexines, bien qu'elles puissent se retrouver dans des organismes différents et remplissent des rôles similaires. Les innexines sont présentes principalement chez les invertébrés, où elles forment des jonctions communicantes (ou Gap junctions) permettant le passage direct d'ions et de petites molécules entre cellules voisines, assurant ainsi une communication intercellulaire rapide. Chez les vertébrés, ce rôle est assuré par les connexines, mais on y trouve également les pannexines, homologues évolutifs des innexines, au nombre de trois : de Panx1 à 3 (Panchin *et al.*, 2000). Contrairement aux connexines, les pannexines ne forment généralement pas de jonctions communicantes ; elles fonctionnent plutôt comme des canaux uniques à la surface cellulaire, permettant la libération de molécules de signalisation comme l'ATP. Ainsi, innexines, pannexines et connexines illustrent trois solutions moléculaires apparentées pour assurer la communication cellulaire (Beyer and Berthoud, 2018).

Famille	Nom du gène (symboles officiels)	Nom protéique (Cx - convention historique)	Localisation (Chromosome)
GJA (alpha)	GJA1	Cx43	6
	GJA3	Cx46	1
	GJA4	Cx37	1
	GJA5	Cx40	1
	GJA8	Cx50	1
	GJA9	Cx59	1
	GJA10	Cx62	6
GJB (beta)	GJB1	Cx32	X
	GJB2	Cx26	13
	GJB3	Cx31	1
	GJB4	Cx30.3	1
	GJB5	Cx31.1	1
	GJB6	Cx30	13
	GJB7	Cx25	6
GJC (gamma)	GJC1	Cx45	17
	GJC2	Cx47	1
	GJC3	Cx30.2 / Cx31.3	7
GJD (delta)	GJD2	Cx36	15
	GJD3	Cx31.9	17
	GJD4	Cx40.1	10
GJE (epsilon)	GJE1*	Cx23*	6

Table 2 : Les connexines, une famille multigénique

Tableau indiquant le nom du gène, associé à la protéine codée, et sa localisation (chez l'Homme). * GJE1 contient un codon stop prématuré et aucune protéine Cx23 fonctionnelle n'a été détectée dans les tissus humains. D'après de Söhl et Willeck, 2003 et Estaman *et al*, 2006.

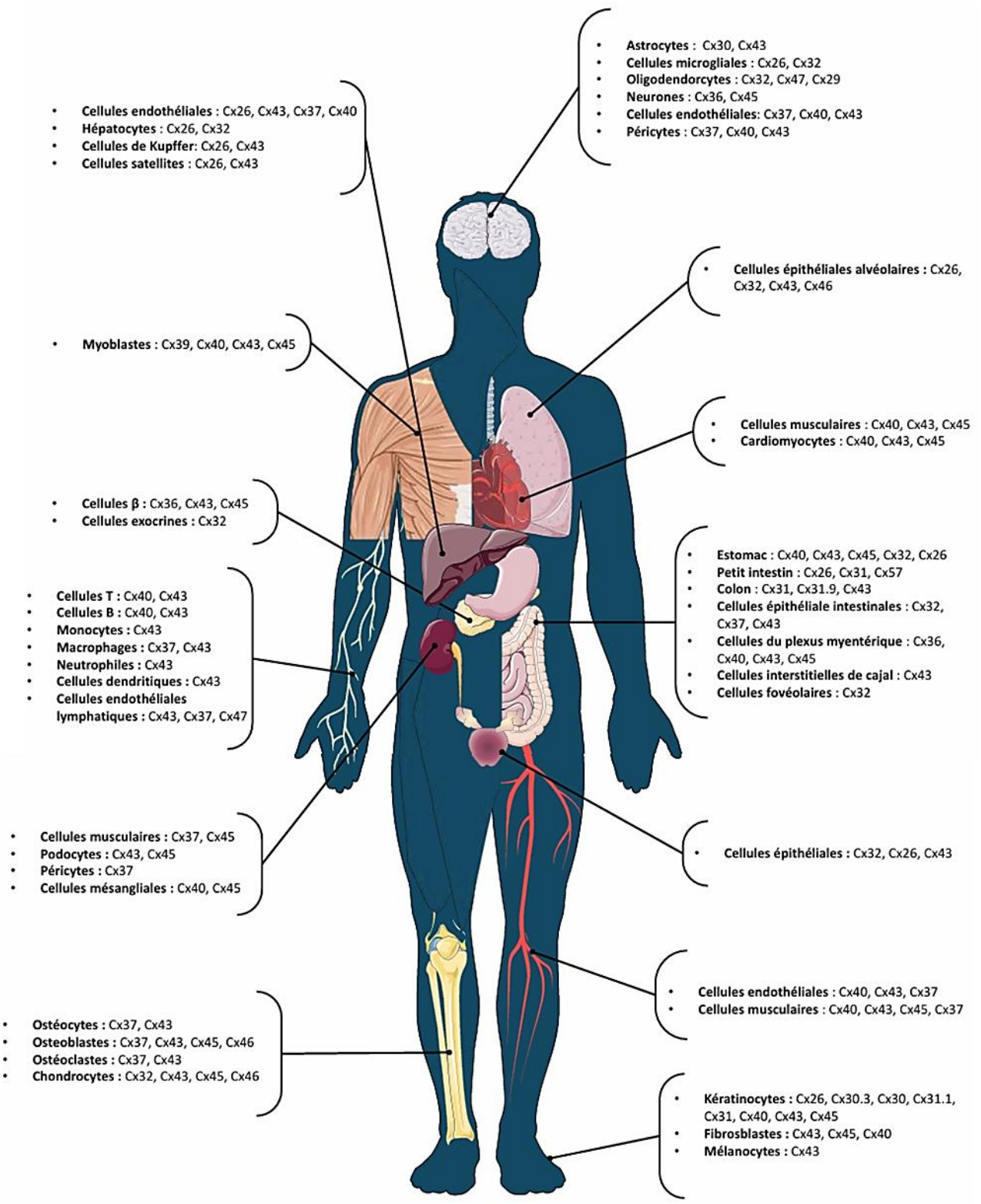


Figure 11 : Schéma de la distribution des différentes connexines dans le corps humain

Distribution des différentes connexines dans les tissus sains humains. Issue de la thèse de Jonathan Boucher (et inspirée de Joost Willebrords, 2017).

2. Structure des connexines

Les gènes codant les connexines partagent une organisation relativement conservée, généralement constituée d'au moins deux exons, séparés par un ou plusieurs introns de taille variable. Dans la plupart des cas, la région 5' non traduite (5'UTR) est située dans le premier exon, alors que la séquence codante complète ainsi que la région 3'UTR sont regroupées dans le deuxième exon. Des exceptions existent, comme pour le gène GJB1 (Cx32), où la 5'UTR peut être répartie sur plusieurs exons (Figure 12).

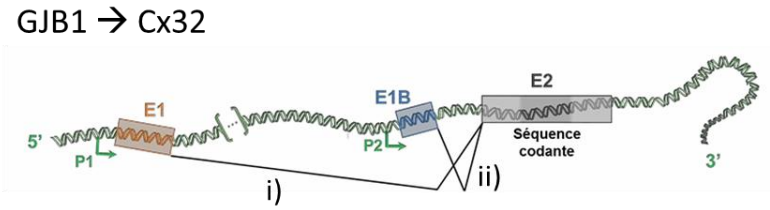


Figure 12 : Exemples de structure de gène de connexine et de mécanisme d'épissage

Un phénomène d'épissage alternatif est possible (flèches noirs) permettant la production de transcrits alternatifs pour la Cx32 i) dans le foie et ii) pancréas et tissu nerveux. E (exons), P1 (région promotrice basale) en amont du site d'initiation, P2 (région promotrice alternative) pour la production de transcrits alternatifs. Adaptée de Oyamada *et al*, 2005.

Sur le plan protéique, les connexines présentent une homologie structurelle remarquable, décrite par les premières représentations en 1987 (Zimmer *et al.*, 1987), et largement affinée par des approches de cristallographie et cryo-microscopie électronique (Maeda *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2018) (Figure 13A) :

- **Un domaine N-terminal (NT)** intracellulaire, très conservée, principalement impliquée dans le mécanisme d'ouverture et fermeture du canal

- **Quatre domaines transmembranaires (TM1-4)**, enchâssés dans la bicouche lipidique. Ils sont organisés en hélice alpha hydrophobes de 20 acides aminés, essentiels à la formation du pore. Ces domaines sont très conservés entre les connexines

- **2 boucles extracellulaires (EL1-2)**, organisées en feuillets β, elles assurent l'interaction et l'alignement des hémicanaux adjacents pour former un canal intercellulaire fonctionnel. Elle possède un ensemble de trois cystéines hautement conservées, permettant de former des ponts disulfures avec les cystéines d'autres boucles, et celles de connexons opposés, les stabilisant lors de leur ancrage

- **1 boucle intracellulaire (IL)** située entre le deuxième et troisième segments transmembranaires TM2 et TM3. Elle se distingue par une grande variabilité de séquence et de longueur d'une isoforme à l'autre, contrairement aux domaines transmembranaires et aux boucles extracellulaires qui sont plus conservés. Elle intervient dans la modulation de l'ouverture et de la fermeture du canal. Elle joue un rôle également dans le trafic intracellulaire des connexines, leur assemblage en hémicanaux (connexons) et la dynamique de ces canaux au niveau de la membrane plasmique

- **Un domaine C-terminal (CT)** intracellulaire, domaine dont la longueur varie grandement selon les connexines/isoformes, pouvant être impliqué dans les phénomènes de régulation, phosphorylation, signalisation cellulaire. Cette variabilité explique notamment la différence de poids moléculaire entre les connexines : par exemple, cette extrémité est composée de 16 acides aminés pour la Cx26 et de 156 acides aminés pour la Cx43. Au-delà de la simple formation de canaux, cette région, riche en résidus sérine, thréonine et tyrosine, joue aussi un rôle clé dans la signalisation cellulaire et dans l'interaction avec le cytosquelette, notamment par son interaction spécifique avec les microtubules, influençant des processus tels que la migration cellulaire.

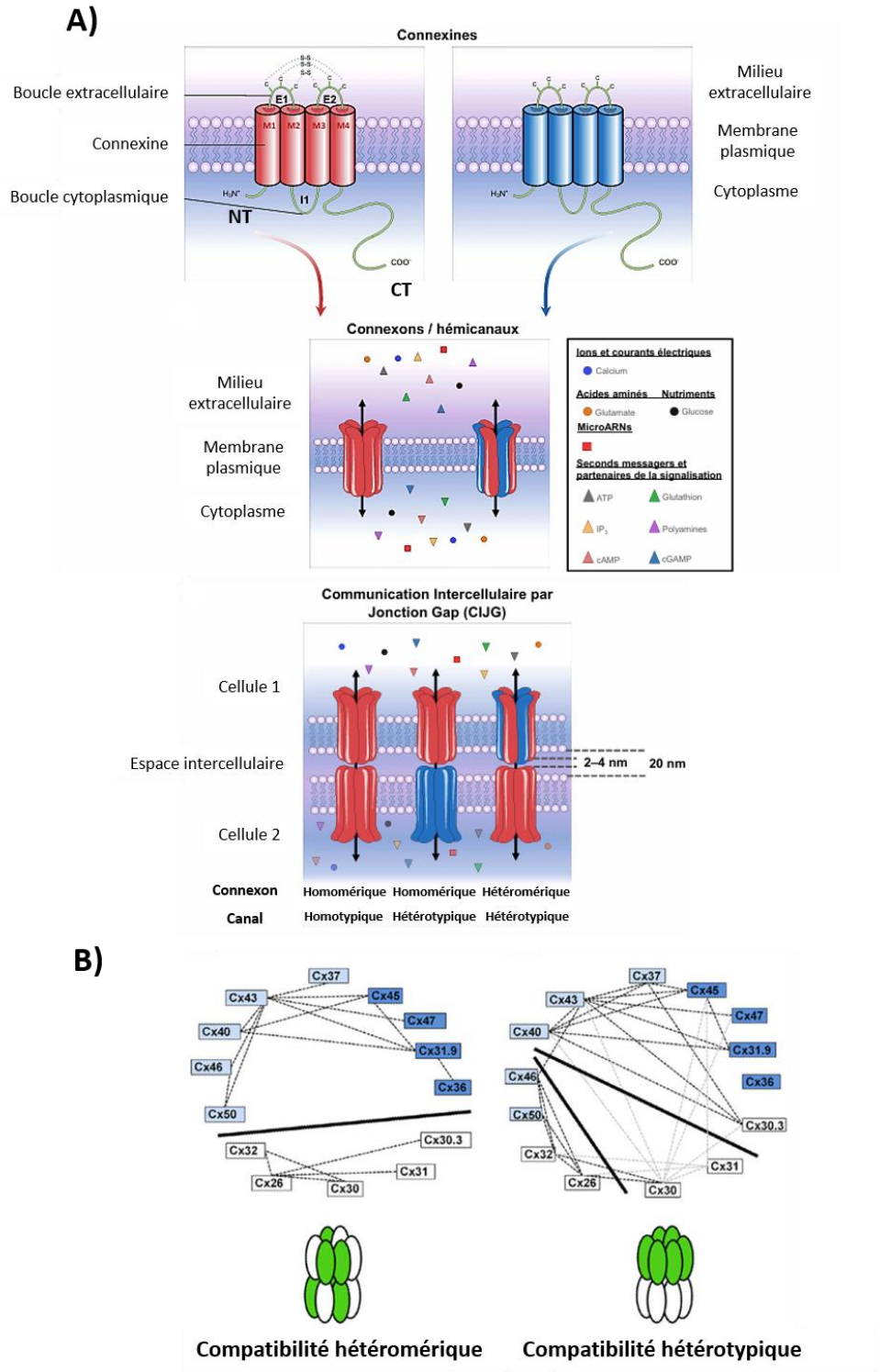


Figure 13 : De connexine à Jonction GAP

A) Structure primaire des connexines avec 4 domaines transmembranaires (M), deux boucles extracellulaires (E1 et 2) et une boucle intracellulaire (I1). Six connexines s'assemblent pour former un connexon/hémicanal. 2 connexons s'assemblent pour former une jonction GAP. **B)** L'appariement des hémicanaux peut se faire entre connexons homo- ou hétéromériques formant ainsi des canaux homo- ou hétérotypique. Cette compatibilité diffère suivant les connexines en question. Les Cx reliées entre elles par un trait peuvent former des canaux hétéromériques. Le grand trait noir sépare les Cx beta, des autres Cx. Figure adaptée de la thèse de Jonathan Boucher (2018) et Koval *et al*, 2014.

3. Fonction canalaire des connexines

La compréhension fine de la structure des canaux formés par les connexines a véritablement progressé au début des années 2000, notamment grâce à la cristallographie aux rayons X qui a résolu la structure de la Cx26 à 3,5 Å (Maeda *et al.*, 2009).

Les connexines s'assemblent en hexamères pour former une structure appelée connexon ou hémicanal (Figure 13A). Lorsque deux hémicanaux de cellules différentes s'accolent, cela constitue un canal intercellulaire et l'association de plusieurs canaux intercellulaires forment une jonction GAP. L'analyse des séquences protéiques suggère que le domaine TM3 joue un rôle central dans la formation du pore lors de l'assemblage des connexines en connexon, en raison de la présence de nombreux acides aminés hydrophiles qui seraient orientés vers l'intérieur pour délimiter la lumière du canal (Milks *et al.*, 1988). Pour former un canal, l'organisation optimale des connexons implique un décalage angulaire d'environ 30° lors de leur appariement (Perkins, Goodenough and Sosinsky, 1998; Unger *et al.*, 1999).

Les connexons peuvent être homomériques (composés de six connexines identiques), ou hétérométriques (composé d'au moins deux isoformes différentes) (Figure 13A). De même, les canaux intercellulaires peuvent être homotypiques (composés de deux connexons homomériques) ou hétérotypiques (composés de deux connexons différents), ce qui influence la perméabilité sélective des jonctions GAP (Kumar and Gilula, 1996). Par exemple, des canaux homotypiques composés exclusivement de Cx26 ou Cx32 présentent une perméabilité réduite à l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) ou aux IP_3, comparativement aux canaux hétérotypiques Cx26/Cx32, qui favorise leur passage (Ayad *et al.*, 2006). Ainsi, certaines associations sont compatibles (Cx26/Cx32), d'autres non (Cx32/Cx43) (Nakagawa *et al.*, 2011; Koval, Molina and Burt, 2014) (Figure 13B).

Des études structurales, notamment menées sur la Cx26, ont montré que le domaine N-terminal peut s'insérer dans le pore et agir comme un obturateur et moduler ainsi la perméabilité du canal (Maeda *et al.*, 2009). Ce domaine joue un rôle clé dans le gating des connexons et des canaux, en réponse à des signaux comme le pH, le voltage, la concentration en calcium ou en CO_2, le stress mécanique, l'état de phosphorylation, le potentiel rédox ou la présence d'acides gras (Giaume *et al.*, 2013; Pogoda *et al.*, 2016; Puebla *et al.*, 2017).

L'obturateur doit être en conformation permissive pour chaque connexon pour que les molécules puissent les traverser (Figure 14).

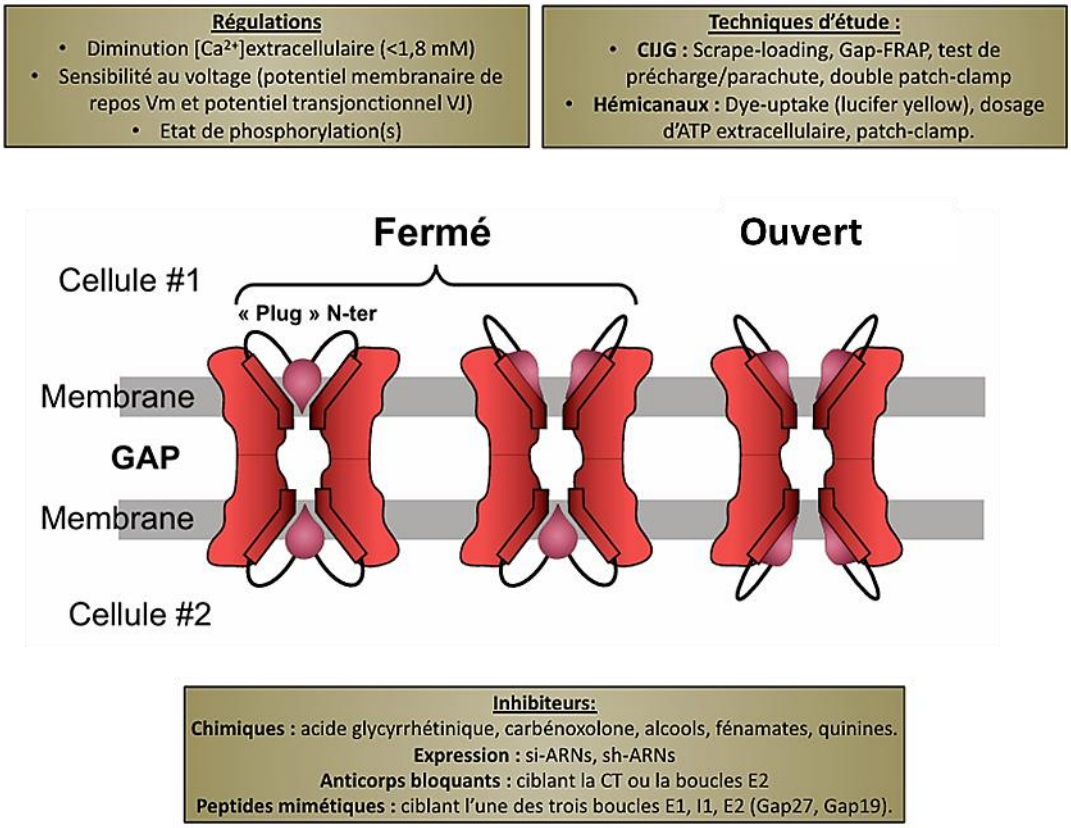


Figure 14 : Mécanisme d'ouverture/fermeture des hémicanaux/canaux et techniques d'études associées

Modèle du mécanisme de régulation de l'ouverture des canaux jonctionnels « Plug gating mechanism » : l'assemblage des connexines en hexamères conduit en la formation d'un plug liée au rassemblement des 6 extrémités N-ter. Selon l'orientation des plugs des deux connexons appariés, la lumière du canal peut ou non être obstruée et les canaux jonctionnels ouverts ou fermés. L'ouverture et la fermeture peuvent être régulées par le voltage, le calcium extracellulaire ou l'état de phosphorylation. Figure adaptée de la thèse de Jonathan Boucher (2018).

A travers ces hémicanaux/canaux, des molécules de poids moléculaire inférieure à 1,2 kDa peuvent circuler, tels que des ions, des nutriments, des métabolites comme le glucose ou l'acide ascorbique, des seconds messagers (AMPc, Ca^{2+}), des molécules de signalisation (ATP, NAD^{+}, IP_3, glutamate), ainsi que des miARN et des siARN. Des traceurs synthétiques diffusibles comme le Lucifer Yellow ou la calcéine sont utilisés expérimentalement pour étudier cette communication intercellulaire (Loewenstein, 1981; Giaume *et al.*, 2013) (Table 3).

Outre les molécules capables de transiter à travers les canaux formés par les connexines, il existe plusieurs agents pharmacologiques capables de moduler ou d'inhiber la communication intercellulaire via les jonctions GAP. Ces composés, bien que souvent non spécifiques, sont couramment utilisés pour découpler les cellules dans un cadre expérimental. Parmi eux, on retrouve les alcools aliphatiques à longue chaîne, tel que l'heptanol, qui perturbent la fluidité membranaire et entraînent une fermeture fonctionnelle des canaux (Watts *et al.*, 1994). D'autres inhibiteurs plus ciblés, comme les peptides mimétiques, ont été développés sur la base de séquences spécifiques des boucles extracellulaires des connexines. Par exemple, Gap26 et Gap27 bloquent respectivement les canaux formés par la connexine 43 (Cx43) et d'autres isoformes apparentées, en se liant aux domaines d'interaction extracellulaires, empêchant ainsi la formation ou la stabilisation des jonctions (Wang *et al.*, 2012). Enfin, des dérivés pharmacologiques tels que l'acide 18-α-glycyrrhétinique agissent en inhibant la communication intercellulaire par modification post-traductionnelle des connexines ou altération de leur distribution membranaire (Guo *et al.*, 1999).

Bien que ces molécules manquent souvent de sélectivité entre isoformes et puissent induire des effets secondaires sur la signalisation cellulaire, elles constituent des outils essentiels pour l'étude des fonctions physiologiques et pathologiques des connexines, notamment de la Cx43 dans les processus tumoraux et métastatiques.

Type de molécule	Exemples	Poids moléculaire (approx.)	Fonction	Exemples de connexines impliquées	Références
Ion	Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-	~<100 Da	Transmission électrique, homéostasie ionique	Cx26, Cx32, Cx43	Harris, 2001
Nucléotide	ATP, ADP, AMP, AMPc, GMPc	300–500 Da	Signalisation cellulaire	Cx26, Cx32, Cx40, Cx43	Harris, 2001 Essenfelder et al., 2004
Second messager	IP_3, Ca^{2+}	250–600 Da	Couplage fonctionnel, signalisation intracellulaire	Cx43, Cx26, Cx32	Veenstra, 1996 Harris, 2001
Sucre simple	Glucose, sucrose	~180–340 Da	Métabolisme, transfert énergétique	Cx43, Cx30	Harris, 2001
Peptide	Glutathion (GSH), peptides	~300–800 Da	Défense cellulaire, redox	Cx43, Cx46	Harris, 2001
Molécules synthétiques	Lucifer Yellow, Carboxyfluoresceine	~400	Test de perméabilité	Cx43, Cx26 Cx37, Cx40	Pepper, 1992 Hur, 2003

Table 3 : Les différentes molécules passant par les hémicanaux/Jonctions GAP

Tableau récapitulatif de différentes molécules naturelles ou synthétiques pouvant passer par les hémicanaux/canaux, associées à leur poids moléculaire et rôles, ainsi que des exemples de Cx.

4. Régulations fonctionnelles des hémicanaux et canaux intercellulaires

L'ouverture et la fermeture des hémicanaux et des canaux intercellulaires sont régulées par plusieurs facteurs physico-chimiques et post-traductionnels.

Parmi eux, le calcium extracellulaire joue un rôle majeur. A une concentration physiologique d'environ 1,8 mM, les hémicanaux restent fermés (Figure 15) (DeVries and Schwartz, 1992; Bayraktar, Lopez-Pigozzi and Bortolozzi, 2024), tandis qu'une diminution importante de la concentration extracellulaire (<200 nM), ou une privation de calcium, déclenche leur ouverture, comme observé pour différentes connexines (Cx26, Cx32, Cx43, Cx46 et Cx50) (Cotrina *et al.*, 1998; Peracchia, 2004). Le calcium peut se fixer à la calmoduline (CaM) qui interagit avec les connexines pour favoriser la fermeture, mécanisme décrit pour plusieurs connexines (Cx32, Cx38, Cx43, Cx44 et Cx50) (Zou *et al.*, 2014). La régulation des jonctions GAP par le calcium peut se faire via une voie calmoduline-dépendante. Lorsque la concentration intracellulaire en Ca^{2+} augmente, il se lie à la calmoduline, provoquant un changement de conformation qui expose des sites capables d'interagir avec certaines connexines, notamment la Cx43. Cette interaction modifie la conformation des canaux formés par les connexons, ce qui peut entraîner leur fermeture ou modifier leur perméabilité aux ions et petites molécules (Peracchia, 2024).

Des études structurales récentes ont montré que des résidus d'acides aminés chargés, exposés dans la lumière du canal via la boucle intracellulaire, participent à l'établissement et au maintien d'un réseau électrostatique qui stabilise une conformation ouverte. En présence d'ions Ca^{2+}, cet équilibre est perturbé, induisant un changement conformationnel favorable à la fermeture du canal (Lopez *et al.*, 2016).

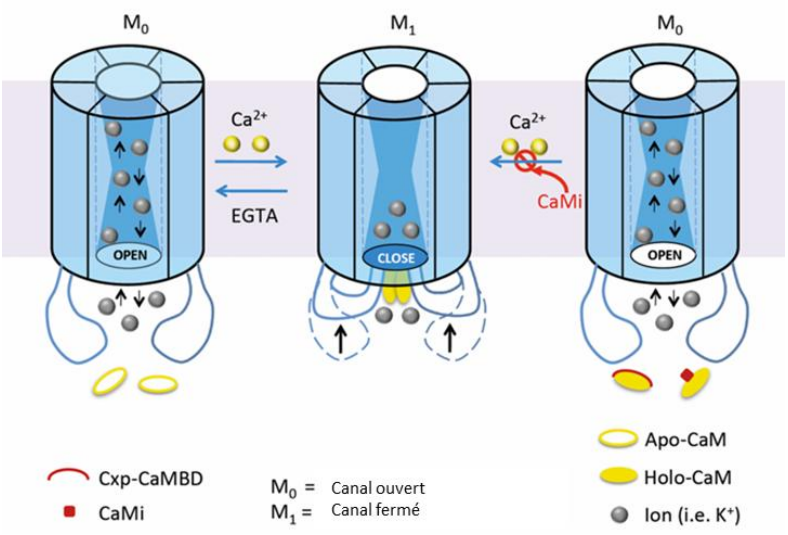


Figure 15 : Mécanisme de régulation des connexines

Modèle proposé de régulation de la fermeture des jonctions GAP (Cx43) par liaison directe Ca^{2+}/CaM. Dans ce modèle, la connexine Cx43 possède un état ouvert (M0) et un état fermé (M1). Ce mécanisme pourrait être dû à l'induction d'un changement conformationnel dans la boucle cytoplasmique (CL) de Cx43 via la liaison Ca^{2+}/CaM, un encombrement stérique de la liaison de CaM près de l'ouverture cytoplasmique du pore transmembranaire, ou une combinaison des deux. CaMi (CaM inhibiteur). Adapté de Zou et al, 2014.

Le potentiel membranaire module également la conductance des hémicanaux/canaux intercellulaires, notamment dans les cellules excitables. Ces structures sont sensibles à deux types distincts de champs électriques : le potentiel de membrane correspondant à la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule, et le potentiel transjonctionnel correspondant à la différence de potentiel entre deux cellules couplées (Bargiello *et al.*, 2018). La sensibilité des connexons dépend de leur composition en connexines. Par exemple, les canaux formés par la Cx43 ou Cx45 se ferment lorsque le potentiel transjonctionnel devient négatif, alors que ceux formés par la Cx26 ou Cx30 se ferment pour des potentiels positifs. Ainsi, chaque type de connexine présente un profil voltage-dépendant spécifique, influençant la manière dont la communication intercellulaire est régulée selon l'état électrique des cellules. La sensibilité des connexines au voltage peut induire deux types de fermeture des canaux (Rackauskas, Neverauskas and Skeberdis, 2010) :

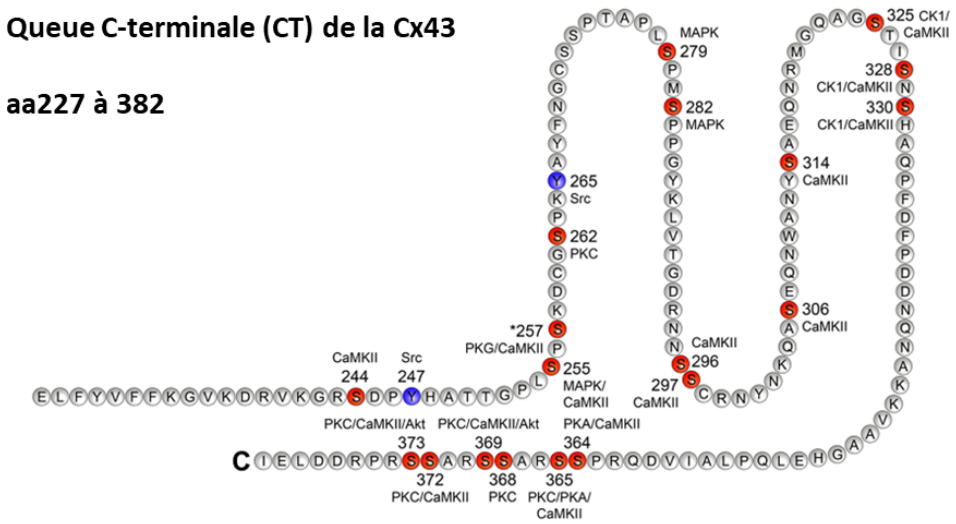
- Une fermeture rapide (inférieure à 1 ms, dite « *fast gating* »), par insertion du domaine N-terminal dans le canal (rôle d'obturateur), en réponse à des variations de voltage

- Une fermeture lente (supérieure à 10 ms, dite « *slow gating* »), qui implique les boucles extracellulaires (« *loop gating* »), induisant un changement conformationnel progressif.

Le pH intracellulaire influence aussi la perméabilité des jonctions, l'acidification ayant pour effet de diminuer la communication intercellulaire via les jonctions GAP. Cependant, la sensibilité au pH varie considérablement selon le type de connexines exprimé. Les connexines Cx43 et Cx32 y sont peu sensibles tandis que les connexines Cx50/Cx57 le sont fortement. Par exemple, dans des ovocytes de Xénope, la conductance de Cx50 diminue de 50 % dès pH 7,2, alors que pour Cx32, la réduction nécessite un pH proche de 6,5 (Liu *et al.*, 1993; Palacios-Prado *et al.*, 2009).

La majorité des connexines sont des phosphoprotéines, présentant de nombreux sites de phosphorylation sur des résidus de sérine, thréonine et tyrosine. La Cx43 possède ainsi 21 sites de phosphorylation (19 sérines et 2 tyrosines), localisés sur son extrémité CT (Figure 16) (Axelsen *et al.*, 2013). A l'inverse, la Cx26, dont le domaine CT est très court, n'est généralement pas considérée comme une phosphoprotéine. D'autres connexines, comme Cx36 et Cx56, présentent également des sites de phosphorylation situés sur la boucle intracellulaire I1, affectant principalement des résidus sérine et thréonine. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles pour la régulation des connexines, influençant leur trafic, leur insertion membranaire, leur stabilité, ainsi que la conductance et la perméabilité des jonctions communicantes. La phosphorylation modifie la charge nette de la partie C-terminale, ce qui peut moduler la sensibilité des canaux au voltage et au pH (Rackauskas, Neverauskas and Skeberdis, 2010).

Plusieurs kinases interviennent dans ces processus notamment des Sérine/Thréonine kinases : PKA (Protéine Kinase A) qui favorise l'insertion membranaire et l'activation des canaux Cx43 ; PKC (Protéine Kinase C) et MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinase*) qui induisent l'internalisation de Cx43 et inhibent l'ouverture des canaux (TenBroek *et al.*, 2001; Lampe and Lau, 2004) ; d'autres également comme : PKG (Protéine Kinase G), CaMKII (Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II), CK1 (Casein Kinase 1), p34cdc2 / cycline B kinase, Akt. On retrouve également des tyrosine kinases, telle que Src qui inhibe l'interaction de la Cx43 avec ZO-1 (Toyofuku *et al.*, 1999). Enfin, on peut retrouver dans une moindre mesure, des récepteurs de type EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).



Residu	PTM (Kinase(s))	Reference
K114	SUMOylation	Kjenseth et al. (2012)
K234	SUMOylation	Kjenseth et al. (2012)
S244	P (CaMKII)	Huang et al. (2010)
Y247	P (Src)	Lin et al. (2001), Solan and Lampe (2007)
S255	P (MAPK/CaMKII)	Warn-Cramer et al. (1996), Cameron et al. (2003), Huang et al. (2010)
S257*	P (PKG/CaMKII)	Kwak et al. (1995a), Kwak and Jongsma (1996), Huang et al. (2010)
S262	P (PKCε)	Doble et al. (2004), Axelsen et al. (2006), Srisakuldee et al. (2009)
Y265	P (Src)	Giepmans et al. (2001), Lin et al. (2001), Toyofuku et al. (2001), Solan and Lampe (2007)
C271	Nitrosylation	Straub et al. (2011)
S279	P (MAPK)	Warn-Cramer et al. (1996)
S282	P (MAPK)	Warn-Cramer et al. (1996)
S296	P (CaMKII)	Axelsen et al. (2006), Huang et al. (2010)
S297	P (CaMKII)	Axelsen et al. (2006), Huang et al. (2010)
S306	P (CaMKII)	Axelsen et al. (2006), Huang et al. (2010)
S314	P (CaMKII)	Huang et al. (2010)
S325	P (CK1/CaMKII)	Cooper and Lampe (2002), Huang et al. (2010)
S328	P (CK1/CaMKII)	Cooper and Lampe (2002), Huang et al. (2010)
S330	P (CK1/CaMKII)	Cooper and Lampe (2002), Huang et al. (2010)
S364	P (PKA/CaMKII)	TenBroek et al. (2001), Shah et al. (2002), Huang et al. (2010)
S365	P (PKC/PKA/CaMKII)	Shah et al. (2002), Huang et al. (2010)
S368	P (PKC)	Saez et al. (1997), Lampe et al. (2000), Shah et al. (2002), Bao et al. (2004), Axelsen et al. (2006), Ek-Vitorin et al. (2006)
S369	P (PKC/Akt/CaMKII)	Shah et al. (2002), Park et al. (2007), Huang et al. (2010)
S372	P (PKC/CaMKII)	Saez et al. (1997), Shah et al. (2002), Huang et al. (2010)
S372	P (PKC/Akt/CaMKII)	Shah et al. (2002), Park et al. (2007), Huang et al. (2010)

**Amino acid residue 257 of rat Cx43 is a serine. In human Cx43, residue 257 is an alanine.*
CaMKII, Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKG, protein kinase G; PKC, protein kinase C; CK1, casein kinase 1; PKA, protein kinase A. Akt is also known as protein kinase B.

Figure 16 : les différents sites de phosphorylation de la Cx43

Le domaine CT de la Cx43 possède 19 sites de phosphorylations sur des sérines (S) et 2 sites sur des tyrosines (Y). Les protéines impliquées dans ces phosphorylations et leur localisation sont indiquées juste au-dessus du site en question. En dessous se trouve un tableau avec les différents sites de phosphorylation avec les références. Figure adaptée de Axelsen *et al,* 2013.

Les modifications post-traductionnelles sont essentielles à la régulation des connexines, modulant leur trafic, leur insertion dans la membrane, leur stabilité et leur temps de demi-vie, ainsi que la conductance et la perméabilité des jonctions communicantes (Figure 17). La phosphorylation constitue un régulateur majeur des monomères de connexines (Cx), des hémicanaux et des canaux intercellulaires (Johnstone, Billaud, *et al.*, 2012).

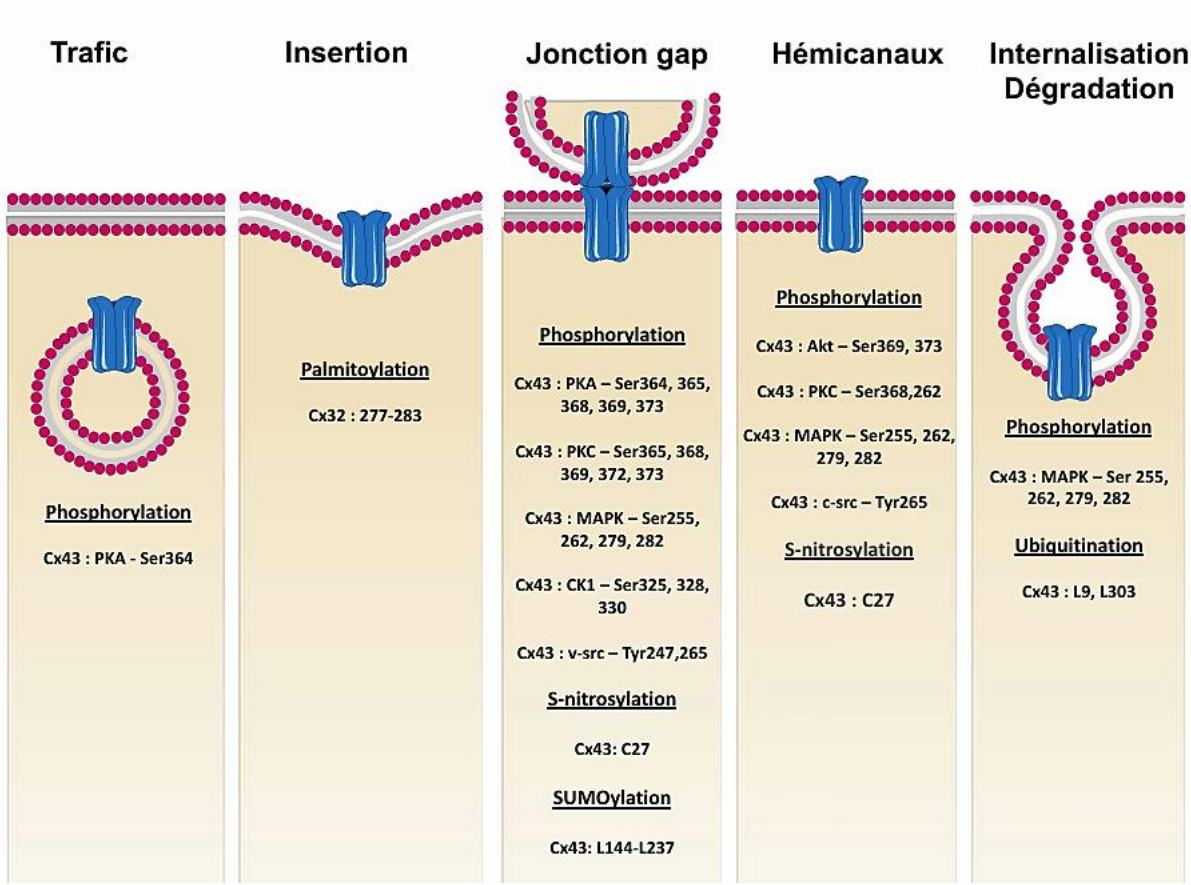


Figure 17 : Modifications post-traductionnelles dans le cycle de vie des connexines

Les principales modifications post-traductionnelles portant sur les mécanismes de trafic, d'insertion, de formation des jonctions GAP, des hémicanaux, d'internalisation et dégradation des connexines. Figure adaptée de Johnstone et al, 2012.

L'activité des kinases et phosphatases peut donc réguler le turn-over (1-5 h) des Connexines (trafficking, assemblage, stabilité), le couplage métabolique et électrique lors de la CIJG ou encore l'activité des hémicanaux individuels.

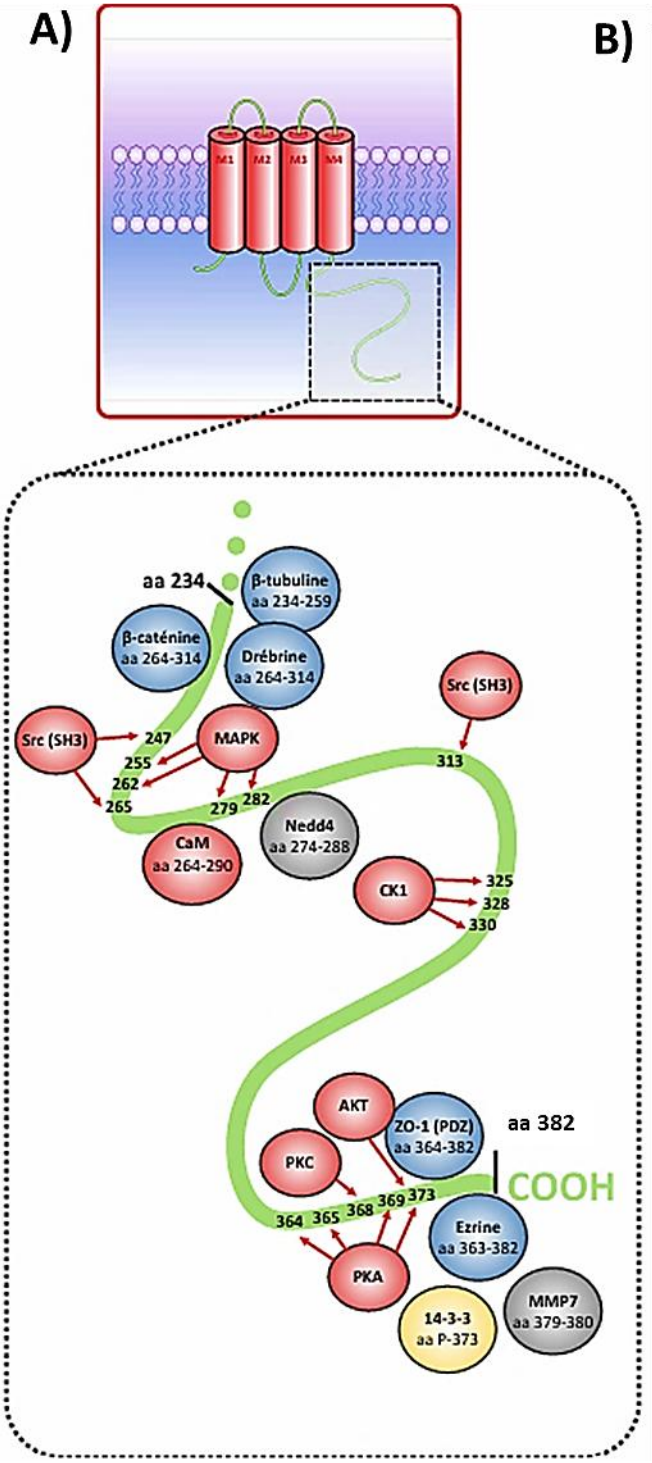
5. Rôle de la partie C-terminale – Focus sur la Cx43

Comme mentionné précédemment la partie CT des connexines peut représenter une proportion significative par rapport à la protéine totale. Pour la Cx43, ce domaine représente 40% de la protéine (156 acides aminés sur 382), ce qui en fait une plateforme idéale pour des interactions protéiques intracellulaires (Sorgen *et al.*, 2018). Cet interactome de la Cx43 est particulièrement varié, incluant des protéines du cytosquelette, des régulateurs du cycle cellulaire, des protéines de signalisation et des partenaires de jonctions membranaires. La figure 18 illustre les principales protéines connues pour interagir avec la Cx43.

Contrairement aux autres connexines, le domaine CT de la Cx43 possède un motif de liaison à la tubuline, alpha comme béta, (KGVKDRVKGK, aa 234 à 259) qui lui permet d'interagir avec les microtubules (Ben N. G. Giepmans *et al.*, 2001; Giepmans, Verlaan and Moolenaar, 2001). Cette interaction peut être inhibée par la phosphorylation de la tyrosine 247 par Src ou Tyk2, ce qui a pour conséquence d'accélérer le turn-over de Cx43 et de diminuer le nombre de jonctions communicantes (Saidi Brikci-Nigassa *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Les extrémités des microtubules peuvent interagir avec le domaine C-terminal (CT) de la Cx43, modulant ainsi la polarité et la motilité des cellules. Chez les fibroblastes embryonnaires de souris, cette interaction favorise la stabilisation et l'orientation des microtubules vers la membrane, améliore la directionnalité cellulaire et dynamise le trafic des microtubules, de manière indépendante de la fonction classique de jonctions GAP (Francis *et al.*, 2011).

La Cx43 interagit également avec la drébrine, une protéine associée à l'actine, via le motif « KYAYFNGCSSPT » (aa 264 à 314). Cette association est essentielle au maintien des épines dendritiques des neurone (Shirao and González-Billault, 2013). Elle se retrouve au niveau des jonctions GAP dans les astrocytes et les cellules épithéliales rénales de singe. La déplétion de Drebrin dans les cellules astrocytaires avec un siRNA entraîne une altération du couplage cellule-cellule, l'internalisation des jonctions lacunaires et le ciblage de Cx43 vers une voie de dégradation (Butkevich *et al.*, 2004).

A)



B)

Protéine d'interaction	Méthodes de mise en évidence
Actin	co-Loc
AGS8	IP, co-Loc
A-kinase anchoring protein 95	IP, co-Loc
Ankyrin G	IP
Apoptosis-inducing factor	IP, co-Loc, PLA
Atg16L/Atg14/Atg9/Vps34	IP, co-Loc
Bax	IP, co-Loc
β-arrestin	IP, co-Loc
β-subunit of the electron-transfer protein	IP, co-Loc, PLA
Brain-derived integrating factor-1	IP, co-Loc
CASK (LIN2)	IP, co-Loc
Caveolin-1,2,3	IP, co-Loc
Clathrin	IP, co-Loc
Claudin 5	IP, co-Loc
CIP85	IP, co-Loc
Consortin	IP, co-Loc
Cortactin	IP, co-Loc
Cyclin E	IP, PLA, TEM
Desmocollin-2a	PD
Dlg	co-Loc
Dynamin	IP, co-Loc
EB1	IP
Eps15	IP, co-Loc
ERp29	IP, co-Loc
Hrs	co-Loc
HSP70	IP, PD
HSP90	IP, co-Loc
Light chain 3	IP, co-Loc
Lin-7	PD
Myosin-VI	co-Loc
DMPK	IP, co-Loc
$Na_v1.5$	co-Loc
N-cadherin	co-Loc
NOV/CCN3	IP, PD
Occludin	IP, co-Loc
$p120^{ctn}$	co-Loc
P2X7	IP, co-Loc
PAK1	IP, PD
P62	IP
Plakophilin-2	co-Loc
PP1/PP2A	IP, co-Loc
RPTPμ	IP
Smurf2	IP, co-Loc
STAMBP (AMSH)	IP, co-Loc
TOM20	IP, co-Loc
TRIM21	IP, co-Loc
USP8	IP
Vinculin	IP, co-Loc
Wwp1	IP
ZO-2	IP, co-Loc, PD, FW

Figure 18 : Interactions protéiques de la CT de la Cx43

A) Exemples d'interactions directes avec des protéines du cytosquelette (bleu), des kinases (rouge), des enzymes (gris), et autres (jaune). **B)** Liste de protéines pouvant interagir avec la Cx43, ainsi que les techniques employées pour leur mise en évidence (IP : immunoprécipitation ; co-loc : co-localization ; TEM : Microscope électronique à transmission ; PLA : *Proximity Ligation Assay*, W : Western blot). Issue de la thèse de Jonathan Boucher (2018), adaptée de Sorgen *et al,* 2018.

La Cx43 peut également interagir indirectement avec d'autres protéines, notamment ZO-1 (Zonula Occludens-1). ZO-1 appartient à la famille des MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinases*) et est connue pour son rôle dans le maintien des jonctions serrées (*tight junctions*) (Stevenson *et al.*, 1986). Le domaine PDZ2 de ZO-1 se lie à l'extrémité C-terminale de la Cx43 (acides aminés 364 à 382), contribuant au maintien et à l'intégrité des jonctions GAP (Giepmans and Moolenaar, 1998; Toyofuku *et al.*, 1998). ZO-1 participe également à l'endocytose de la Cx43 (Segretain *et al.*, 2004), et peut faciliter sa régulation via l'interaction de PLCβ3 avec le PDZ3 de ZO-1 (van Zeijl *et al.*, 2007). Enfin, l'interaction de la Cx43 avec ZO-1 ou ZO-2 semble dépendre du stade du cycle cellulaire : elle se produit avec ZO-1 lorsque les cellules sont quiescentes, et avec ZO-2 au cours de la progression du cycle (Singh *et al.*, 2005).

En lien avec la régulation du cycle cellulaire, Cx43 interagit directement avec la cycline E, une protéine clé du contrôle du cycle. Cette interaction dépend de la phosphorylation par les MAPK kinases de quatre sérines au niveau du domaine CT. En réponse au facteur de croissance PDGF, la Cx43 phosphorylée recrute la cycline E à la membrane plasmique, ce qui mène à l'internalisation du complexe ainsi qu'à la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Johnstone, Kroncke, *et al.*, 2012).

Par ses acides aminés en position 264-314, Cx43 peut également lier la beta-caténine, une protéine jouant un rôle dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'homéostasie tissulaire (MacDonald, Tamai and He, 2009). Cette interaction directe entre Cx43 et la beta-caténine est dépendante des résidus K259-T275, S282-N295 et N302-R319 (Spagnol *et al.*, 2018). Cette interaction est régulée négativement par la phosphorylation de Cx43 sur les résidus Y265 et Y313 par la kinase Src, soulignant un contrôle post-traductionnel crucial sur cette association protéique. Par ailleurs, il a été démontré que la suppression de Cx43 active la voie β-caténine, favorisant la neurogenèse neuronale au détriment de la différenciation gliale, indépendamment de la fonction des jonctions GAP classiques (Rinaldi *et al.*, 2014).

D'autres protéines comme c-Src peut interagir avec la Cx43 en la phosphorylant sur la tyrosine en position 247 et 265 réduisant alors le nombre de jonctions communicantes et favorise la dégradation de la Cx43, notamment en situation d'hypoxie (Lau, 2005).

Il a également été démontré que le domaine CT de Cx43 peut interagir directement avec à la protéine chaperonne Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*) qui joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire en contrôlant notamment la formation du complexe cycline D1–CDK4–p27, modulant ainsi la transition G1/S du cycle cellulaire. Cette interaction entre le domaine CT et Hsc70 entre en compétition avec l'association de la cycline D1 et de l'inhibiteur CDK p27 à hsc70. Cette compétition limite alors leur localisation nucléaire en empêchant la translocation du complexe cycline D1/CDK4/p27, ce qui empêche la transition G1/S du cycle cellulaire et ralentit la prolifération (Hatakeyama *et al.*, 2013; Hino *et al.*, 2015).

La partie CT peut notamment jouer un rôle, indépendant de sa fonction canalaire, au niveau de l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques, où il a été montré que la région composée des acides aminés 242-382 est indispensable pour la liaison de la Cx43 à Bax et induire l'apoptose des cellules, par la voie intrinsèque (voie dépendante des mitochondries, avec la libération du cytochrome-C) (Sun *et al.*, 2012).

Le domaine C-terminal de la Connexine 43 a récemment émergé comme une cible thérapeutique prometteuse pour le développement de peptides mimétiques visant à moduler la fonction des connexines dans diverses pathologies, notamment les cancers. Le premier peptide identifié dans ce contexte, dénommé *α-Connexin Carboxy-Terminus 1* (αCT1), est un peptide de 25 acides aminés reproduisant les neuf derniers résidus du domaine C-terminal de la Cx43, lesquels renferment le motif de liaison PDZ impliqué dans l'interaction avec la zonula occludens-1 (ZO-1). Ce peptide comporte également une séquence d'internalisation facilitant sa pénétration dans les cellules. Le peptide αCT1 a montré des effets antitumoraux sur des cellules de glioblastome, de mélanome et de cancer du sein, en potentialisant la chimio-sensibilité et en inhibant la prolifération tumorale (Grek *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2021; Pridham *et al.*, 2022; da Fonseca *et al.*, 2024).

6. Connexine 43 et cancer de la prostate

Il y a près de 60 ans, les Drs W. R. Loewenstein et Y. Kanno publiaient une étude pionnière démontrant, pour la première fois, l'implication des protéines responsables de la communication intercellulaire dans le contrôle de la croissance cellulaire et le développement tumoral (Loewenstein and Kanno, 1966). Cette hypothèse s'appuyait sur des résultats électrophysiologiques montrant une perte de communication jonctionnelle entre cellules cancéreuses, comparativement aux cellules normales. Cette découverte a ouvert la voie à de nombreuses études sur le rôle des connexines, en particulier la connexine 43, dans la tumorigenèse et lors des différentes étapes de la cascade métastatique, y compris dans le cancer de la prostate (Czyż, Szpak and Madeja, 2012; Boucher, 2018). Ainsi, pour la première fois en 1996, Tsai et collaborateurs ont montré, à partir de tissus de patients, une diminution de l'expression de Cx43 dans les tumeurs prostatiques de haut grade, apportant ainsi une preuve supplémentaire en faveur de la théorie de la perte de communication intercellulaire et de l'homéostasie tissulaire au cours du développement tumoral (Tsai *et al.*, 1996). En 2007, il a été observé, *in vivo* à partir de tissus cancéreux humains et *in vitro* dans la lignée cancéreuse prostatique PC-3, non seulement une diminution d'expression de la Cx43 mais également une altération de sa localisation. Celle-ci se retrouve majoritairement au niveau du cytoplasme, avec pour conséquence une diminution de la communication intercellulaire (Xing *et al.*, 2007). La même année, il a été montré que la surexpression de Cx43 dans la lignée cancéreuse prostatique LNCaP augmentait la sensibilité à l'apoptose induite par le TNF-α, contrairement à la lignée PC-3 où aucun effet n'a été observé (Wang, Berthoud and Beyer, 2007). Ces résultats suggèrent que le gène codant pour la connexine 43 (GJA1) pourrait agir comme un gène suppresseur de tumeur. Des études cliniques ultérieures ont confirmé que la diminution de l'expression de la Cx43 dans les tissus prostatiques malins est associée à une agressivité accrue, corrélée à des scores de Gleason élevés et à un pronostic défavorable (Benko *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016).

En 2012, au laboratoire, Lamiche et collaborateurs ont étudié l'impact de la surexpression de Cx43 sur le comportement métastatique osseux des cellules cancéreuses prostatiques, en utilisant les deux lignées précédemment mentionnées représentant des stades distincts de la progression tumoral, LNCaP et PC-3. Dans les cellules LNCaP, la surexpression de la Cx43 conduit à une localisation à la membrane plasmique de la protéine, corrélée à une augmentation des capacités invasives et d'adhérence ainsi qu'à une incidence élevée de métastases ostéolytiques dans un modèle murin de xénogreffe intratibiale. A l'inverse, dans les

cellules PC-3, la Cx43 surexprimée reste localisée au niveau du cytoplasme, comme précédemment observé (Xing 2007). Dans ces cellules, la surexpression a eu pour conséquence *in vitro* une réduction de la prolifération, de l'adhésion et de l'invasion cellulaire et in vivo, aucune incidence sur la formation de tumeur ostéolytique. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de la localisation de la Cx43 dans le cadre du développement de la métastase osseuse (Lamiche *et al.*, 2012), et nuancent l'hypothèse selon laquelle la Cx43 aurait un rôle exclusivement suppresseur mais aurait un impact différent selon le stade de progression du cancer. En accord avec cette observation, une étude a démontré, dans différentes lignées cancéreuses prostatiques, une corrélation positive entre le niveau d'expression de Cx43 et le degré d'agressivité des cellules étudiées. Ainsi les cellules LNCaP (issues d'une métastase ganglionnaire) et C4-2 (dérivées de cellules LNCaP) présentant un faible potentiel métastatique, exprimaient des niveaux très faibles de Cx43, contrairement aux lignées DU-145 (métastase cérébrale) et PC-3 (métastase osseuse), respectivement de potentiel intermédiaire et élevé, qui montraient une augmentation des taux d'ARNm et protéiques de Cx43. L'inhibition de Cx43 par shRNA dans les cellules PC-3 a eu pour effet de diminuer leurs capacités migratoire et invasives Enfin, cette surexpression de Cx43 s'accompagnait d'une augmentation de N-cadherine et d'une diminution d'E-cadherine, suggérant son implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la progression métastatique du cancer de la prostate (Zhang *et al.*, 2015). Plus récemment, en 2020, les travaux de Jonathan Boucher, menés au laboratoire ont démontré que la Cx43 module la réponse des cellules tumorales prostatiques au microenvironnement osseux, en augmentant significativement leur capacité migratoire, mais uniquement lorsque Cx43 est localisée à la membrane plasmique. De plus, cet effet est dépendant de son extrémité carboxyle qui, dans ce contexte, pourrait être nécessaire à l'interaction avec la cortactine, impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine, et finalement à la formation de lamellipodes (Boucher *et al.*, 2020).

7. Conclusion « Connexine 43 et cancer »

Au cours des cinquante dernières années, de nombreuses données expérimentales ont mis en évidence que les connexines et la communication intercellulaire via les jonctions GAP jouent un rôle essentiel dans l'apparition et le développement des processus cancéreux.

Comme observé dans d'autres types de tumeurs solides, les connexines, dont la Cx43 présentent un rôle ambivalent, elles agissent comme suppresseurs tumoraux aux stades précoces, et

adoptent ensuite un profil pro-tumoral au cours des étapes d'invasion et de dissémination vers les sites secondaires. Dans le cancer de la prostate, la Cx43 semble confère aux cellules tumorales une affinité particulière pour le microenvironnement osseux, facilitant ainsi leur migration, leur adhérence et donc leur implantation au sein du tissu osseux, principal site des métastases secondaires. Cette capacité repose notamment sur la longueur de sa partie C-terminale, qui lui confère une grande polyvalence d'interactions protéiques et la possibilité de remplir des fonctions indépendantes de sa participation aux jonctions GAP.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont rapporté, à l'aide d'analyses par Western blot, la présence de formes tronquées de la Cx43 dans la partie N-terminale. Six isoformes distinctes ont ainsi été décrites et font actuellement l'objet d'études visant à déterminer leurs potentiels rôles dans des contextes physiologiques et pathologiques.

Au cours de la dernière décennie, certaines fonctions ont pu être attribuées à son isoforme majeure, GJA1-20k, dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles, ainsi que les rôles identifiés, seront présentés dans le chapitre suivant.

III. GJA1-20k, isoforme majoritaire de la Connexine 43

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue intitulée « *GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression* », publiée en janvier 2025 dans le journal *Cancers* et présentée à la fin de l'introduction. Cette revue synthétise les connaissances actuelles sur GJA1-20k, ses fonctions biologiques ainsi que son rôle potentiel dans le développement tumoral.

1. Un ARNm, sept protéines

Le gène *GJA1* est composé de deux exons, dont seul le second contient la séquence codante de la connexine 43 (Fishman *et al.*, 1991). Chez la souris, des événements d'épissage alternatif ont été observés au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm de *GJA1* (Pfeifer *et al.*, 2004). Il a longtemps été considéré que ce gène *GJA1* ne produisait qu'une unique protéine de 43 kDa. Cette vision a été remise en question à partir de la fin des années 1990, notamment par des analyses en Western blot qui révélèrent la présence de plusieurs bandes suggérant l'existence d'isoformes de Cx43 (Yeager and Gilula, 1992). Dans le même temps, des travaux ont mis en lumière l'existence d'un mécanisme de traduction alternative débutant à partir de codons AUG situés en aval du codon d'initiation principal, conférant ainsi un caractère polycistronique à cet ARNm (Smyth and Shaw, 2013).

Ce mécanisme produit ainsi six isoformes plus courtes que la Cx43 totale, tronquées en N-terminal, et nommée en fonction de leur poids moléculaire : GJA1-32k, GJA1-29k, GJA1-26k, GJA1-20k, GJA1-11k et GJA1-7k. Parmi elles, GJA1-20k est l'isoforme la plus abondamment exprimée et la plus étudiée, notamment dans le tissu cardiaque (Figure 19).

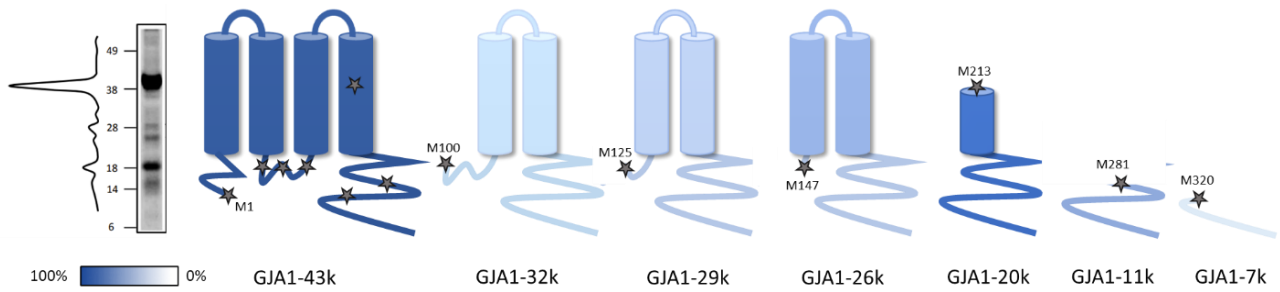


Figure 19 : Isoformes de la Cx43 issues de la traduction alternative

Représentation schématique des six isoformes de la Cx43 produites par traduction alternative à partir de différents codons d'initiation internes (représentés par une étoile). L'intensité du bleu reflète l'abondance relative dans le cœur de chaque isoforme mises en évidence par Western blots à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la Cx43 (Smyth et Shaw,2013) : la Cx43 totale étant la plus exprimée et la GJA1-7k la moins exprimée.

La traduction alternative peut également être initiée à partir de sites d'entrée interne des ribosomes (*IRES, Internal Ribosome Entry Site*) qui sont des structures secondaires retrouvées dans la région 5' UTR de certains ARNm. Ils ont été décrits pour la première fois en 1990, dans l'ARNm codant pour la protéine chaperonne des chaînes lourdes de l'immunoglobuline (BiP). Ces sites permettent le recrutement direct du ribosome au site d'initiation, sans avoir besoin de la coiffe (cap) à l'extrémité 5' de l'ARNm, pour induire une traduction cap-indépendante (Jang *et al.*, 1990). Ce mécanisme est fréquemment retrouvé dans des conditions pour lesquelles la traduction cap-dépendante est bloquée, en particulier en condition de stress comme l'hypoxie (Young *et al.*, 2008). Les caractéristiques des différentes possibilités de traductions sont répertoriées en Table 4. En 1999, un IRES a été identifié dans la région 5' UTR de l'ARNm de *GJA1*(A. Schiavi, Hudder and Werner, 1999). Des IRES ont également étaient identifiés dans les ARNm des connexines 26 et 32, également exprimées dans le tissu prostatique (A. Hudder and Werner, 2000; Lahlou *et al.*, 2005). La présence de ces IRES permettrait d'adapter l'expression des connexines pour assurer la continuité de la communication intercellulaire dans un tissu, comme le cœur, notamment lors d'un stress.

Une revue résume les connaissances actuelles pour le mécanisme de la traduction alternative cap-indépendant pour ces trois connexines, en soutenant l'hypothèse que ce mécanisme serait privilégié dans certaines situations encore à définir (Ul-Hussain, Dermietzel and Zoidl, 2012).

Caractéristiques des différentes traductions	Cap-dépendante classique	Cap-dépendante avec initiation interne	Cap-indépendante (IRES)
Dépendance à la coiffe 5'	Oui	Oui	Non
Site d'initiation	1er AUG (proche 5')	Codons AUG internes	Sites internes (IRES)
Mécanisme principal	Scan ribosomal de 5' vers 3'	Leaky scanning, réinitiation	Recrutement direct du ribosome sur l'IRES
Production d'isoformes	Non	Oui	Oui
Conditions favorables	Conditions normales	Conditions normales ou stress	Stress, hypoxie, infection virale

Table 4 : Résumé des caractéristiques des différentes traductions

La mise en évidence de l'expression d'isoformes telle que GJA1-20k dans les tissus et les cellules, a souvent été fortuite, notamment lors d'analyses par Western blot utilisant des anticorps dirigés contre le domaine C-terminal (CT) de la Cx43 (Yeager and Gilula, 1992; Chatterjee *et al.*, 2005). Ces bandes de poids moléculaire inférieur à celui de la Cx43 étaient souvent interprétées comme des « fragments » sans que leur nature exacte ne soit connue. En 2007, des travaux de caractérisation biochimique utilisant différents tampons contenant notamment des inhibiteurs de protéases, ont démontré que ces fragments n'étaient pas des produits issus d'une dégradation protéolytique, mais bien des isoformes endogènes de la Cx43 (Joshi-Mukherjee *et al.*, 2007).

2. Expression, structure et régulation

La GJA1-20k est traduite à partir du codon d'initiation situé en position 213 (M213) de l'ARNm GJA1, via un mécanisme de traduction alternative. La protéine est composée d'une partie du 4ème domaine transmembranaire et de l'intégralité du domaine C-terminal, soit les aminés 213 à 382. En raison de sa structure tronquée, GJA1-20k est incapable de former des hémicanaux ou des canaux intercellulaires fonctionnels et ne participe donc pas directement à

la communication par jonctions (Smyth and Shaw, 2013). Toutefois, la protéine conserve 87,5 % de la région CT de Cx43, riche en sites de phosphorylation et en domaine d'interaction avec des partenaires cellulaires (tubuline, ZO-1, Src, etc.), ce qui lui confère des fonctions régulatrices importantes étudiées actuellement.

GJA1-20k est exprimée dans de nombreux tissus murins et humains, dans des cellules primaires telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les cardiomyocytes, les neurones ou encore les astrocytes, ainsi que dans des cellules cancéreuses de prostate, de sein, de poumon et de cerveau (Salat-Canela *et al.*, 2014; Boucher *et al.*, 2020; Fournier *et al.*, 2025).

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de GJA1-20k demeurent peu explorées à ce jour (résumées en figure 20). *In vitro*, la stimulation de cellules épithéliales mammaires de souris normales par le TGF-β, induit l'EMT, accompagnée d'une diminution de l'expression de GJA1-20k, dépendante de la voie Smad3 et des kinases Erk1/2 (James *et al.*, 2018; Zeitz *et al.*, 2019). Dans le cœur de souris âgées, une augmentation de l'activité de p38, un des effecteurs en aval de la voie TGF-β non-Smad, a été corrélée à une réduction de l'expression de GJA1-20k. L'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR)) entraîne une augmentation de l'expression de GJA1-20k (Smyth and Shaw, 2013). Cette augmentation a également été observée dans des cellules HeLa transfectées avec la Cx43 et traitées avec de la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR. Dans la même étude, l'inhibition chimique ou la délétion génétique des kinases *Mnk1/2* (*Mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2*), ainsi que l'inhibition de la voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), ont également conduit à une augmentation de l'expression de GJA1-20k, à la fois dans des cellules primaires et tumorales (Salat-Canela *et al.*, 2014).

Parmi les facteurs favorisant l'augmentation de l'expression de GJA1-20k, l'hypoxie semble jouer un rôle très important. Cela a été mis en évidence dans des modèles d'ischémie/reperfusion chez la souris où GJA1-20k est fortement induite dans les cardiomyocytes en réponse au stress. De plus, des taux d'expression de GJA1-20k plus importants ont été retrouvés dans le cœur de patients souffrant de cardiomyopathie (Smyth and Shaw, 2013; Basheer *et al.*, 2018).

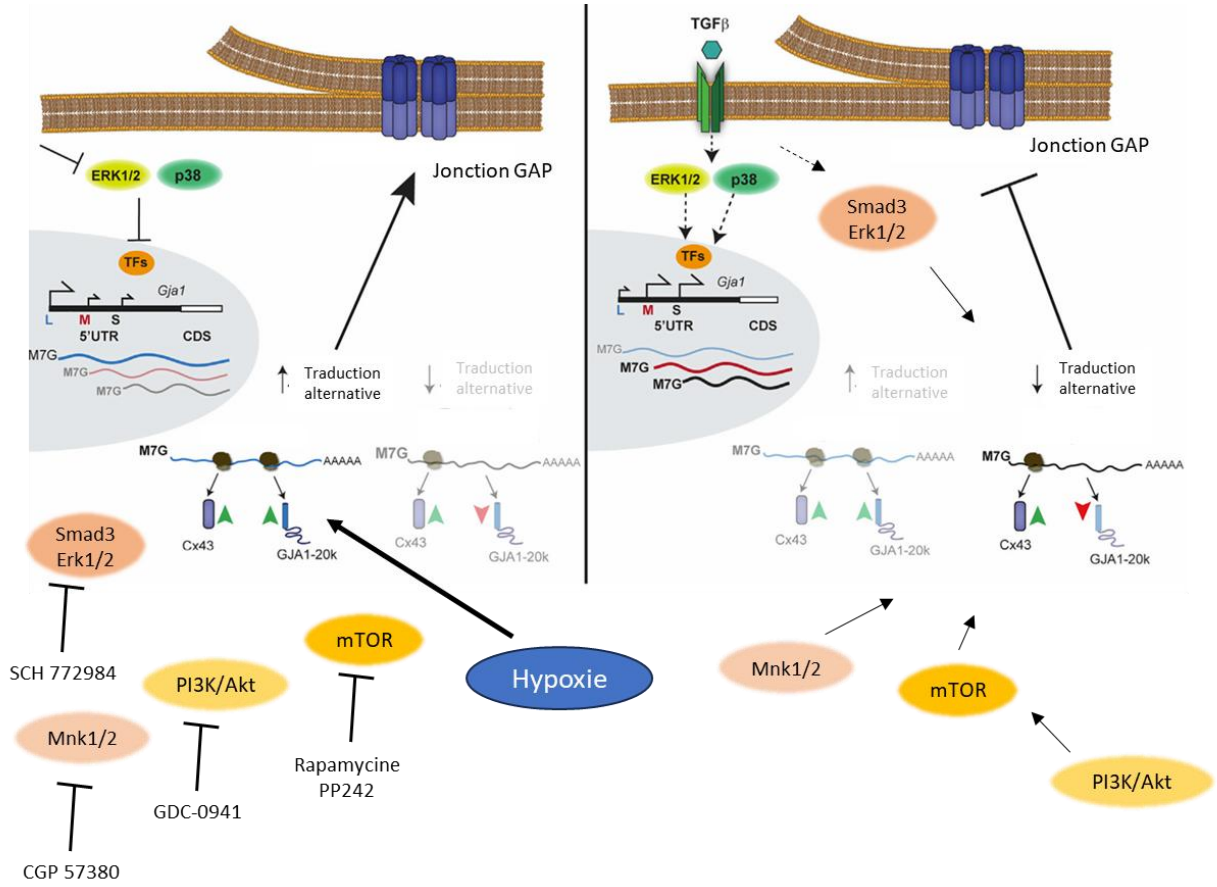


Figure 20 : Principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de GJA1-20k

À droite du schéma, plusieurs voies de signalisation intracellulaire via mTOR, MNK1/2, ERK1/2, PI3K/Akt qui exercent une régulation négative sur l'expression de GJA1-20k. À gauche, leur inhibition (pharmacologique ou génétique) conduit à une augmentation de l'expression de GJA1-20k. Certaines conditions physiopathologiques telles que l'hypoxie induite par un stress d'ischémie/reperfusion, favorisent sa surexpression. Figure adaptée de Zeitz *et al,* 2014 ; Salat-Canela *et al*, 2014 ; James *et al,* 2018, Basheer *et al*, 2018).

3. Rôle dans les pathologies

GJA1-20k joue un rôle essentiel dans la physiologie cardiaque. Les souris transgéniques dépourvues de GJA1-20k meurent précocement, entre 2 et 4 semaines après la naissance, en raison de sévères arythmies (Xiao *et al.*, 2020). *In vitro* et *in vivo*, cette déficience se traduit par une absence de Cx43 totale au niveau des disques intercalaires, ce qui perturbe le couplage électrique entre cardiomyocytes, entrainant les arythmies (Smyth and Shaw, 2013) GJA1-20k, localisée au niveau de l'appareil de Golgi, facilite l'hexamérisation des Cx43 et leur transport vers la membrane plasmique. En présence de TGF-β, l'expression de GJA1-20k est diminuée, ce qui provoque une rétention de Cx43 dans le Golgi (Figure 21).

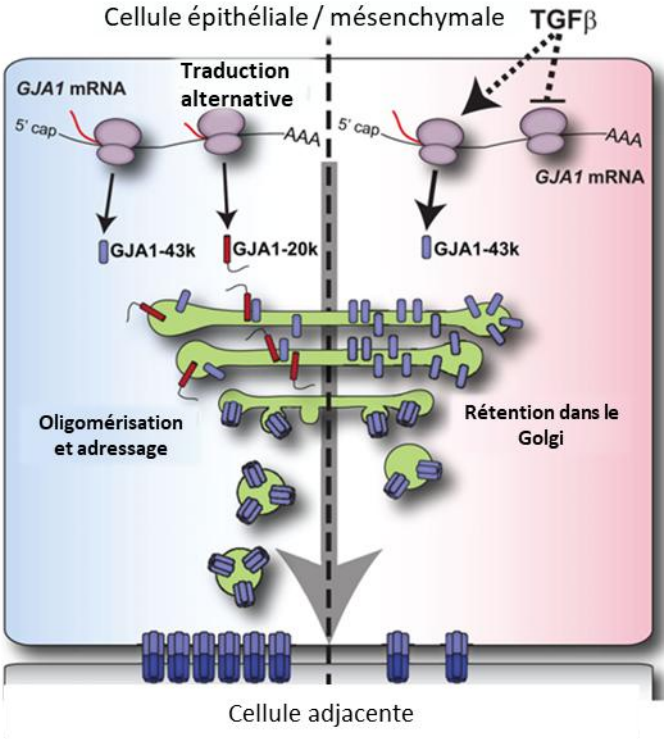


Figure 21 : Altération de la formation des jonctions GAP et de la traduction au cours de l'EMT induite par le TGF-β

Au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), le TGF-β active les voies de signalisation Smad et ERK, entrainant une inhibition de la traduction de GJA1-20k qui s'accompagne d'une diminution du nombre de canaux intercellulaires et donc de la capacité de formation des jonctions communicantes. Figure adaptée de James et al, 2018.

Dans le cœur de rats hypertrophiés (spontanément ou induit par un traitement à l'angiotensine II), on observe une diminution de l'expression de GJA1-20k médiée par la voie Jak2, ainsi qu'une altération de la localisation de Cx43 au niveau des disques intercalaires. La restauration de l'expression de GJA1-20k dans les cardiomyocytes atténue l'hypertrophie, restaure la localisation membranaire de Cx43 et augmente le couplage intercellulaire par jonctions GAP (Fu *et al.*, 2021).

De la même manière, chez des patients ou dans un modèle de souris atteints de cardiomyopathie arythmogène, les niveaux de GJA1-20k sont réduits, associés comme précédemment à une baisse de l'expression de Cx43 au niveau des disques intercalaires et à un défaut de couplage électrique, favorisant les arythmies ventriculaires. Une thérapie génique utilisant des vecteurs viraux (Adenovirus-Associated Virus, AAV) pour restaurer l'expression de GJA1-20k améliore

la formation des jonctions gap et réduit les contractions ventriculaires prématurées (Palatinus *et al.*, 2023).

Au-delà de ses fonctions cardiaques, un autre organe où GJA1-20k a montré des rôles importants est le cerveau. Dans un modèle de lésion cérébrale traumatique chez le rat (Traumatic Brain Injury, TBI), la surexpression spécifique de GJA1-20k dans les astrocytes améliore la viabilité des neurones lésés et leur fonction évaluée grâce à un test de comportement (Ren *et al.*, 2020). Deux autres études ont approfondi ces observations. La première étude suggère que ce rôle protecteur est dû au transfert de mitochondries des astrocytes vers les neurones via des structures spécialisées appelées nanotubes (*Tunneling nanotubes*, TNT) (Ren *et al.*, 2022). Ce type de transfert a également été observé des cellules stromales mésenchymateuses (cellules multipotentes) vers les chondrocytes (Irwin *et al.*, 2024). Ce transfert mitochondrial, augmenté par GJA1-20k dépend également de la Cx43 connue pour réguler la formation de ces TNTs dans d'autres modèles (Li, 2019; Tishchenko *et al.*, 2020). La deuxième étude démontre que des exosomes, dérivés de ces astrocytes surexprimant GJA1-20k, contiennent de la GJA1-20k et que leur réinjection dans des rats TBI améliore leur fonction cognitive. In vitro, ces exosomes enrichis en GJA1-20k réduisent l'apoptose des neurones et augmente la fonction mitochondriale (Feng *et al.*, 2023).

4. Rôle dans la dynamique du cytosquelette

GJA1-20k contenant l'intégralité du domaine CT de Cx43, elle conserve tous les sites de liaison et d'interaction décrits pour la forme totale, notamment ceux impliqués dans la liaison aux microtubules et à l'actine. Cette isoforme peut donc participer activement à la dynamique du cytosquelette. Par immunofluorescence et co-immunoprécipitation, il a été montré que GJA1-20k colocalise avec la tubuline et l'actine (Basheer *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2017). Lorsque les cellules sont traitées avec de la Latrunculine A, cela induit la désorganisation du réseau de microtubules par dépolymérisation de l'actine et par voie de conséquence, diminue la présence de la Cx43 au niveau de la membrane plasmique. La surexpression de GJA1-20k dans les cardiomyocytes restaure le nombre de microtubules orientés vers la membrane, ainsi que la présence de Cx43 aux disques intercalaires. GJA1-20k n'induit cependant pas de modification de la quantité d'actine, elle stabilise le réseau d'actine en favorisant la formation des filaments d'actine (actine-F) (Figure 22).

Ce mécanisme repose sur la liaison directe de GJA1-20k à l'actine via le motif RPEL induisant la formation de points d'actine (« *actin puncta* »). L'augmentation de ces points d'actine contribue à l'orientation des microtubules et facilite le transport des vésicules contenant la Cx43 vers la membrane plasmique (Baum *et al.*, 2025).

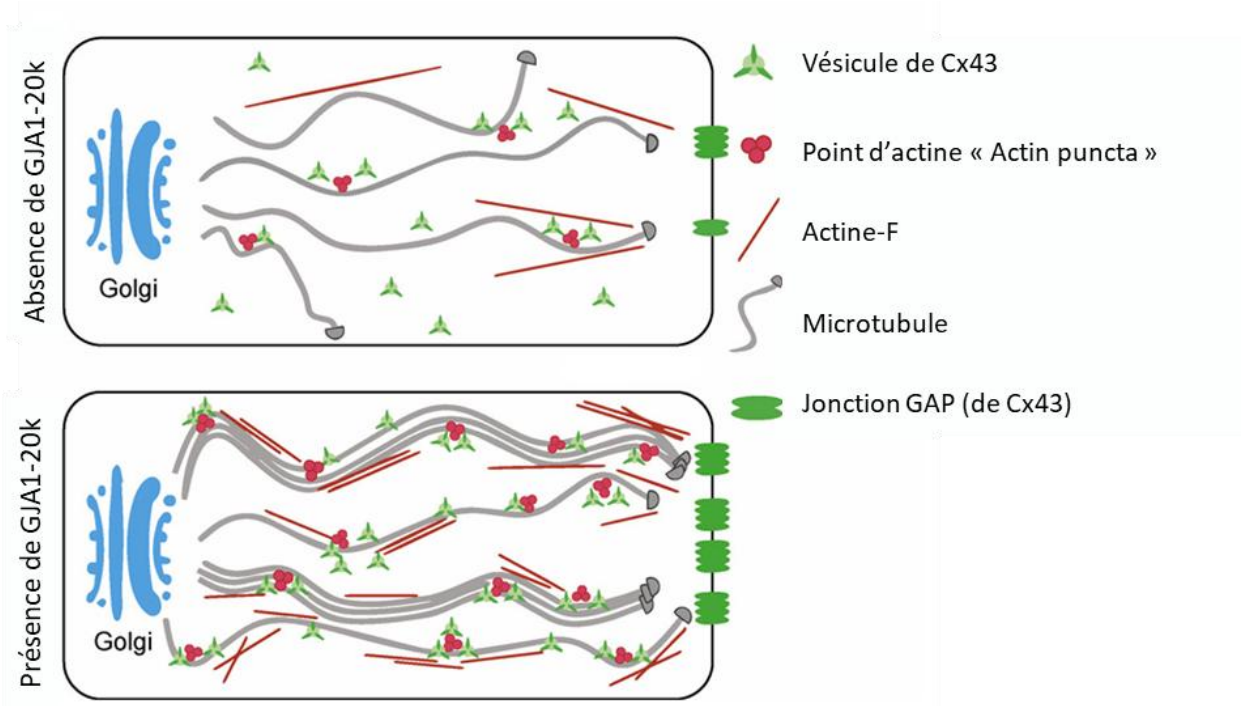


Figure 22 : Rôle de GJA1-20k dans le transport de la Cx43 à la membrane plasmique

Les vésicules contenant la Cx43 sont transportées le long des microtubules jusqu'à la membrane plasmique pour former les jonctions GAP. L'expression de GJA1-20k réorganise le réseau d'actine, caractérisé par une augmentation du nombre de points d'actine « actin puncta » et la stabilisation des fibres d'actine filamenteuse (actine F). Les « actin puncta », qui servent de points d'ancrage pour les vésicules de Cx43, agissent comme points d'arrêt aux microtubules, tandis que les fibres de F-actine orientent ces microtubules vers la périphérie cellulaire. GJA1-20k joue un rôle direct d'« actin-capping protein » pour former ces structures d'actine qui vont par la suite orienter les microtubules. Cela va augmenter le transport de Cx43 et, par conséquent, la quantité de canaux jonctionnels à la membrane plasmique. Figure adaptée de Baum et al, 2025.

5. Rôle dans la dynamique mitochondriale

L'observation de la localisation de la GJA1-20k, montre sa présence au niveau du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi, ainsi que sur la membrane externe mitochondriale (Fu *et al.*, 2017, 2021; Basheer *et al.*, 2018). Cette dernière localisation diffère de celle de la Cx43 totale, qui se trouve principalement dans la membrane interne mitochondriale (Boengler *et al.*, 2022).

La morphologie et la distribution des mitochondries sont des paramètres essentiels dans de nombreux processus biologiques, tels que le maintien de la forme et de la polarité cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la morphogenèse des tissus et l'embryogenèse (Madan *et al.*, 2022). Lors de la migration cellulaire, notamment dans le contexte tumoral, les mitochondries se redistribuent vers le front de migration, fournissant ainsi localement l'énergie nécessaire au réarrangement du cytosquelette et, par conséquent, à l'invasion cellulaire (Caino *et al.*, 2016).

Dans ce contexte de dynamique mitochondriale, GJA1-20k agit comme une protéine chaperonne, facilitant la distribution des mitochondries vers la périphérie cellulaire via un mécanisme dépendant des microtubules (Figure 23A) (Ren *et al.*, 2022). Par ailleurs, GJA1-20k pourrait s'associer à des protéines de la membrane mitochondriale, de manière similaire à la Cx43, qui interagit avec plusieurs partenaires mitochondriaux tels que TOM20 *(Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane 20)*, puisque par imagerie, GJA1-20k a été retrouvé dans la membrane mitochondriale externe (Basheer *et al.*, 2018).

Globalement GJA1-20k exerce un rôle protecteur dans diverses conditions de stress cellulaire, notamment lors d'épisodes d'ischémie/reperfusion. Dans des cellules HeLa surexprimant GJA1-20k, le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est atténué grâce au maintien de la distribution du réseau mitochondrial vers la périphérie cellulaire (Fu *et al.*, 2017). Dans le cœur de souris, l'administration systémique de GJA1-20k via un vecteur AAV9 favorise la biogenèse mitochondriale, tout en réduisant le potentiel de membrane mitochondrial, la respiration et la production de ROS, contribuant ainsi à préserver la fonction cardiaque (Basheer *et al.*, 2018). En revanche, dans un modèle d'hypertrophie cardiaque chez le rat, la surexpression *in vitro* de GJA1-20k dans les cardiomyocytes restaure le potentiel mitochondrial (donc augmente le métabolisme énergétique et la capacité respiratoire), tout en réduisant la

production de ROS (Fu *et al.*, 2021). Dans ces deux cas de pathologies cardiaques, la GJA1-20k exerce un effet cardioprotecteur que ce soit en induisant un ralentissement métabolique ou en restaurant la fonction mitochondriale.

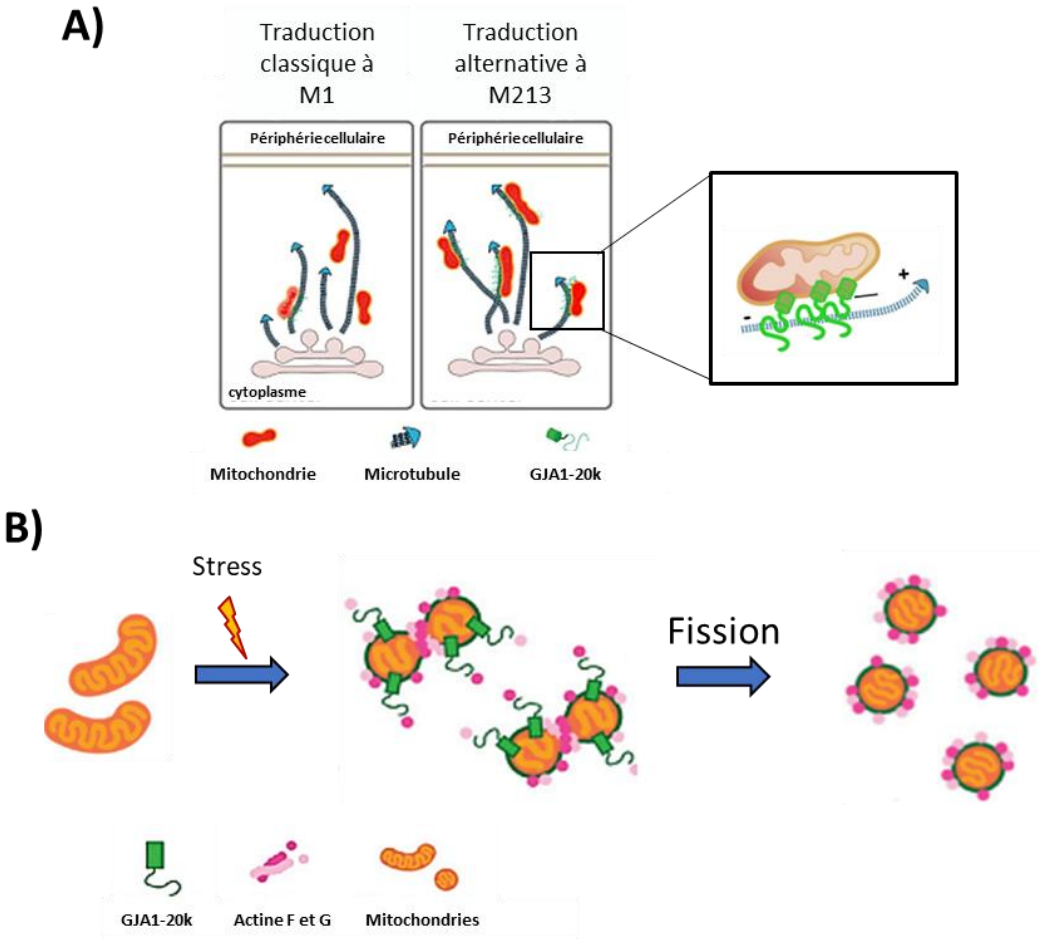


Figure 23 : Effet de la GJA1-20k sur la dynamique mitochondriale

A) La traduction alternative initiée à partir de la méthionine 213 (M213) conduit à l'expression de GJA1-20k favorisant un réarrangement via le cytosquelette du réseau mitochondrial vers la périphérie cellulaire. Ce repositionnement contribue à un effet protecteur lorsque la cellule est exposée à un stress oxydatif ou hypoxique. **B)** En situation de stress, la surexpression de GJA1-20k induit une fission mitochondriale qui va participer à la protection de la fonction cellulaire. Figure adaptée de Fu et al, 2018 ; Shimura et Shaw, 2022.

Ce rôle protecteur de GJA1-20k ne se limite pas au tissu cardiaque, mais s'étend également au système nerveux central. En effet, dans un modèle de lésion cérébrale, il a été montré que l'expression de GJA1-20k était fortement induite dans les astrocytes en réponse au stress cellulaire (Ren *et al.*, 2020). Elle participe à la protection des cellules gliales contre l'apoptose en favorisant la biogenèse mitochondriale et en restaurant le potentiel mitochondrial, contribuant ainsi au maintien du métabolisme énergétique cellulaire.

GJA1-20k peut réguler directement la morphologie et l'activité mitochondriale. Elle est en effet capable d'induire une fission mitochondriale, indépendamment de la voie canonique médiée par DRP1 (*Dynamin-Related Protein 1*) et MNF1/2 (*Mitofusin* 1/2), par recrutement de l'actine autour des mitochondries créant alors un site de constriction qui va séparer en deux la mitochondrie. Cette fission induite par GJA1-20k réduit la production de ROS et protège les cellules contre les dommages liés au stress oxydatif (Shimura *et al.*, 2021) (Figure 23B).

6. Conclusion du chapitre – la revue : "GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression"

cells

MDPI

Review

GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression

Sarah Fournier [1], Jonathan Clarhaut [2,3], Laurent Cronier [1,*,†] and Arnaud Monvoisin [1,*,†]

[1] Laboratory Channels and Connexins in Cancer and Cell Stemness (4CS), UR 22751, University of Poitiers,
1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France;
sarah.fournier@univ-poitiers.fr
[2] Pharmacology of Antimicrobial Agents and Antibioresistance (PHAR2), INSERM U1070, University of Poitiers; 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France; jonathan.clarhaut@univ-poitiers.fr
[3] University Hospital Center of Poitiers, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France
* Correspondence: laurent.cronier@univ-poitiers.fr (L.C.); arnaud.monvoisin@univ-poitiers.fr (A.M.);
Tel.: +33-5-49-45-37-52 (L.C.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The Connexin43 transmembrane protein (Cx43), encoded by the *GJA1* gene, is a member of a multigenic family of proteins that oligomerize to form hemichannels and intercellular channels, allowing gap junctional intercellular communication between adjacent cells or communication between the intracellular and extracellular compartments. Cx43 has long been shown to play a significant but complex role in cancer development, acting as a tumor suppressor and/or tumor promoter. The effects of Cx43 are associated with both channel-dependent and -independent functionalities and differ depending on the expression level, subcellular location and the considered stage of cancer progression. Recently, six isoforms of Cx43 have been described and one of them, called GJA1-20k, has also been found to be expressed in cancer cells. This isoform is generated by alternative translation and corresponds to the end part of the fourth transmembrane domain and the entire carboxyl-terminal (CT) domain. Initial studies in the cardiac model implicated GJA1-20k in the trafficking of full-length Cx43 to the plasma membrane, in cytoskeletal dynamics and in mitochondrial fission and subcellular distribution. As these processes are associated with cancer progression, a potential link between Cx43 functions, mitochondrial activity and GJA1-20k expression can be postulated in this context. This review synthetizes the current knowledge on GJA1-20k and its potential involvement in processes related to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and the proliferation, dissemination and quiescence of cancer cells. Particular emphasis is placed on the putative roles of GJA1-20k in full-length Cx43 exportation to the plasma membrane, mitochondrial activity and functions originally attributed to the CT domain.

Keywords: GJA1-20k; Cx43; trafficking; mitochondria; cancer progression; alternative translation

Academic Editor: Antonio Rodríguez-Sinovas

Received: 26 November 2024
Revised: 20 January 2025
Accepted: 22 January 2025
Published: date

Citation: Fournier, S.; Clarhaut, J.; Cronier, L.; Monvoisin, A. GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression. *Cells* **2025**, *14*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Connexin43 (Cx43)

1.1. Generalities

Connexin43 (Cx43) belongs to a family of proteins composed of 21 members within the human genome. Among them, Cx43 is the most abundant and ubiquitously expressed (Beyer, Paul and Goodenough, 1987). All connexins share a common protein structure with four transmembrane domains and two extracellular and one intracellular loop, with the N- and C-terminal parts on the intracellular side (Evans and Martin, 2002) (Figure 1). The N-terminal part is the most conserved among the connexins, while the C-terminal part is the most variable. A connexin is a gap junction protein that forms cell–cell channels, allowing the passage of ions and other small signaling molecules between coupled cells (Söhl and Willecke, 2003). Six connexin monomers oligomerize to form a transmembrane channel named a connexon or hemichannel. Two connexons of adjacent cells dock together to create an intercellular channel, and clusters of these channels constitute a GAP junction (Unwin and Zampighi, 1980). Surprisingly for a multimeric transmembrane protein, the half-life of Cx43 is relatively short, between 1 and 3 h (Laird, Puranam and Revel, 1991). Connexin-forming channels are permeable to a wide variety of molecules with a molecular weight up to 1.2 kDa (Giaume *et al.*, 2013), allowing the bidirectional passage of ions (Na^+, Cl^-, K^+), metabolites (glucose), secondary messengers and signaling molecules (IP_3, calcium, AMPc, ATP and glutamate) (Sáez *et al.*, 1989; Goldberg, Moreno and Lampe, 2002; Alexander and Goldberg, 2003; Goldberg, Valiunas and Brink, 2004) and also miRNA, including in a heterocellular context (Thuringer, Boucher, *et al.*, 2016; Thuringer, Jego, *et al.*, 2016). Opened hemichannels are involved in exchanges with the extracellular medium, whereas junctional channels permit direct exchanges between the cytoplasm of contiguous cells. Alterations in connexin levels or mutations can lead to various diseases, such as cancers (Oyamada *et al.*, 1990; Yamasaki *et al.*, 1995), cardiac pathologies (Severs, 2001; Saffitz, Hames and Kanno, 2007) and diseases linked to development, i.e., oculodentodigital dysplasia, hearing loss and X-Linked Charcot–Marie–Tooth Disease (CMTX) (Bergoffen *et al.*, 1993; Kelsell *et al.*, 1997; Merrifield and Laird, 2016). In addition to canonical functions in cell-to-cell communication and hemichannel activity, Cx43 may have intracellular and extracellular actions by channel-independent mechanisms (Lucaciu *et al.*, 2023) linked to the presence of Cx43 in mitochondrial membranes (Boengler *et al.*, 2022) or in extracellular vesicles (Soares *et al.*, 2015).

Connexin genes share a common structure, with at least two exons separated by one or more introns of different sizes (Willecke *et al.*, 2002). As is the case with the majority of connexins, the Cx43 gene (*GJA1*) is constituted of two exons. The first exon encodes the 5′ untranslated region (UTR), while the second exon encodes 16 base pairs of the 5′ UTR, the entire coding sequence and the 3′ UTR. The 5′ UTR contains an internal ribosome entry site (IRES), which has the potential to facilitate cap-independent translation (Adam Schiavi, Hudder and Werner, 1999). This regulatory mechanism has also been found to control the expression of Cx26 and Cx32 (Alice Hudder and Werner, 2000; Lahlou *et al.*, 2005).

GJA1 mRNA may undergo an alternative translation initiation at in-frame AUG codons to generate six shorter isoforms of Cx43 (Smyth and Shaw, 2013) (Figure 1). These N-terminal truncated proteins are named based on their molecular weight: GJA1-32k, GJA1-29k, GJA1-26k, GJA1-20k, GJA1-11k and GJA1-7k. GJA1-20k, the focus of this review, is synthesized from a methionine at position 213 (M213) and is usually the most abundant isoform found in cells and tissues and consequently the most studied. To date, only one study has examined the function of the other isoforms. When individually transfected into HEK293FT cells, the results showed that GJA1-11k translocated to the nucleus, blocked cell cycle progression and consequently inhibited cell growth (Epifantseva *et al.*, 2020), while the other isoforms had no significant effects.

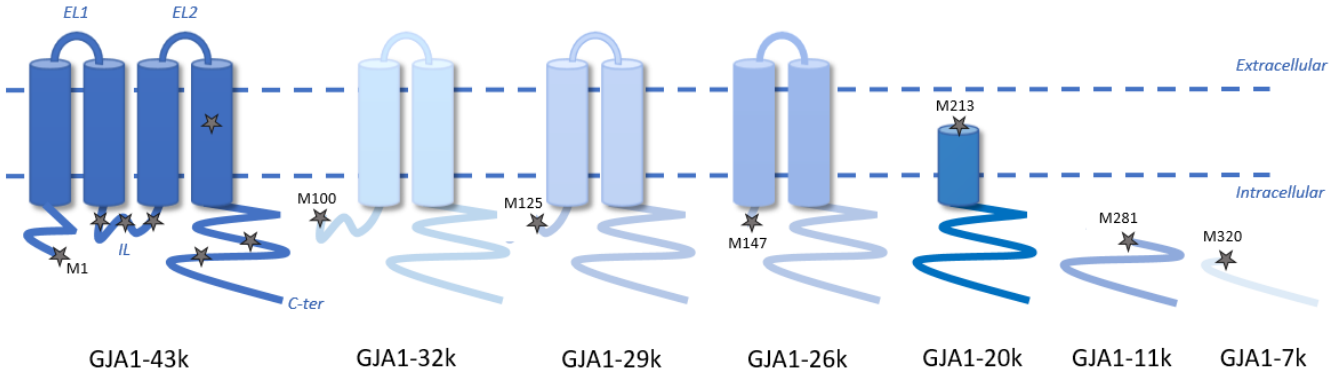


Figure 1. Topology of Connexin43 and of its multiple endogenous isoforms.

Above is a schematic representation of the protein structures of full-length Cx43 (GJA1-43k) and its six different endogenous alternatively translated isoforms (GJA1-32k, GJA1-29k, GJA1-26k, GJA1-20k, GJA1-11k and GJA1-7k). Stars mark the Methionine locations for the alternative translations corresponding to AUG start sites of the different N-terminal truncated Cx43 isoforms, *EL1* and *EL2*, the extracellular loops, *IL*, the intracellular loop and *C-ter*, the carboxyl-terminus.

1.2. Cx43 Carboxyl-Terminal Domain Functions

The Cx43 carboxyl-terminal domain (Cx43 CT), which accounts for approximately 40% of the protein from residues 232 to 382, presents a large complexity in terms of interaction and regulation capacities (for review, (Leithe, Mesnil and Aasen, 2018)). Thus, this domain includes multiple phosphorylation sites (serine, threonine and tyrosine) and can regulate Cx43 cellular traffic, gap junction assembly, degradation and channel gating (Laird, 2005; Johnstone, Billaud, *et al.*, 2012; Pogoda *et al.*, 2016). Additionally, acetylation, nitrosylation and SUMOylation processes are described to expand the control opportunities of Cx43 turnover, distribution or activity. Cx43 also presents a vast interactome with the CT, displaying numerous protein binding sites that interact with various partners (tubulin, Src, ZO-1 and CCN3/NOV) (Lin *et al.*, 2001; Leithe, Mesnil and Aasen, 2018). These protein–protein complexes enable direct interactions with microtubules

or indirect interactions with the actin-based cytoskeleton, as well as modulation of a wide range of transduction pathways and channel functionalities (Butkevich *et al.*, 2004; Fanning and Anderson, 2009; Batra, Kar and Jiang, 2012; Hervé *et al.*, 2012; Ambrosi *et al.*, 2016; Leithe, Mesnil and Aasen, 2018; Rodríguez-Sinovas *et al.*, 2021). Therefore, through both channel-dependent and -independent mechanisms, Cx43 impacts cellular processes related to tumor progression, such as cell growth, apoptosis and migration. This aspect will be further explored in Section 3.2.3.

2. GJA1-20k Isoform

2.1. Expression and Regulation of GJA1-20k

GJA1-20k, spanning from amino acid 213 to the final amino acid 382, comprises part of the fourth transmembrane domain and the entire carboxyl-terminal domain of Cx43, so it cannot form a hemichannel but retains all the characteristics of the Cx43 CT domain. As a result, GJA1-20k can be unexpectedly observed when Cx43 expression is studied by Western blotting with antibodies directed against the Cx43 CT domain. The first description of a specific band at 20 kDa was reported in zebrafish heart (Chatterjee *et al.*, 2005). In 2007, it was shown that this fragment is not a degradation product of the full-length Cx43 but rather a natural by-product of Cx43 (Joshi-Mukherjee *et al.*, 2007). Finally, in 2013, Smyth and Shaw demonstrated that internal translation of *GJA1* mRNA is responsible for the production of the different Cx43 isoforms, including GJA1-20k (Smyth and Shaw, 2013).

In vitro, GJA1-20k is expressed in several primary cells (endothelial, fibroblasts, keratinocytes, cardiomyocytes, neurons, astrocytes, etc.) as well as in cancer cell lines derived from different types of tumors (breast, lung, brain and prostate). In vivo, GJA1-20k has been identified in multiple tissues, including the heart and the brain, where the majority of studies have been conducted to elucidate its functions. Mice specifically deficient in GJA1-20k, generated by mutating the methionine 213 corresponding to the initiation codon to a leucine, exhibited sudden cardiac death shortly after birth (Xiao *et al.*, 2020). An exhaustive list of the expression profile and associated functions of GJA1-20k, as described, is summarized in Table 1.

Table 1. Expression profile and related functions of GJA1-20k.

Tissue Type	Model	Expression and/or Functions	Ref.
Rat kidney Murine oral epithelium Brain endothelium	NRK cell line AT84 cell line bEnd3 cell line	First biochemical identification of a 20 kDa natural by-product resulting from Cx43 processing. This short protein is absent in cells after Cx43-specific RNAi treatment or those derived from Cx43-deficient mice and not prevented by the use of proteases inhibitors.	[41]
Human heart	Cardiomyocytes	GJA1-20k, the predominant form in the heart, acts as a trafficking chaperone for full-length Cx43 and its expression is under mTOR inhibition control.	[27]
Mouse heart	C57BL/6 mice	GJA1-20k stabilizes actin filaments, guides microtubule machinery, increases Cx43 hemichannel transfer to cardiac intercalated discs and permits the maintenance of Cx43-dependent gap junctional coupling after acute ischemia.	[43]
Mouse heart	C57BL/6 mice	GJA1-20k is an endogenous stress response protein upregulated by ischemic or ischemia/reperfusion conditions. GJA1-20k is present in the outer mitochondrial membrane and promotes mitochondrial biogenesis and metabolic quiescence, leading to cardioprotection.	[44]
Mouse heart	Transgenic C57BL/6 mice (GJA^{M213L})	GJA1-20k protects Cx43 from degradation and maintains normal electrophysiological function in the heart.	[42]
Rat heart	SHR and Wistar-Kyoto rats	Level of GJA1-20k regulates gap junction formation and mitochondrial function to attenuate Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy.	[45]
Mouse heart	C57BL/6 mice	GJA1-20k induces focal constriction of mitochondria by actin polymerization, leading to protective mitochondrial fission.	[46]
Human cervix Human skin Human kidney Mouse brain	HeLa cell line HaCaT cell line HEK293T cell line Primary fibroblastic and glial cells	GJA1-20k presents a microtubule-binding domain, mediates mitochondrial transport and maintains mitochondrial network integrity during cellular stress.	[47]
Murine mammary gland	NMuMG cell line	Smad3- and ERK-dependent pathways reduce GJA1-20k expression and gap junction formation. GJA1-20k overexpression is not sufficient to halt epithelio-mesenchymal transition of immortalized cells. GJA1-20k regulates Cx43 oligomerization.	[48]
Rat brain	Neurons and primary astrocytes	Overexpression of GJA1-20K in astrocytes promotes viability and recovery of neurons after brain injury.	[49]

Rat brain	Primary fetal neurons and astrocytes	GJA1-20k uptake, via astrocytic exosomes by damaged neurons, attenuates traumatic brain injury in a rat model.	[50]
Mouse brain	CCM3+/− mouse brain and endothelial cells	GJA1-20k, through interaction with ZO-1, contributes to increased permeability of the blood–brain barrier in cerebral cavernous malformation by promoting structural changes in endothelial cell junctions that favor gap junction formation over tight junction stability.	[51]
Cancer (cell lines) Human prostate	LNCaP cells	In Cx43-overexpressing LNCaP metastatic cells, GJA1-20k expression increases upon bone-conditioned medium stimulation.	[52]
Human lung	A549 and HOP-62 cells	GJA1-20k is detected in various cancer cell lines. Its expression is regulated by Mnk1/2 pathway.	[53]
Human breast	MDA-MB-231 and BT-549 cells		
Human cervical/endometrial	C33A/Ishikawa cells		
Mouse embryonic carcinoma	NF-1		

Although GJA1-20k has been implicated in several diseases (see Section 2.2) and found expressed in several cell lines, little is known about the molecular signaling pathways controlling its expression. The generation of GJA1-20k results from alternative translation of *GJA1* mRNA (Smyth and Shaw, 2013; Salat-Canela *et al.*, 2014; Ul-Hussain *et al.*, 2014), but the mechanisms regulating this process remain a topic of ongoing discussion. Ul-Hussain et al. first identified a cap-independent process due to the presence of putative IRES activity in the coding region of *GJA1* (Ul-Hussain *et al.*, 2014). Conversely, Salat-Canela et al. demonstrated that the 5′ UTR sequence is necessary for the translation and the generation of GJA1-20k, which occurs via cap-dependent ribosomal scanning or active upstream translation (Salat-Canela *et al.*, 2014). Lately, Zeitz et al. reported the presence of three different *GJA1* 5′UTR isoforms in human cells due to alternative promoter usage arising from unique transcription start sites (TSSs) (Zeitz *et al.*, 2019). Interestingly, they found that the shorter *GJA1* 5′UTRs promote full-length Cx43 translation over alternative translation of GJA1-20k. These observations collectively indicate the necessity for further investigations aimed at a more comprehensive understanding of the underlying mechanisms involved in *GJA1* translation and GJA1-20k synthesis. Such investigations should include an evaluation of other modes of translation initiation, such as cap-independent translation enhancers (CITEs), which require a free mRNA 5′ end to function.

Concerning the signaling pathways regulating GJA1-20k expression, few studies have been reported. In vitro stimulation of normal mouse mammary epithelial cells with TGF-β results in an epithelial–mesenchymal transition (EMT), characterized by a Smad3- and ERK1/2-dependent decrease in GJA1 20k expression (James *et al.*, 2018; Zeitz *et al.*, 2019). In aging mouse hearts, an increased level of active p38, one of the downstream effectors of the TGF-β non-Smad signaling pathway, has been correlated with a decrease in GJA1-20k expression due to the synthesis of *GJA1* 5′UTR variants (Zeitz *et al.*, 2019). In neonatal mouse cardiomyocytes, the inhibition of the Phosphatidylinositol 3-kinase

(PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway increased the expression of GJA1-20k (Smyth and Shaw, 2013). The same result was observed by treating Cx43-overexpressing HeLa with rapamycin, a well-known inhibitor of mTOR (Salat-Canela *et al.*, 2014). In the same study, chemical inhibition or genetic deletion of MAP kinase-interacting serin/threonine-protein kinase ½ (Mnk1/2), as well as inhibition of the EGFR pathway, also led to increased endogenous GJA1-20k expression in both primary and cancer cells.

2.2. GJA1-20k and Physiopathologies

Based on data from numerous in vitro and in vivo studies, GJA1-20k appears to clearly play important roles in various cardiac diseases. Loss of GJA1-20k expression in cardiomyocytes (Smyth and Shaw, 2013; Basheer and Shaw, 2016; Basheer *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2020; Palatinus *et al.*, 2023) disrupted the delivery of Cx43 to the intercalated discs (ICDs), specialized structures that connect adjacent cardiac muscle cells and allow the transmission of cardiac action potentials through gap junctions. Reintroduction of GJA1-20k, or mTOR pathway inhibition known to increase GJA1-20k expression, restored Cx43 localization to the basal membrane (Smyth and Shaw, 2013). Thus, GJA1-20k is responsible for the forward trafficking of cardiac Cx43 to the ICDs, enabling the transmission of cardiac action potentials. Further, transgenic mice specifically lacking GJA1-20k exhibited abnormal electrocardiograms and died at 2 to 4 weeks of age from sudden cardiac death. These abnormalities were correlated with impaired delivery of Cx43 to the ICDs (Xiao *et al.*, 2020).

GJA1-20k has also been characterized as a stress protein, with increased expression levels during ischemia/reperfusion (I/R) injury in both animal models and human patients suffering from ischemic cardiomyopathy (Basheer *et al.*, 2018). Studies have revealed a close association between GJA1-20k and mitochondria, which correlated with reduced mitochondrial activities such as respiratory capacity and reactive oxygen species (ROS) production.

In cardiac hypertrophy (CH), whether observed in a spontaneously hypertensive rat model or induced in vitro by angiotensin II (Ang II) on cardiomyocytes, there is a downregulation of GJA1-20k expression mediated by Jak2 signaling, associated with reduced gap junction presence at the ICDs (Fu *et al.*, 2021). Moreover, overexpression of GJA1-20k in cardiomyocytes alleviated Ang II-induced hypertrophy by restoring Cx43 trafficking back to the cell–cell border. In addition, cardiac hypertrophy is also associated with diminished mitochondrial biogenesis and reduced maximal respiratory capacity. When overexpressed in cardiomyocytes, GJA1-20k restored the mitochondrial membrane potential and reduced ROS production, exerting its cardioprotective effect in CH. In both patients and a mouse model with arrhythmogenic cardiomyopathy, levels of GJA1-20k are reduced in the heart, leading to a decrease in Cx43 expression at the ICDs and contributing to ventricular arrhythmias. Through AAV-based gene therapy, GJA1-20k expression improved gap junction formation and reduced premature ventricular contraction (Palatinus *et al.*, 2023). In the brain, following traumatic brain

injury, elevated expression of GJA1-20k in astrocytes facilitated the recovery and survival of neurons, with its beneficial effects attributed to the regulation of mitochondrial function (Ren *et al.*, 2020). Moreover, increased expression of GJA1-20k in astrocyte-derived exosomes led to the inhibition of cell apoptosis and the stimulation of mitochondrial autophagy in lesioned tissues through an unidentified mechanism (Feng *et al.*, 2023).

2.3. Cellular and Molecular Mechanisms Involved

The previous results highlight the fact that GJA1-20k acts as a stress protein in certain pathological situations, offering protection against heart and brain injuries. This protective role is currently attributed to its involvement in (i) rearranging and stabilizing the cytoskeleton, (ii) Cx43 trafficking to the cell membrane and (iii) regulating mitochondrial distribution and function.

2.3.1. Cytoskeleton Dynamics and Cx43 Trafficking

Earlier analyses of the full-length Cx43 sequence have shown that the Cx43 CT domain contains a microtubule-binding domain (MTBD), which allow interactions with alpha- and beta-tubulin, with residues ^{264}RV^{275} and ^{247}YHAT^{250} being critical for this interaction (Ben N.G. Giepmans *et al.*, 2001; Saidi Brikci-Nigassa *et al.*, 2012). It is likely that GJA1-20k is also capable of interacting with these two subunits and may control the growth and shortening behavior of microtubules. Indeed, GJA1-20k was shown to colocalize in the cytoplasm and to immunoprecipitate with alpha-tubulin (Basheer *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2017). Interestingly, Cx43 is associated with EB1, a marker for rapidly growing microtubule plus ends, which is implicated in gap junction formation through its interaction with dynein/dynactin (Shaw *et al.*, 2007).

GJA1-20k also possesses in its sequence one RPEL motif (RPxxxEL), involved in actin binding, corresponding to the last nine amino acids of the protein, where an Isoleucine substitutes for the final leucine (^{374}RPRPDDLEI^{382}). Modeling and biochemical experiments provided evidence that this RPEL-like domain can theoretically interact with actin. Complexes with GJA1-20k and actin have indeed been found by immunoprecipitation (Basheer *et al.*, 2017). However, despite the deletion of the RPEL motif, truncated GJA1-20k still colocalizes with actin, suggesting the existence of another interaction domain that is yet to be determined. When overexpressed, GJA1-20k does not affect the overall quantity of actin protein but leads to an increase in both the number and length of thickened F-actin filaments within cells and contributes to the stabilization of the actin network (Basheer *et al.*, 2017; Baum *et al.*, 2022). Moreover, high levels of endogenous or exogenous GJA1-20k induce the formation of actin puncta in the cytoplasm. Collectively, these results identify GJA1-20k as an actin capping protein capable of sequestering G-actin in pools and stabilizing filamentous F-actin fibers (Baum *et al.*, 2022). This stabilization contributes to orient microtubules to the cellular junctions, which is a crucial step for proper microtubule-based Cx43 delivery to the membrane. Indeed, as observed during heart and brain

injuries, GJA1-20k contributes to Cx43 delivery to cell–cell borders in vitro and in vivo (Smyth and Shaw, 2013; Basheer *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2020; Palatinus *et al.*, 2023) to protect cells and tissues. Mutating the internal AUG to specifically inhibit GJA1-20k expression in vivo resulted in impaired trafficking of Cx43 to the plasma membrane and increased the degradation of poorly trafficked Cx43, leading to sudden death in transgenic mice (Xiao *et al.*, 2020).

More generally, it will be of interest to address whether GJA1-20k also interacts (i) with other cytoskeleton-related proteins like Cx43 through its CT domain, (ii) with known microtubule-associated motor/adaptor proteins that regulate trafficking and delivery within the cells and (iii) with proteins known to mediate coupling between the actin and microtubule cytoskeletons, which is particularly important for the regulation of fundamental biological processes such as cell shape and polarity, division and migration.

2.3.2. Mitochondrial Dynamics, Biogenesis and Metabolic Regulation

Analysis of the subcellular localization in different cell types reveals that GJA1-20k is present within the ER/Golgi apparatus and at the outer mitochondrial membrane (Fu *et al.*, 2017, 2021; Basheer *et al.*, 2018), differing from the localization of the full-length Cx43 found in the inner membrane (Boengler *et al.*, 2022). Mitochondrial morphology and distribution are critical features in various biological processes, such as maintenance of cell shape and polarity, regulation of the cell cycle, tissues morphogenesis and embryogenesis (for review, (Madan *et al.*, 2022)). During cancer migration, mitochondria redistribute to the leading edge of the cells, providing the energy necessary for cytoskeleton rearrangement and consequently cell invasion (Caino *et al.*, 2016). In this context of mitochondrial dynamics, GJA1-20k acts as an organelle chaperone, facilitating the distribution of mitochondria to the cell periphery through a microtubule-dependent mechanism. On the other hand, GJA1-20k may associate with mitochondrial membrane proteins, similar to full-length Cx43, which has been found to interact with several mitochondrial partners such as Tom20 (Boengler *et al.*, 2022).

GJA1-20k plays a protective role in various stress conditions across different cell types and organs. In HeLa cells overexpressing GJA1-20k, H_2O_2-induced oxidative stress was mitigated by maintaining the mitochondrial network distribution and preventing its fragmentation (Fu *et al.*, 2017). In mouse hearts, AAV9-mediated delivery of GJA1-20k, while promoting mitochondrial biogenesis, reduced the mitochondrial membrane potential, respiration and ROS production in order to preserve cardiac function after ischemic injury (Basheer *et al.*, 2018). In a rat model of cardiac hypertrophy, in vitro overexpression of GJA1-20k in cardiomyocytes enhanced energy metabolism by increasing the mitochondrial membrane potential and respiration and decreasing ROS generation. The reasons for these contrasting effects in different heart injury models remain to be elucidated. Similarly, in a rat model of brain injury GJA1-20k overexpression in astrocytes protected neurons from

apoptosis in part by promoting the biogenesis of mitochondria (Ren *et al.*, 2020).

GJA1-20k overexpression in HEK293 cells led to significant changes in mitochondrial dynamics and structure. It induced the formation of smaller mitochondria due to actin recruitment and the formation of actin filament rings around the mitochondria, which ultimately induced mitochondrial fission, independently of the canonical DRP1-dependent pathway (Shimura *et al.*, 2021). As a result, there was a decrease in ROS production generated by oxidative stress. During this process of fission, GJA1-20k may act directly as a nucleation factor, since GJA1-20k has been identified as a direct actin-binding protein capable of recruiting and stabilizing actin filaments (Baum *et al.*, 2022).

GJA1-20k has also been identified as a key mediator of mitochondrial transfer through tunneling nanotubes (TNTs) from astrocytes to neurons (Ren *et al.*, 2020) and from mesenchymal stromal cells to chondrocytes(Irwin *et al.*, 2024), offering protective effects after traumatic brain injury and osteoarthritis, respectively. GJA1-20k may act on this transfer by regulating the extension of microtubules and actin into TNTs, binding mitochondria with microtubules and bringing Cx43 to the membrane. This is consistent with previous findings indicating that Cx43 plays a role in TNT formation (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2017).

2.3.3. Other Role(s)

Despite the absence of a nuclear localization signal (NLS), GJA1-20k has surprisingly been found in the nucleus of neural crest cells. In this unexpected location, GJA1-20k formed a complex with the transcription factor BTF3 and RNA polymerase II, which then regulated the transcriptional activity of N-cadherin, a protein known to promote neural crest migration (Kotini *et al.*, 2018). Interestingly, when Cx43 CT was expressed in cardiomyocytes and cancer cells, it localized to the nucleus and induced a decrease in proliferation. This nuclear signal may be attributed to the presence of GJA1-20k or other Cx43 isoforms, potentially generated by alternative translation of the mRNA produced by the transfected cDNA encoding the Cx43 CT domain (Dang, Doble and Kardami, 2003). Mennecier et al. identified a 20 kDa immunoreactive protein in the nucleus, detected by Cx43-specific antibodies, which correlated with reduced growth rates in glioma cells (Mennecier *et al.*, 2008).

3. GJA1-20k and Progression of Cancer

3.1. Demonstrated Roles of Alternative Translations During Epithelial-to-Mesenchymal Transition

Unlike in prokaryotes, the process of non-canonical translation in eukaryotes is relatively rare and restricted to specific genes (Karginov *et al.*, 2017). Among these identified polycistronic genes, several are implicated in cancer progression, apoptosis and metastatic initiation processes. Thus, the *p73* gene, a member of the p53 tumor suppressor family, can produce N-terminally truncated isoforms named DNp73 able to support an EMT-like phenotype switch, with an increased cell motility

linked to decreased E-cadherin expression (Steder *et al.*, 2013). In melanoma cells, DNp73 interferes with p73, enhancing aggressiveness without affecting cell growth. In addition, two melanoma antigens (MELOE-1 and MELOE-2) derived from a polycistronic RNA were overexpressed in the melanocytic lineage, suggesting a differential translation in normal versus tumor cells (Carbonnelle *et al.*, 2013). The tissue-specific epigenetic control leading to the specific expression of MELOE-1 and MELOE-2 in melanoma cells suggests that these antigens could be relevant candidates for immunotherapy.

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway directly related to the cell growth, proliferation and apoptosis of prostate cancer cells could also be modulated by cap-independent translation of the mTOR transcript (Marques-Ramos *et al.*, 2017). This regulatory mechanism steers to negative influences during the development and progression of solid tumors. The mTOR signaling pathway not only affects EMT, but also regulates the alternative translation of *GJA1* mRNA, suggesting a transcriptional control of EMT progression. The link between reduced GJA1-20k expression levels relative to Cx43 and the EMT process was demonstrated by James et al. (2018) in a mouse mammary gland epithelial cell line (NmuMG cells) during TGFβ1-induced EMT (James *et al.*, 2018). GJA1-20k expression was altered by TGFβ1 exposure together with a reduction in junctional Cx43, despite an increase in Cx43 protein stabilization. The effect on Cx43 trafficking, previously observed in cardiac cells (Smyth and Shaw, 2013; Basheer *et al.*, 2017), appears to occur in epithelial cells during the initial stages of induced oncogenic transformation. In the EMT context, the specific effect of TGFβ1 on GJA1-20k was associated with smad3-ERK1/2 activities. Surprisingly, ectopic expression of GJA1-20k in NmuMG cells did not prevent EMT, even when Cx43 trafficking to the membrane and gap junction formation increased. These data suggest that membranous Cx43 does not impact the mesenchymal transition of mammary epithelial cells under TGF β1 stimulation.

3.2. Potential GJA1-20k Impacts on Human Cancer Cells

In the 1960s, cancer was the first pathological consequence associated with gap junctional deficiency (Loewenstein and Kanno, 1966). Much evidence for a role of connexins has since been provided, demonstrating that connexins can modulate all stages of tumorigenesis through both channel-dependent and -independent mechanisms, from cancer cell growth and dynamics to metastatic dissemination and response to therapies ((Cronier *et al.*, 2009; Aasen, 2015; Totland *et al.*, 2023; Rodríguez-Candela Mateos *et al.*, 2024). The roles of connexins in the development of cancer are complex, acting as tumor suppressors or promoters according to their isotype, abundance and localization and to cancer stage. In primary cancer sites, reduced connexin expression or a cytoplasmic misdistribution is frequently observed, even if differences exist according to the connexin and cancer types considered. Notably, most of studies revealed that Cx43 mainly acts as a tumor suppressor in breast, lung, melanoma and prostate cancer (Avanzo, 2004; Benko *et al.*, 2011; Ableser

et al., 2014; Rodríguez-Candela Mateos *et al.*, 2024). However, Cx43 can also exert a prometastatic role during cancer progression, especially in prostate and breast cancers and glioblastoma (Boucher et al., 2018; Czyż et al., 2012; Lamiche et al., 2012; Naus & Laird, 2010). Given the ambiguous role of Cx43 in the cancer phenotype, the level of GJA1-20k, which modifies the proportion of membranous Cx43, must be considered for its impact on the intrinsic properties of cancer cells. This includes potential effects on metabolic and dynamic capacities, as well as on heterocellular interactions during dissemination or within the niches of secondary sites. Along the same lines, given the role played by Cx43 CT in cancer cell abilities and the shared sequence with GJA1-20k, a putative role of the short isoform must be addressed (Sin *et al.*, 2016; H. Wang *et al.*, 2018)).

3.2.1. Control of Cx43 Exportation to Plasma Membrane

The increased presence of full-length Cx43 in cancer cells at the plasma membrane may impact their aggressive phenotype at the unicellular level or increase their homocellular or heterocellular gap junctional intercellular communication (GJIC).

Glioblastoma (GBM), one of the most aggressive and lethal brain cancers, is characterized by its ability to diffusely invade surrounding normal brain tissue. As with other cancer types, Cx43 exhibits complex roles in the establishment, progression and persistence of malignant glioma, demonstrating both tumor-promoting and tumor-suppressing functions. This duality can be attributed to the cellular heterogeneity observed in GBM, suggesting that Cx43 may have different roles depending on the cellular population and the state under consideration (Neftel *et al.*, 2019). The in vitro and ex vivo invasion ability of individual GBM cells was correlated with Cx43 expression level, as demonstrated in the human cell line U251 (Strale *et al.*, 2012). In these cells, using an shRNA approach, Cx43 was implicated in the formation and function of invadopodia, mainly by modulating the kinetics of invadopodia formation. This dynamic effect appeared to depend on Cx43 hemichannel activity (Chepied *et al.*, 2020). Recent findings also demonstrate that connexins play an important role in the microenvironment of malignant glioma. Cx43 intercellular channels can form gap junctions at the edge between GBM cells and astrocytes, facilitating tumor invasion (Lin *et al.*, 2002; Sin *et al.*, 2016; McCutcheon and Spray, 2022). Thus, elimination of Cx43 in astrocytes reduced glioma invasion in a murine mode,l confirming a role in driving tumor invasion (Sin *et al.*, 2016). Cx43 expression also enables glioma cells to interact not only with astrocytes but also with other cell types in the brain parenchyma, especially endothelial cells (ECs) (Zhang *et al.*, 2003). Cx43 expressed in both ECs and GBM cells facilitates direct cell-to-cell communication, which appeared crucial for tube formation (Zhang *et al.*, 2003) and may significantly influence glioma invasion (Peleli, Moustakas and Papapetropoulos, 2020). Functional GJIC between these cells was demonstrated to allow the transfer of a pro-invasive miR (miR-5096) from GBM cells to microvascular ECs. This direct transfer of miR induced Cx43

expression in ECs and promoted EC tubulogenesis (Thuringer, Boucher, *et al.*, 2016). Physical contact and GJIC between astrocytes and GBM cells may also confer chemotherapeutic resistance on GBM cells to temozolomide (TMZ) (Lin *et al.*, 2016; Grek *et al.*, 2018). As endogenous GJA1-20k is expressed in primary astrocytes, ECs and some cancer cell lines (see Table 1), a potentially decisive role of this short isoform can be considered during GBM progression.

Although disagreements persist regarding the prometastatic role of Cx43 during breast cancer progression, a subtype-dependent role for this connexin during propagation and late states was clearly described (for review, (Busby, Hallett and Plante, 2018; Rodríguez-Candela Mateos *et al.*, 2024)). As mentioned for GBM, controversies have mainly arisen due to the cellular heterogeneity observed at different stages of dissemination. The essential role for Cx43 appears to occur during dissemination to secondary sites and mainly corresponds to the establishment of heterocellular GJIC, particularly with ECs during the intra- and extravasation processes and with host cells at secondary sites. Thus, Cx43 allowed the formation of functional gap junctions with endothelial cells, enhancing cancer cells transendothelial migration in vitro (Pollmann *et al.*, 2005). Cx43 overexpression increased breast tumor cells diapedesis, whereas blockade of GJIC by carbenoxolone altered the passage throughout the endothelial monolayer. In breast-derived brain metastases, Cx43 expression was upregulated in lesion regions compared to adjacent normal tissue. RNAi depletion of Cx43 or pharmacological blocking of GJIC with carbenoxolone inhibited brain colonization by blocking tumor cell extravasation and blood vessel co-option. The breast cancer metastatic gene *Twist* induced an increase in Cx43 expression and GJIC, leading to amplified extravasation and brain microtumor formation (Stoletov *et al.*, 2013). In vivo, a role for membranous Cx43 was also demonstrated in the vascular adhesion and survival of dormant breast cancer cells in brain metastases (Stoletov *et al.*, 2013). Accordingly, the upregulation of Cx43 in breast cancer micrometastases appears to facilitate their attachment to pulmonary endothelium in a nude mouse model (M. Khair Elzarrad *et al.*, 2008).

As reviewed elsewhere (Czyż, Szpak and Madeja, 2012; Boucher *et al.*, 2018; Talbot *et al.*, 2020), previous works have also linked the metastatic dissemination of prostate cancer (PCa) cells to Cx43 expression levels. In vivo, Cx43 presents modified expression patterns according to PCa progression. In early stages (grade 2), Cx43 expression is strongly decreased within the primary tumor, while re-expression is observed in more advanced stages in the prostate (grade 3) and in bone metastases (Benko *et al.*, 2011; Boucher *et al.*, 2020). At the transcript level, dataset analyses revealed that Cx43 exhibits a specific signature in bone secondary tumors, not observed for the two other GJ genes expressed in normal prostatic tissue (corresponding to Cx32 and Cx26) and for the other secondary sites. In vitro and preclinical experiments clearly demonstrated pro-aggressive effects of Cx43 during dissemination steps (Lamiche *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Boucher *et al.*, 2018, 2020). Thus, Cx43 overexpression in a low-metastatic model (LNCaP) revealed that Cx43 expression level was related to the aggressiveness of PCa cells, with

potentiation of migration ability and increased sensitivity to osteoblastic-conditioned medium (ObCM), used to mimic the metastatic bone niche. In addition to the modulation of Cx43 expression level, altered trafficking to the plasma membrane was also demonstrated in androgen-insensitive PCa cells, especially in cells extracted from bone metastases such as PC3 and C4-2b human cells (Govindarajan *et al.*, 2002). In these trafficking-deficient models, ObCM stimulation remained ineffective even in Cx43-overexpressing PCa cells indicating that the presence of Cx43 at the plasma membrane level is required for bone microenvironment sensitivity (Boucher *et al.*, 2020). It is noteworthy that GJA1-20k is endogenously expressed in LNCaP cells, a PCa cell line characterized by the presence of Cx43 mainly at the plasma membrane. Furthermore, endogenous GJA1-20k expression levels increased in the presence of ObCM (Boucher *et al.*, 2020) or rapamycin in the LNCaP cell model (Boucher, 2018). These results, obtained in a human model without Cx43 exportation defect to the plasma membrane, suggest a potential role of this N-truncated Cx43 isoform in the aggressiveness of PCa cells in the bone context. Preliminary data from our laboratory (-) indicate that GJA1-20k overexpression significantly enhances the exportation of Cx43 to the plasma membrane in a PCa cell model exhibiting a deficiency in full-length Cx43 exportation. Taken together, as initially demonstrated in the cardiac model, these findings unveil a chaperone effect of GJA1-20k that should be considered, given the promigratory role of membranous Cx43 observed during the progression of cancer. Thus, as already demonstrated (Li, Zhou and Donahue, 2008; Lamiche *et al.*, 2012), the adhesion capacity of PCa cells to osteoblasts increases in the presence of membranous Cx43 and this effect could be enhanced by GJA1-20k overexpression, particularly in PCa cells subjected to stress conditions. When the full-length Cx43 is exported to the plasma membrane, the Cx43-mediated cell–cell communication may also potentiate the Ca^{2+} flow from osteogenic cells to cancer cells, thereby increasing metastatic ability (H. Wang *et al.*, 2018). Considering the link between mTOR and the regulation of GJA1-20k expression, it is noteworthy that the same group demonstrated that both cell types can form heterotypic adherens junctions (N-cadherin/E-cadherin), leading to mTOR signaling activation and the promotion of bone metastasis progression (Wang *et al.*, 2015). Regarding the well-known Cx43 positive effect on cellular adhesion (Bao *et al.*, 2011), GJA1-20k could also impact heterocellular adhesion between tumor and bone cells, leading to optimized bone homing of disseminated cells. Moreover, it was recently demonstrated that circulating tumor cell clusters exhibited heightened metastatic potential compared to isolated cells (Grasset, Barillé-Nion and Juin, 2024). These data suggest that increased GJA1-20k may also be involved in protecting these aggregated cancer cells from the shear stress of the bloodstream or from the unfavorable environment found at secondary sites.

3.2.2. Role of Carboxyl-Terminal Domain in Cancer and Analogies for GJA1-20k

GJA1-20k is characterized by the presence of the complete carboxyl-terminal domain of Cx43 in its sequence, which harbors multiple interaction sites with signaling proteins and the cytoskeleton. This structural similarity raises important questions about the functionalparallels between GJA1-20k and the biological roles attributed to Cx43 CT (for review, (Leithe, Mesnil and Aasen, 2018)). We can therefore postulate that findings from studies focusing on the role of Cx43 CT in cancer progression might also be relevant to GJA1-20k, particularly in cellular processes such as proliferation, apoptosis or migration.

For instance, Cx43 CT expression in neuroblastoma cells suppressed cell growth by potentially delaying exit from the G1/G0 phase of the cell cycle (Moorby and Patel, 2001) and, in glioblastoma cells, Cx43 CT reduced anchorage-independent growth (Crespin *et al.*, 2010). Similarly, in osteosarcoma, Cx43 CT inhibited cell proliferation by downregulation of S phase kinase-associated protein 2 (skp2) expression, an important component of the Skp1-Cullin-F-box protein (SCF) ubiquitin–ligase complex implicated in p27 ubiquitin–proteasome degradation (Yw, M and I, 2003). In cervical cancer, Dang et al. also observed a significant decrease in cell proliferation correlated with the localization of Cx43 CT to the nucleus, where it may influence the expression of cell cycle-related genes (Dang, Doble and Kardami, 2003). Interestingly, Cx43 CT in breast cancer cells resulted in an increased expression of p53, possibly through the inhibition of miR-125b expression (Maqbool *et al.*, 2015).

Overexpression of Cx43 CT in pancreatic cancer cells enhanced apoptosis through direct interaction with the pro-apoptotic protein Bax, thereby initiating the mitochondrial apoptotic cascade (Sun *et al.*, 2012). Conversely, in human glioma cells, Cx43 CT was implicated in conferring resistance to the chemotherapeutic agent Temozolomide. Cells expressing a Cx43 CT exhibited decreased resistance compared to those expressing the full-length Cx43 protein (Gielen *et al.*, 2013).

Bates and colleagues (Bates *et al.*, 2007) demonstrated that expression of CT-truncated Cx43 in rat glioma cells led to a reduced migratory capacity, while the overexpression of Cx43 CT in human glioblastoma cells led to enhanced migration through actin cytoskeleton reorganization (Crespin *et al.*, 2010). In cervical cancer, cells exhibited also enhanced migration, via p38 activation, when expressing Cx43 CT (Behrens *et al.*, 2010). In prostate cancer, we demonstrated that Cx43 CT was sufficient to induce the migration of cancer cells stimulated by osteoblast-conditioned medium, correlating with increased active Rac1 (Boucher *et al.*, 2020). Finally, Cx43 CT has also been implicated in neuronal migration and in B-lymphocytes spreading via Rap1 activation, with both of these processes known to be linked to cancer progression (Cina *et al.*, 2009; S *et al.*, 2011).

Cx43 CT has emerged as a promising target for the development of mimetic peptides aimed at modulating connexin function in various pathological conditions, particularly cancer. The first peptide described in this context was alpha carboxy terminus 1 (alphaCT1), a 25 amino-acid peptide that mimics the last nine amino acids of the Cx43 CT, which contains the PDZ-binding motif that interacts with zonula occludens-1 (ZO-1) and an antennapedia internalization sequence to facilitate cellular uptake. AlphaCT1 showed anti-cancer effects on glioblastoma, melanoma

and breast cancer cells by enhancing chemosensitization and inhibiting tumor growth (Grek *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2021; Pridham *et al.*, 2022; da Fonseca *et al.*, 2024). Another noteworthy peptide is TAT-Cx43$_{266-283}$, mimicking the Src SH3 binding domain, which has also demonstrated an anti-tumor effect on glioblastoma both in vitro and in vivo by reducing the growth, invasion and progression of malignant gliomas while enhancing survival in glioma-bearing mice (Gangoso *et al.*, 2014; Jaraíz-Rodríguez *et al.*, 2020). Interestingly, TAT-Cx43$_{266-283}$ treatment on GSCs was also associated with a reduced mitochondrial metabolism and distribution (Pelaz *et al.*, 2020). A third peptide, named juxtamembrane 2 (JM2), has been shown to inhibit proliferation and induce apoptosis of melanoma and ovarian cancer cells in vitro by arresting the cell cycle in S phase. In vivo, JM2 has been demonstrated to effectively inhibit both tumor growth and recurrence (He and Li, 2020). Collectively, these connexin-mimetic peptides may influence GJA1-20k functions based on their structural characteristics. It would then be beneficial to re-evaluate their effects, including on mitochondrial function, cellular stress responses and intercellular communication. This reassessment could provide new insights into the mechanisms of action of these peptides and potentially lead to more targeted therapeutic approaches.

3.2.3. Control of Mitochondrial Localization and Activity

A growing body of evidence indicates that tumor development is not solely dependent on the presence of oncogenes or tumor suppressor mutations. Instead, metabolic adaptations play a crucial role in regulating the growth, survival and metastatic potential of tumor cells. Although the precise mechanisms are not fully elucidated, the Warburg effect, described in the 1930s, is a common feature of metabolic reprogramming during cancer progression. This effect leads to a predominant less efficient process of "aerobic glycolysis" than oxidative phosphorylation in mitochondria (Cutruzzolà *et al.*, 2017). However, recent studies have revealed that functional mitochondria are nevertheless essential for tumor cells, even if most of cancer cells present an altered mitochondrial metabolism with an excessive lactate production in the presence of abundant oxygen (Wallace, 2012). The dysfunction of mitochondrial activities can be attributed to a modified stromal–epithelial metabolic coupling, also known as the "reverse Warburg effect", or to various factors, including mutations in nuclear- or mitochondrial-encoded genes, alterations in the respiratory complexes or mitochondrial products, such as reactive oxygen species (ROS). These imbalances can affect tumor cell growth, apoptosis, EMT, aggressiveness and metastatic competence (Panov and Orynbayeva, 2013; Altieri, 2017; Vikramdeo *et al.*, 2023). Oxidative phosphorylation, once considered as a "tumor suppressor", should now be viewed as a potential contributor to tumor cell adaptation in stressful microenvironments. Moreover, alterations in mitochondrial dynamics or plasticity, including biogenesis and mitophagic, fusion or fission processes, are also considerably involved in prostate cancer progression (Fontana, Anselmi and Limonta, 2023).

Given the significant mitochondrial consequences induced by GJA1-20k in cardiac and brain models, along with its interaction with the outer mitochondrial membrane and its role in fission (Shimura *et al.*, 2021), it can be hypothesized that this short isoform also contributes to the regulation of mitochondrial number, size and subcellular localization, contributing to the adaptation and plasticity of tumor cells. Indeed, a clear link between mitochondrial localization and cell migration has been established, demonstrating a redistribution of mitochondria towards the leading edge of cancer cells during migration and an enrichment of mitochondrial proteins in invadopodia during invasion (Desai *et al.*, 2013; Vikramdeo *et al.*, 2023). Furthermore, the current consensus suggests that mitochondrial fragmentation ultimately enhances cell motility, invasion and metastasis (Boulton and Caino, 2022). Thus, increased mitochondrial fission induced by hypoxia in breast cancer cells has been shown to enhance their invasive ability (Han *et al.*, 2015). Similarly, elevated levels of Mitochondrial Fission Factor (MFF) have been observed in metastatic PCa cells and correlated with poor patients prognosis (Seo *et al.*, 2019). Therefore, it would be of interest to analyze the expression level of GJA1-20k in tumors in order to determine whether it rises similarly to other proteins involved in fission such as DRP1, MFF, FIS1 or MiD49. In addition, mTOR, a factor implicated in GJA1-20k expression in cardiac and cancer cells, was also associated with the trafficking of mitochondria to the cortical cytoskeleton, thereby supporting lamellipodia dynamics in epithelial cancer cells (Caino and Altieri, 2015). Mitochondrial trafficking is also clearly associated with cancer cell plasticity. Given that GJA1-20k is considered a stress protein during ischemia–reperfusion in myocytes due to its protective role in mitochondrial fission (Shimura *et al.*, 2021; Shimura and Shaw, 2022), we can speculate that GJA1-20k plays a role in the processes of the migration, invasion and adaptation of prostate cancer cells within the metastatic microenvironment.

In the metabolic context, the stromal compartment of carcinomas is of prior importance and largely determines the initiation and promotion of tumors. Among the key players within this microenvironment, cancer-associated fibroblasts (CAFs) are capable of establishing a reciprocal metabolic crosstalk with cancer cells, thereby facilitating the reprogramming of the cancer cell phenotype. Evidence for direct intercellular mitochondrial transfer has already been demonstrated through the formation of open-ended TNTs between adjacent cells (Golan *et al.*, 2020; Melwani and Pandey, 2023), including interactions between CAFs and prostate cancer cells, which leads to modified OXPHOS activity (Ippolito *et al.*, 2019). Additionally, TNT formation in PCa cells may influence their resistance to therapy (Kretschmer *et al.*, 2019). As Cx43 contributes to mitochondrial transfer via regulating TNT formation between mesenchymal and epithelial cells (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2018) and GJA1-20k promotes Cx43 delivery to the plasma membrane, a putative role of GJA1-20k in the potential control of mitochondrial activity by TNTs could also be postulated within PCa. Interestingly, in the context of osteoarthritis, a role of GJA1-20k was recently demonstrated in mitochondrial transfer between mesenchymal stem cells (MSCs) and chondrocytes. GJA1-20k's impact on MSC

mitochondrial transport requires direct cell-to-cell contact and is dependent on the expression levels of Cx43 (Irwin *et al.*, 2024). These results highlight the interest in investigating the role of GJA1-20k in the potential transfer of mitochondria between MSCs or osteoprogenitors and cancer cells during bone metastases.

Additionally, the involvement of extracellular vesicles (EVs) and of direct Cx43-GJIC in the mechanism for mitochondrial transfer were also shown to retore mitochondrial functional parameters in deficient cells (Yang *et al.*, 2023). The upregulation of GJA1-20k in astrocytes was found to be correlated with an increased presence of this short isoform in exosomes, which was associated with enhanced mitochondrial activity, a reduced apoptotic rate and diminished damages to adjacent neurons (Chen *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2023).

These findings suggest that such an effect could be considered in intercellular communication between cancer cells and other cells within the tumor microenvironment. For instance, many prostate cancer recurrences following curative treatment are thought to arise from the reactivation of disseminated tumor cells (DTCs) and the bone marrow is considered to be an important site for dormant tumor cells, due to the high incidence of bone metastases. These dormant tumor cells are characterized, among other features, by a reversible non-proliferative state (G0/G1 arrest), allowing them to remain viable and represent a potential source for late recurrence and therapy resistance. As previously mentioned, conditions within the osteogenic niche, mainly hypoxia and/or interaction with the tumor microenvironment, may favor the preferential expression of the stress protein GJA1-20k. Consequently, GJA1-20k may exert a metabolic impact during cellular stresses in the bone context and could modulate both the quiescence and metabolic activity of PCa DTCs. Indeed, increased mitochondrial fission and/or resistance to ROS production induced by GJA1-20k are linked with decreased metabolic activity and cellular quiescence (Shimura *et al.*, 2021).

4. Concluding Remarks and Perspectives

Among the six isoforms of Cx43, GJA1-20k has been identified as a key player in heart physiology and pathology. As a chaperone protein and regulator of cytoskeleton stability, GJA1-20k promotes GJIC by controlling full-length Cx43 trafficking to the plasma membrane, particularly during cellular stress. This regulatory effect has also been documented in other tissues, such as the brain, and in different cell types, suggesting a conserved mechanism for Cx43 transport. The cellular effects of GJA1-20k observed in the cardiac and nervous systems, together with the established role of Cx43 in tumorigenesis, suggest that the presence of GJA1-20k in cancer cells may be an important new regulatory factor during cancer cell migration and invasion. Further investigations are required to elucidate the specific molecular mechanisms by which GJA1-20k regulates Cx43 trafficking. This includes investigating potential interactions with cytoskeleton-related proteins, microtubule-associated motor/adaptor proteins and proteins mediating actin–microtubule coupling that are critical for cell dynamics. In addition, it will be of interest

to determine whether this regulatory mechanism is exclusive to Cx43 or whether it also influences the trafficking of other membrane proteins.

Moreover, increased expression of GJA1-20k in cancer cells may increase Cx43 localization at cell boundaries and improve GJIC. This could potentially amplify the bystander effect during targeted chemotherapy, a hypothesis that merits further investigation due to its implications for cancer treatment strategies. Notably, the delivery of GJA1-20k via adeno-associated virus has shown promise in improving gap junction formation in cardiac models, suggesting that similar strategies could be explored within the cancer context.

GJA1-20k has also been shown to modulate mitochondrial activity and dynamics under stressful conditions, which is essential for cell survival. Although GJA1-20k is expressed in several cancer cell lines, its specific functions remain largely unknown at this point. Cancer cells are frequently exposed to exogenous stresses such as hypoxia and consequently develop adaptive mechanisms, including mitochondrial retrograde signaling or intercellular mitochondrial transfer through TNTs with stromal cells. Several studies have demonstrated that increased mitochondrial fission promotes cancer progression, particularly cell migration and invasion. In this context, mitochondria are preferentially redistributed to the leading edge of the cancer cells. Additionally, a decrease in mitochondrial mass contributes to the survival and dormancy of cancer stem cells. Overall, given the role of GJA1-20k in inducing mitochondrial fission and redistribution, GJA1-20k may play an important role in tumor plasticity, cancer cell metastasis, survival and quiescence in secondary sites such as hypoxic osteogenic bone. In the latter case, quiescent disseminated tumor cells represent a risk to patients but also offer opportunities for early detection. However, it should be emphasized that antibodies specific for the detection of GJA1-20k will also react with full-length Cx43, making it difficult to differentiate between the two in patient biopsies. This also implies that conclusions drawn about full-length-Cx43 using antibodies against the C-terminal domain should be re-evaluated. Furthermore, studies focusing on the proper functions of Cx43 CT should also be reconsidered due to its strict structural homology with GJA1-20k.

In less than a decade, significant advances in our understanding of the role of GJA1-20k in cardiac physiology have provided important new insights into Cx43 trafficking and the regulation of mitochondrial activity. Future studies will aim to determine the potential involvement of this multifaceted isoform of Cx43 in tumor progression, with the intention of providing advances in the field of cancer.

Funding: This research was supported by grants from the “Ligue Nationale contre le Cancer” (comités des Deux-Sèvres et de Charente). S. Fournier is the recipient of a doctoral fellowship from the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Beyer, E.C.; Paul, D.L.; Goodenough, D.A. Connexin43: A Protein from Rat Heart Homologous to a Gap Junction Protein from Liver. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 2621–2629. https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2621.
2. Evans, W.H.; Martin, P.E.M. Gap Junctions: Structure and Function (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2002**, *19*, 121–136. https://doi.org/10.1080/09687680210139839.
3. Söhl, G.; Willecke, K. An Update on Connexin Genes and Their Nomenclature in Mouse and Man. *Cell Commun. Adhes.* **2003**, *10*, 173–180. https://doi.org/10.1080/cac.10.4-6.173.180.
4. Unwin, P.N.; Zampighi, G. Structure of the Junction between Communicating Cells. *Nature* **1980**, *283*, 545–549. https://doi.org/10.1038/283545a0.
5. Laird, D.W.; Puranam, K.L.; Revel, J.P. Turnover and Phosphorylation Dynamics of Connexin43 Gap Junction Protein in Cultured Cardiac Myocytes. *Biochem. J.* **1991**, *273*, 67–72. https://doi.org/10.1042/bj2730067.
6. Giaume, C.; Leybaert, L.; Naus, C.C.; Sáez, J.C. Connexin and Pannexin Hemichannels in Brain Glial Cells: Properties, Pharmacology, and Roles. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 88. https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088.
7. Alexander, D.B.; Goldberg, G.S. Transfer of Biologically Important Molecules between Cells through Gap Junction Channels. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2045–2058. https://doi.org/10.2174/0929867033456927.
8. Sáez, J.C.; Connor, J.A.; Spray, D.C.; Bennett, M.V. Hepatocyte Gap Junctions Are Permeable to the Second Messenger, Inositol 1,4,5-Trisphosphate, and to Calcium Ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2708–2712. https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2708.
9. Goldberg, G.S.; Valiunas, V.; Brink, P.R. Selective Permeability of Gap Junction Channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1662*, 96–101. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.022.
10. Goldberg, G.S.; Moreno, A.P.; Lampe, P.D. Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36725–36730. https://doi.org/10.1074/jbc.M109797200.
11. Thuringer, D.; Jego, G.; Berthenet, K.; Hammann, A.; Solary, E.; Garrido, C. Gap Junction-Mediated Transfer of miR-145-5p from Microvascular Endothelial Cells to Colon Cancer Cells Inhibits Angiogenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 28160–28168. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8583.
12. Thuringer, D.; Boucher, J.; Jego, G.; Pernet, N.; Cronier, L.; Hammann, A.; Solary, E.; Garrido, C. Transfer of Functional microRNAs between Glioblastoma and Microvascular Endothelial Cells through Gap Junctions. *Oncotarget* **2016**, *7*, 73925–73934. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12136.
13. Oyamada, M.; Krutovskikh, V.A.; Mesnil, M.; Partensky, C.; Berger, F.; Yamasaki, H. Aberrant Expression of Gap Junction Gene in Primary Human Hepatocellular Carcinomas: Increased Expression of Cardiac-Type Gap Junction Gene Connexin 43. *Mol. Carcinogenes.* **1990**, *3*, 273–278. https://doi.org/10.1002/mc.2940030507.
14. Yamasaki, H.; Mesnil, M.; Omori, Y.; Mironov, N.; Krutovskikh, V. Intercellular Communication and Carcinogenesis. *Mutat. Res.* **1995**, *333*, 181–188. https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00144-1.
15. Severs, N.J. Gap Junction Remodeling and Cardiac Arrhythmogenesis: Cause or Coincidence? *J. Cell. Mol. Med.* **2001**, *5*, 355–366. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00170.x.
16. Saffitz, J.E.; Hames, K.Y.; Kanno, S. Remodeling of Gap Junctions in Ischemic and Nonischemic Forms of Heart Disease. *J. Membr. Biol.* **2007**, *218*, 65–71. https://doi.org/10.1007/s00232-007-9031-2.
17. Bergoffen, J.; Scherer, S.S.; Wang, S.; Scott, M.O.; Bone, L.J.; Paul, D.L.; Chen, K.; Lensch, M.W.; Chance, P.F.; Fischbeck, K.H. Connexin Mutations in X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Science* **1993**, *262*, 2039–2042.
18. Merrifield, P.A.; Laird, D.W. Connexins in Skeletal Muscle Development and Disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *50*, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.001.
19. Kelsell, D.P.; Dunlop, J.; Stevens, H.P.; Lench, N.J.; Liang, J.N.; Parry, G.; Mueller, R.F.; Leigh, I.M. Connexin 26 Mutations in Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Deafness. *Nature* **1997**, *387*, 80–83. https://doi.org/10.1038/387080a0.
20. Lucaciu, S.A.; Leighton, S.E.; Hauser, A.; Yee, R.; Laird, D.W. Diversity in Connexin Biology. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299*, 105263. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105263.
21. Boengler, K.; Leybaert, L.; Ruiz-Meana, M.; Schulz, R. Connexin 43 in Mitochondria: What Do We Really Know About Its Function? *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 928934. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.928934.
22. Soares, A.R.; Martins-Marques, T.; Ribeiro-Rodrigues, T.; Ferreira, J.V.; Catarino, S.; Pinho, M.J.; Zuzarte, M.; Isabel Anjo, S.; Manadas, B.; Sluijter, J.P.G.; et al. Gap Junctional Protein Cx43 Is Involved in the

Communication between Extracellular Vesicles and Mammalian Cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13243. https://doi.org/10.1038/srep13243.

23. Willecke, K.; Eiberger, J.; Degen, J.; Eckardt, D.; Romualdi, A.; Güldenagel, M.; Deutsch, U.; Söhl, G. Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. **2002**, *383*, 725–737. https://doi.org/10.1515/BC.2002.076.
24. Schiavi, A.; Hudder, A.; Werner, R. Connexin43 mRNA Contains a Functional Internal Ribosome Entry Site. *FEBS Lett.* **1999**, *464*, 118–122. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01699-3.
25. Lahlou, H.; Fanjul, M.; Pradayrol, L.; Susini, C.; Pyronnet, S. Restoration of Functional Gap Junctions through Internal Ribosome Entry Site-Dependent Synthesis of Endogenous Connexins in Density-Inhibited Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4034–4045. https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4034-4045.2005.
26. Hudder, A.; Werner, R. Analysis of a Charcot-Marie-Tooth Disease Mutation Reveals an Essential Internal Ribosome Entry Site Element in the Connexin-32 Gene. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34586–34591. https://doi.org/10.1074/jbc.M005199200.
27. Smyth, J.W.; Shaw, R.M. Autoregulation of Connexin43 Gap Junction Formation by Internally Translated Isoforms. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 611–618. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.009.
28. Epifantseva, I.; Xiao, S.; Baum, R.E.; Kléber, A.G.; Hong, T.; Shaw, R.M. An Alternatively Translated Connexin 43 Isoform, GJA1-11k, Localizes to the Nucleus and Can Inhibit Cell Cycle Progression. *Biomolecules* **2020**, *10*, 473. https://doi.org/10.3390/biom10030473.
29. Leithe, E.; Mesnil, M.; Aasen, T. The Connexin 43 C-Terminus: A Tail of Many Tales. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2018**, *1860*, 48–64. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.008.
30. Johnstone, S.R.; Billaud, M.; Lohman, A.W.; Taddeo, E.P.; Isakson, B.E. Posttranslational Modifications in Connexins and Pannexins. *J. Membr. Biol.* **2012**, *245*, 319–332. https://doi.org/10.1007/s00232-012-9453-3.
31. Laird, D.W. Connexin Phosphorylation as a Regulatory Event Linked to Gap Junction Internalization and Degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1711*, 172–182. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.009.
32. Pogoda, K.; Kameritsch, P.; Retamal, M.A.; Vega, J.L. Regulation of Gap Junction Channels and Hemichannels by Phosphorylation and Redox Changes: A Revision. *BMC Cell Biol.* **2016**, *17*, 11. https://doi.org/10.1186/s12860-016-0099-3.
33. Lin, R.; Warn-Cramer, B.J.; Kurata, W.E.; Lau, A.F. V-Src-Mediated Phosphorylation of Connexin43 on Tyrosine Disrupts Gap Junctional Communication in Mammalian Cells. *Cell Commun. Adhes.* **2001**, *8*, 265–269. https://doi.org/10.3109/15419060109080735.
34. Fanning, A.S.; Anderson, J.M. Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 113–120. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.
35. Butkevich, E.; Hülsmann, S.; Wenzel, D.; Shirao, T.; Duden, R.; Majoul, I. Drebrin Is a Novel Connexin-43 Binding Partner That Links Gap Junctions to the Submembrane Cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* **2004**, *14*, 650–658. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.063.
36. Ambrosi, C.; Ren, C.; Spagnol, G.; Cavin, G.; Cone, A.; Grintsevich, E.E.; Sosinsky, G.E.; Sorgen, P.L. Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157073. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157073.
37. Rodríguez-Sinovas, A.; Sánchez, J.A.; Valls-Lacalle, L.; Consegal, M.; Ferreira-González, I. Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4413. https://doi.org/10.3390/ijms22094413.
38. Hervé, J.-C.; Derangeon, M.; Sarrouilhe, D.; Giepmans, B.N.G.; Bourmeyster, N. Gap Junctional Channels Are Parts of Multiprotein Complexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* **2012**, *1818*, 1844–1865. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.009.
39. Batra, N.; Kar, R.; Jiang, J.X. Gap Junctions and Hemichannels in Signal Transmission, Function and Development of Bone. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 1909–1918. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.018.
40. Chatterjee, B.; Chin, A.J.; Valdimarsson, G.; Finis, C.; Sonntag, J.M.; Choi, B.Y.; Tao, L.; Balasubramanian, K.; Bell, C.; Krufka, A.; et al. Developmental Regulation and Expression of the Zebrafish Connexin43 Gene. *Dev. Dyn.* **2005**, *233*, 890–906. https://doi.org/10.1002/dvdy.20426.

41. Joshi-Mukherjee, R.; Coombs, W.; Burrer, C.; de Mora, I.A.; Delmar, M.; Taffet, S.M. Evidence for the Presence of a Free C-Terminal Fragment of Cx43 in Cultured Cells. *Cell Commun. Adhes.* **2007**, *14*, 75–84. https://doi.org/10.1080/15419060701402320.
42. Xiao, S.; Shimura, D.; Baum, R.; Hernandez, D.M.; Agvanian, S.; Nagaoka, Y.; Katsumata, M.; Lampe, P.D.; Kleber, A.G.; Hong, T.; et al. Auxiliary Trafficking Subunit GJA1-20k Protects Connexin-43 from Degradation and Limits Ventricular Arrhythmias. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 4858–4870. https://doi.org/10.1172/JCI134682.
43. Basheer, W.A.; Xiao, S.; Epifantseva, I.; Fu, Y.; Kleber, A.G.; Hong, T.; Shaw, R.M. GJA1-20k Arranges Actin to Guide Cx43 Delivery to Cardiac Intercalated Discs. *Circ. Res.* **2017**, *121*, 1069–1080. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311955.
44. Basheer, W.A.; Fu, Y.; Shimura, D.; Xiao, S.; Agvanian, S.; Hernandez, D.M.; Hitzeman, T.C.; Hong, T.; Shaw, R.M. Stress Response Protein GJA1-20k Promotes Mitochondrial Biogenesis, Metabolic Quiescence, and Cardioprotection against Ischemia/Reperfusion Injury. *JCI Insight* **2018**, *3*, e121900. https://doi.org/10.1172/jci.insight.121900.
45. Fu, Y.; Tao, L.; Peng, F.; Zheng, N.; Lin, Q.; Cai, S.; Wang, Q. GJA1-20k Attenuates Ang II-Induced Pathological Cardiac Hypertrophy by Regulating Gap Junction Formation and Mitochondrial Function. *Acta Pharmacol. Sin.* **2021**, *42*, 536–549. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0459-6.
46. Shimura, D.; Nuebel, E.; Baum, R.; Valdez, S.E.; Xiao, S.; Warren, J.S.; Palatinus, J.A.; Hong, T.; Rutter, J.; Shaw, R.M. Protective Mitochondrial Fission Induced by Stress-Responsive Protein GJA1-20k. *eLife* **2021**, *10*, e69207. https://doi.org/10.7554/eLife.69207.
47. Fu, Y.; Zhang, S.-S.; Xiao, S.; Basheer, W.A.; Baum, R.; Epifantseva, I.; Hong, T.; Shaw, R.M. Cx43 Isoform GJA1-20k Promotes Microtubule Dependent Mitochondrial Transport. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 905. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00905.
48. James, C.C.; Zeitz, M.J.; Calhoun, P.J.; Lamouille, S.; Smyth, J.W. Altered Translation Initiation of *Gja1* Limits Gap Junction Formation during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 797–808. https://doi.org/10.1091/mbc.E17-06-0406.
49. Ren, D.; Zheng, P.; Feng, J.; Gong, Y.; Wang, Y.; Duan, J.; Zhao, L.; Deng, J.; Chen, H.; Zou, S.; et al. Overexpression of Astrocytes-Specific GJA1-20k Enhances the Viability and Recovery of the Neurons in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 1643–1650. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00142.
50. Chen, W.; Zheng, P.; Hong, T.; Wang, Y.; Liu, N.; He, B.; Zou, S.; Ren, D.; Duan, J.; Zhao, L.; et al. Astrocytes-Derived Exosomes Induce Neuronal Recovery after Traumatic Brain Injury via Delivering Gap Junction Alpha 1-20 k. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2020**, *14*, 412–423. https://doi.org/10.1002/term.3002.
51. Phillips, C.M.; Johnson, A.M.; Stamatovic, S.M.; Keep, R.F.; Andjelkovic, A.V. 20 kDa Isoform of Connexin-43 Augments Spatial Reorganization of the Brain Endothelial Junctional Complex and Lesion Leakage in Cerebral Cavernous Malformation Type-3. *Neurobiol. Dis.* **2023**, *186*, 106277. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106277.
52. Boucher, J.; Balandre, A.-C.; Debant, M.; Vix, J.; Harnois, T.; Bourmeyster, N.; Péraudeau, E.; Chépied, A.; Clarhaut, J.; Debiais, F.; et al. Cx43 Present at the Leading Edge Membrane Governs Promigratory Effects of Osteoblast-Conditioned Medium on Human Prostate Cancer Cells in the Context of Bone Metastasis. *Cancers* **2020**, *12*, E3013. https://doi.org/10.3390/cancers12103013.
53. Salat-Canela, C.; Sesé, M.; Peula, C.; Ramón y Cajal, S.; Aasen, T. Internal Translation of the Connexin 43 Transcript. *Cell Commun. Signal. CCS* **2014**, *12*, 31. https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-31.
54. Ul-Hussain, M.; Olk, S.; Schoenebeck, B.; Wasielewski, B.; Meier, C.; Prochnow, N.; May, C.; Galozzi, S.; Marcus, K.; Zoidl, G.; et al. Internal Ribosomal Entry Site (IRES) Activity Generates Endogenous Carboxyl-Terminal Domains of Cx43 and Is Responsive to Hypoxic Conditions. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 20979–20990. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540187.
55. Zeitz, M.J.; Calhoun, P.J.; James, C.C.; Taetzsch, T.; George, K.K.; Robel, S.; Valdez, G.; Smyth, J.W. Dynamic UTR Usage Regulates Alternative Translation to Modulate Gap Junction Formation during Stress and Aging. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 2737–2747.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.114.

56. Basheer, W.; Shaw, R. The "Tail" of Connexin43: An Unexpected Journey from Alternative Translation to Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 1848–1856. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.015.
57. Palatinus, J.A.; Valdez, S.; Taylor, L.; Whisenant, C.; Selzman, C.H.; Drakos, S.G.; Ranjan, R.; Hong, T.; Saffitz, J.E.; Shaw, R.M. GJA1-20k Rescues Cx43 Localization and Arrhythmias in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ. Res.* **2023**, *132*, 744–746. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.322294.
58. Feng, J.; Zou, S.; Yang, X.; Wang, Z.; Jiang, B.; Hou, T.; Duan, J.; Hong, T.; Chen, W. Astrocyte-Derived Exosome-Transported GJA1-20k Attenuates Traumatic Brain Injury in Rats. *Chin. Med. J.* **2023**, *136*, 880–882. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002320.
59. Giepmans, B.N.G.; Verlaan, I.; Hengeveld, T.; Janssen, H.; Calafat, J.; Falk, M.M.; Moolenaar, W.H. Gap Junction Protein Connexin-43 Interacts Directly with Microtubules. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1364–1368. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00424-9.
60. Saidi Brikci-Nigassa, A.; Clement, M.-J.; Ha-Duong, T.; Adjadj, E.; Ziani, L.; Pastre, D.; Curmi, P.A.; Savarin, P. Phosphorylation Controls the Interaction of the Connexin43 C-Terminal Domain with Tubulin and Microtubules. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4331–4342. https://doi.org/10.1021/bi201806j.
61. Shaw, R.M.; Fay, A.J.; Puthenveedu, M.A.; Jan, N.; Jan, L.Y. Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions. *Cell* **2007**, *128*, 547–560.
62. Baum, R.; Palatinus, J.A.; Waghalter, M.; Shimura, D.; Jin, Q.; Kuzmanovich, L.; Xiao, S.; Kléber, A.G.; Grintsevich, E.E.; Hong, T.; et al. GJA1-20k, an Internally Translated Isoform of Connexin 43, Is an Actin Capping Protein. *bioRxiv* **2022**.
63. Madan, S.; Uttekar, B.; Chowdhary, S.; Rikhy, R. Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *9*, 781933. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.781933.
64. Caino, M.C.; Seo, J.H.; Aguinaldo, A.; Wait, E.; Bryant, K.G.; Kossenkov, A.V.; Hayden, J.E.; Vaira, V.; Morotti, A.; Ferrero, S.; et al. A Neuronal Network of Mitochondrial Dynamics Regulates Metastasis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13730. https://doi.org/10.1038/ncomms13730.
65. Irwin, R.M.; Thomas, M.A.; Fahey, M.J.; Mayán, M.D.; Smyth, J.W.; Delco, M.L. Connexin 43 Regulates Intercellular Mitochondrial Transfer from Human Mesenchymal Stromal Cells to Chondrocytes. *Stem Cell Res. Ther.* **2024**, *15*, 359.
66. Ribeiro-Rodrigues, T.M.; Martins-Marques, T.; Morel, S.; Kwak, B.R.; Girão, H. Role of Connexin 43 in Different Forms of Intercellular Communication—Gap Junctions, Extracellular Vesicles and Tunnelling Nanotubes. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 3619–3630. https://doi.org/10.1242/jcs.200667.
67. Kotini, M.; Barriga, E.H.; Leslie, J.; Gentzel, M.; Rauschenberger, V.; Schambony, A.; Mayor, R. Gap Junction Protein Connexin-43 Is a Direct Transcriptional Regulator of N-Cadherin in Vivo. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3846. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06368-x.
68. Dang, X.; Doble, B.W.; Kardami, E. The Carboxy-Tail of Connexin-43 Localizes to the Nucleus and Inhibits Cell Growth. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *242*, 35–38.
69. Mennecier, G.; Derangeon, M.; Coronas, V.; Hervé, J.-C.; Mesnil, M. Aberrant Expression and Localization of Connexin43 and Connexin30 in a Rat Glioma Cell Line. *Mol. Carcinogenes.* **2008**, *47*, 391–401. https://doi.org/10.1002/mc.20393.
70. Karginov, T.A.; Pastor, D.P.H.; Semler, B.L.; Gomez, C.M. Mammalian Polycistronic mRNAs and Disease. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 129–142. https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.11.007.
71. Steder, M.; Alla, V.; Meier, C.; Spitschak, A.; Pahnke, J.; Fürst, K.; Kowtharapu, B.S.; Engelmann, D.; Petigk, J.; Egberts, F.; et al. DNp73 Exerts Function in Metastasis Initiation by Disconnecting the Inhibitory Role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 Signaling. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 512–527. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.023.
72. Carbonnelle, D.; Vignard, V.; Sehedic, D.; Moreau-Aubry, A.; Florenceau, L.; Charpentier, M.; Mikulits, W.; Labarriere, N.; Lang, F. The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Bona Fide Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75233. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075233.

73. Marques-Ramos, A.; Candeias, M.M.; Menezes, J.; Lacerda, R.; Willcocks, M.; Teixeira, A.; Locker, N.; Romão, L. Cap-Independent Translation Ensures mTOR Expression and Function upon Protein Synthesis Inhibition. *RNA* **2017**, *23*, 1712–1728. https://doi.org/10.1261/rna.063040.117.
74. Loewenstein, W.R.; Kanno, Y. Intercellular Communication and the Control of Tissue Growth: Lack of Communication between Cancer Cells. *Nature* **1966**, *209*, 1248–1249.
75. Rodríguez-Candela Mateos, M.; Carpintero-Fernández, P.; Freijanes, P.S.; Mosquera, J.; Nebril, B.A.; Mayán, M.D. Insights into the Role of Connexins and Specialized Intercellular Communication Pathways in Breast Cancer: Mechanisms and Applications. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Rev. Cancer* **2024**, *1879*, 189173. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189173.
76. Totland, M.Z.; Omori, Y.; Sørensen, V.; Kryeziu, K.; Aasen, T.; Brech, A.; Leithe, E. Endocytic Trafficking of Connexins in Cancer Pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Basis Dis.* **2023**, *1869*, 166812. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166812.
77. Cronier, L.; Crespin, S.; Strale, P.-O.; Defamie, N.; Mesnil, M. Gap Junctions and Cancer: New Functions for an Old Story. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 323–338. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2153.
78. Aasen, T. Connexins: Junctional and Non-Junctional Modulators of Proliferation. *Cell Tissue Res.* **2015**, *360*, 685–699. https://doi.org/10.1007/s00441-014-2078-3.
79. Ableser, M.J.; Penuela, S.; Lee, J.; Shao, Q.; Laird, D.W. Connexin43 Reduces Melanoma Growth within a Keratinocyte Microenvironment and during Tumorigenesis in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 1592–1603. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507228.
80. Avanzo, J.L. Increased Susceptibility to Urethane-Induced Lung Tumors in Mice with Decreased Expression of Connexin43. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1973–1982. https://doi.org/10.1093/carcin/bgh193.
81. Benko, G.; Spajić, B.; Demirović, A.; Štimac, G.; Kru&sbreve, B.; lin; Tomas, D. Prognostic Value of Connexin43 Expression in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2011**, *14*, 90–95. https://doi.org/10.1038/pcan.2010.51.
82. Lamiche, C.; Clarhaut, J.; Strale, P.-O.; Crespin, S.; Pedretti, N.; Bernard, F.-X.; Naus, C.C.; Chen, V.C.; Foster, L.J.; Defamie, N.; et al. The Gap Junction Protein Cx43 Is Involved in the Bone-Targeted Metastatic Behaviour of Human Prostate Cancer Cells. *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 111–122. https://doi.org/10.1007/s10585-011-9434-4.
83. Czyż, J.; Szpak, K.; Madeja, Z. The Role of Connexins in Prostate Cancer Promotion and Progression. *Nat. Rev. Urol.* **2012**, *9*, 274–282. https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.14.
84. Boucher, J.; Monvoisin, A.; Vix, J.; Mesnil, M.; Thuringer, D.; Debiais, F.; Cronier, L. Connexins, Important Players in the Dissemination of Prostate Cancer Cells. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2018**, *1860*, 202–215. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.020.
85. Naus, C.C.; Laird, D.W. Implications and Challenges of Connexin Connections to Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 435–441. https://doi.org/10.1038/nrc2841.
86. Sin, W.C.; Aftab, Q.; Bechberger, J.F.; Leung, J.H.; Chen, H.; Naus, C.C. Astrocytes Promote Glioma Invasion via the Gap Junction Protein Connexin43. *Oncogene* **2016**, *35*, 1504–1516. https://doi.org/10.1038/onc.2015.210.
87. Wang, H.; Tian, L.; Liu, J.; Goldstein, A.; Bado, I.; Zhang, W.; Arenkiel, B.R.; Li, Z.; Yang, M.; Du, S.; et al. The Osteogenic Niche Is a Calcium Reservoir of Bone Micrometastases and Confers Unexpected Therapeutic Vulnerability. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 823–839.e7. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.002.
88. Neftel, C.; Laffy, J.; Filbin, M.G.; Hara, T.; Shore, M.E.; Rahme, G.J.; Richman, A.R.; Silverbush, D.; Shaw, M.L.; Hebert, C.M.; et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* **2019**, *178*, 835–849.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024.
89. Strale, P.-O.; Clarhaut, J.; Lamiche, C.; Cronier, L.; Mesnil, M.; Defamie, N. Down-Regulation of Connexin43 Expression Reveals the Involvement of Caveolin-1 Containing Lipid Rafts in Human U251 Glioblastoma Cell Invasion. *Mol. Carcinogenes.* **2012**, *51*, 845–860. https://doi.org/10.1002/mc.20853.
90. Chepied, A.; Daoud-Omar, Z.; Meunier-Balandre, A.-C.; Laird, D.W.; Mesnil, M.; Defamie, N. Involvement of the Gap Junction Protein, Connexin43, in the Formation and Function of Invadopodia in the Human U251 Glioblastoma Cell Line. *Cells* **2020**, *9*, 117. https://doi.org/10.3390/cells9010117.

91. McCutcheon, S.; Spray, D.C. Glioblastoma–Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion. *Mol. Cancer Res.* **2022**, *20*, 319–331. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0199.
92. Lin, J.H.-C.; Takano, T.; Cotrina, M.L.; Arcuino, G.; Kang, J.; Liu, S.; Gao, Q.; Jiang, L.; Li, F.; Lichtenberg-Frate, H.; et al. Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 4302–4311. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04302.2002.
93. Zhang, W.; DeMattia, J.A.; Song, H.; Couldwell, W.T. Communication between Malignant Glioma Cells and Vascular Endothelial Cells through Gap Junctions. *J. Neurosurg.* **2003**, *98*, 846–853. https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.4.0846.
94. Peleli, M.; Moustakas, A.; Papapetropoulos, A. Endothelial-Tumor Cell Interaction in Brain and CNS Malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7371. https://doi.org/10.3390/ijms21197371.
95. Grek, C.L.; Sheng, Z.; Naus, C.C.; Sin, W.C.; Gourdie, R.G.; Ghatnekar, G.G. Novel Approach to Temozolomide Resistance in Malignant Glioma: Connexin43-Directed Therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *41*, 79–88. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.002.
96. Lin, Q.; Liu, Z.; Ling, F.; Xu, G. Astrocytes Protect Glioma Cells from Chemotherapy and Upregulate Survival Genes via Gap Junctional Communication. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 1329–1335. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4680.
97. Busby, M.; Hallett, M.; Plante, I. The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 693. https://doi.org/10.3390/ijms19030693.
98. Pollmann, M.-A.; Shao, Q.; Laird, D.W.; Sandig, M. Connexin 43 Mediated Gap Junctional Communication Enhances Breast Tumor Cell Diapedesis in Culture. *Breast Cancer Res. BCR* **2005**, *7*, R522–534. https://doi.org/10.1186/bcr1042.
99. Stoletov, K.; Strnadel, J.; Zardouzian, E.; Momiyama, M.; Park, F.D.; Kelber, J.A.; Pizzo, D.P.; Hoffman, R.; VandenBerg, S.R.; Klemke, R.L. Role of Connexins in Metastatic Breast Cancer and Melanoma Brain Colonization. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 904–913. https://doi.org/10.1242/jcs.112748.
100. Elzarrad, M.K.; Haroon, A.; Willecke, K.; Dobrowolski, R.; Gillespie, M.N.; Al-Mehdi, A.-B. Connexin-43 Upregulation in Micrometastases and Tumor Vasculature and Its Role in Tumor Cell Attachment to Pulmonary Endothelium. *BMC Med.* **2008**, *6*, 20. https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-20.
101. Talbot, J.; Dupuy, M.; Morice, S.; Rédini, F.; Verrecchia, F. Antagonistic Functions of Connexin 43 during the Development of Primary or Secondary Bone Tumors. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1240. https://doi.org/10.3390/biom10091240.
102. Zhang, A.; Hitomi, M.; Bar-Shain, N.; Dalimov, Z.; Ellis, L.; Velpula, K.K.; Fraizer, G.C.; Gourdie, R.G.; Lathia, J.D. Connexin 43 Expression Is Associated with Increased Malignancy in Prostate Cancer Cell Lines and Functions to Promote Migration. *Oncotarget* **2015**, *6*, 11640–11651. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3449.
103. Govindarajan, R.; Zhao, S.; Song, X.-H.; Guo, R.-J.; Wheelock, M.; Johnson, K.R.; Mehta, P.P. Impaired Trafficking of Connexins in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cell Lines and Its Mitigation by Alpha-Catenin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50087–50097. https://doi.org/10.1074/jbc.M202652200.
104. Boucher, J. Involvement of connexin 43 in prostate cancer progression to bone. Available on line: https://theses.fr/s160922 (accessed on 19 December 2018).
105. Li, Z.; Zhou, Z.; Donahue, H.J. Alterations in Cx43 and OB-Cadherin Affect Breast Cancer Cell Metastatic Potential. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 265–272. https://doi.org/10.1007/s10585-007-9140-4.
106. Wang, H.; Yu, C.; Gao, X.; Welte, T.; Muscarella, A.M.; Tian, L.; Zhao, H.; Zhao, Z.; Du, S.; Tao, J.; et al. The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 193–210. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.017.
107. Bao, B.; Jiang, J.; Yanase, T.; Nishi, Y.; Morgan, J.R. Connexon-Mediated Cell Adhesion Drives Microtissue Self-Assembly. *FASEB J.* **2011**, *25*, 255–264. https://doi.org/10.1096/fj.10-155291.
108. Grasset, E.M.; Barillé-Nion, S.; Juin, P.P. Stress in the Metastatic Journey—The Role of Cell Communication and Clustering in Breast Cancer Progression and Treatment Resistance. *Dis. Model. Mech.* **2024**, *17*, dmm050542. https://doi.org/10.1242/dmm.050542.
109. Moorby, C.; Patel, M. Dual Functions for Connexins: Cx43 Regulates Growth Independently of Gap Junction Formation. *Exp. Cell Res.* **2001**, *271*, 238–248. https://doi.org/10.1006/excr.2001.5357.

110. Crespin, S.; Bechberger, J.; Mesnil, M.; Naus, C.C.; Sin, W.-C. The Carboxy-Terminal Tail of Connexin43 Gap Junction Protein Is Sufficient to Mediate Cytoskeleton Changes in Human Glioma Cells. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *110*, 589–597. https://doi.org/10.1002/jcb.22554.
111. Zhang, Y.-W.; Kaneda, M.; Morita, I. The Gap Junction-Independent Tumor-Suppressing Effect of Connexin 43. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44852–44856. https://doi.org/10.1074/jbc.M305072200.
112. Maqbool, R.; Rashid, R.; Ismail, R.; Niaz, S.; Chowdri, N.A.; Hussain, M.U. The Carboxy-Terminal Domain of Connexin 43 (CT-Cx43) Modulates the Expression of P53 by Altering miR-125b Expression in Low-Grade Human Breast Cancers. *Cell. Oncol.* **2015**, *38*, 443–451. https://doi.org/10.1007/s13402-015-0240-x.
113. Sun, Y.; Zhao, X.; Yao, Y.; Qi, X.; Yuan, Y.; Hu, Y. Connexin 43 Interacts with Bax to Regulate Apoptosis of Pancreatic Cancer through a Gap Junction-Independent Pathway. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 941–948. https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1524.
114. Gielen, P.R.; Aftab, Q.; Ma, N.; Chen, V.C.; Hong, X.; Lozinsky, S.; Naus, C.C.; Sin, W.C. Connexin43 Confers Temozolomide Resistance in Human Glioma Cells by Modulating the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Neuropharmacology* **2013**, *75*, 539–548. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.002.
115. Bates, D.C.; Sin, W.C.; Aftab, Q.; Naus, C.C. Connexin43 Enhances Glioma Invasion by a Mechanism Involving the Carboxy Terminus. *Glia* **2007**, *55*, 1554–1564. https://doi.org/10.1002/glia.20569.
116. Behrens, J.; Kameritsch, P.; Wallner, S.; Pohl, U.; Pogoda, K. The Carboxyl Tail of Cx43 Augments P38 Mediated Cell Migration in a Gap Junction-Independent Manner. *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 828–838. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.003.
117. Cina, C.; Maass, K.; Theis, M.; Willecke, K.; Bechberger, J.F.; Naus, C.C. Involvement of the Cytoplasmic C-Terminal Domain of Connexin43 in Neuronal Migration. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 2009–2021. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5025-08.2009.
118. Machtaler, S.; Dang-Lawson, M.; Choi, K.; Jang, C.; Naus, C.C.; Matsuuchi, L. The Gap Junction Protein Cx43 Regulates B-Lymphocyte Spreading and Adhesion. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 2611–2621. https://doi.org/10.1242/jcs.089532.
119. Grek, C.L.; Rhett, J.M.; Bruce, J.S.; Abt, M.A.; Ghatnekar, G.S.; Yeh, E.S. Targeting Connexin 43 with α–Connexin Carboxyl-Terminal (ACT1) Peptide Enhances the Activity of the Targeted Inhibitors, Tamoxifen and Lapatinib, in Breast Cancer: Clinical Implication for ACT1. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 296. https://doi.org/10.1186/s12885-015-1229-6.
120. Pridham, K.J.; Shah, F.; Hutchings, K.R.; Sheng, K.L.; Guo, S.; Liu, M.; Kanabur, P.; Lamouille, S.; Lewis, G.; Morales, M.; et al. Connexin 43 Confers Chemoresistance through Activating PI3K. *Oncogenesis* **2022**, *11*, 2. https://doi.org/10.1038/s41389-022-00378-7.
121. Sato, A.; da Fonseca, I.I.M.; Nagamine, M.K.; de Toledo, G.F.; Olio, R.; Hernandez-Blazquez, F.J.; Yano, T.; Yeh, E.S.; Dagli, M.L.Z. Effects of Alpha-Connexin Carboxyl-Terminal Peptide (aCT1) and Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) on Canine Oral Mucosal Melanoma (OMM) Cells. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 670451. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.670451.
122. da Fonseca, I.I.M.; Nagamine, M.K.; Sato, A.; Rossatto-Jr, C.A.; Yeh, E.S.; Dagli, M.L.Z. Inhibitory Effects of Alpha-Connexin Carboxyl-Terminal Peptide on Canine Mammary Epithelial Cells: A Study on Benign and Malignant Phenotypes. *Cancers* **2024**, *16*, 820. https://doi.org/10.3390/cancers16040820.
123. Gangoso, E.; Thirant, C.; Chneiweiss, H.; Medina, J.M.; Tabernero, A. A Cell-Penetrating Peptide Based on the Interaction between c-Src and Connexin43 Reverses Glioma Stem Cell Phenotype. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1023. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.560.
124. Jaraíz-Rodríguez, M.; Talaverón, R.; García-Vicente, L.; Pelaz, S.G.; Domínguez-Prieto, M.; Álvarez-Vázquez, A.; Flores-Hernández, R.; Sin, W.C.; Bechberger, J.; Medina, J.M.; et al. Connexin43 Peptide, TAT-Cx43266–283, Selectively Targets Glioma Cells, Impairs Malignant Growth, and Enhances Survival in Mouse Models in Vivo. *Neuro-Oncol.* **2020**, *22*, 493–504. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz243.
125. Pelaz, S.G.; Jaraíz-Rodríguez, M.; Álvarez-Vázquez, A.; Talaverón, R.; García-Vicente, L.; Flores-Hernández, R.; Gómez De Cedrón, M.; Tabernero, M.; Ramírez De Molina, A.; Lillo, C.; et al. Targeting Metabolic Plasticity in Glioma Stem Cells in Vitro and in Vivo through Specific Inhibition of C-Src by TAT-Cx43266-283. *eBioMedicine* **2020**, *62*, 103134. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103134.

126. He, D.; Li, H. Bifunctional Cx43 Mimic Peptide Grafted Hyaluronic Acid Hydrogels Inhibited Tumor Recurrence and Stimulated Wound Healing for Postsurgical Tumor Treatment. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 2004709. https://doi.org/10.1002/adfm.202004709.
127. Cutruzzolà, F.; Giardina, G.; Marani, M.; Macone, A.; Paiardini, A.; Rinaldo, S.; Paone, A. Glucose Metabolism in the Progression of Prostate Cancer. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 97. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00097.
128. Wallace, D.C. Mitochondria and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 685–698. https://doi.org/10.1038/nrc3365.
129. Altieri, D.C. Mitochondria on the Move: Emerging Paradigms of Organelle Trafficking in Tumour Plasticity and Metastasis. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 301–305. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.201.
130. Panov, A.; Orynbayeva, Z. Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3, DU145 and LNCaP. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72078. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072078.
131. Vikramdeo, K.S.; Sharma, A.; Anand, S.; Sudan, S.K.; Singh, S.; Singh, A.P.; Dasgupta, S. Mitochondrial Alterations in Prostate Cancer: Roles in Pathobiology and Racial Disparities. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4482. https://doi.org/10.3390/ijms24054482.
132. Fontana, F.; Anselmi, M.; Limonta, P. Unraveling the Peculiar Features of Mitochondrial Metabolism and Dynamics in Prostate Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 1192. https://doi.org/10.3390/cancers15041192.
133. Desai, S.P.; Bhatia, S.N.; Toner, M.; Irimia, D. Mitochondrial Localization and the Persistent Migration of Epithelial Cancer Cells. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 2077–2088. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.03.025.
134. Boulton, D.P.; Caino, M.C. Mitochondrial Fission and Fusion in Tumor Progression to Metastasis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 849962. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.849962.
135. Han, X.-J.; Yang, Z.-J.; Jiang, L.-P.; Wei, Y.-F.; Liao, M.-F.; Qian, Y.; Li, Y.; Huang, X.; Wang, J.-B.; Xin, H.-B.; et al. Mitochondrial Dynamics Regulates Hypoxia-Induced Migration and Antineoplastic Activity of Cisplatin in Breast Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 691–700. https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2781.
136. Seo, J.H.; Agarwal, E.; Chae, Y.C.; Lee, Y.G.; Garlick, D.S.; Storaci, A.M.; Ferrero, S.; Gaudioso, G.; Gianelli, U.; Vaira, V.; et al. Mitochondrial Fission Factor Is a Novel Myc-Dependent Regulator of Mitochondrial Permeability in Cancer. *eBioMedicine* **2019**, *48*, 353–363. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.017.
137. Caino, M.C.; Altieri, D.C. Cancer Cells Exploit Adaptive Mitochondrial Dynamics to Increase Tumor Cell Invasion. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 3242–3247. https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1084448.
138. Shimura, D.; Shaw, R.M. GJA1-20k and Mitochondrial Dynamics. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 867358. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.867358.
139. Melwani, P.K.; Pandey, B.N. Tunneling Nanotubes: The Intercellular Conduits Contributing to Cancer Pathogenesis and Its Therapy. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Rev. Cancer* **2023**, *1878*, 189028. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189028.
140. Golan, K.; Singh, A.K.; Kollet, O.; Bertagna, M.; Althoff, M.J.; Khatib-Massalha, E.; Petrovich-Kopitman, E.; Wellendorf, A.M.; Massalha, H.; Levin-Zaidman, S.; et al. Bone Marrow Regeneration Requires Mitochondrial Transfer from Donor Cx43-Expressing Hematopoietic Progenitors to Stroma. *Blood* **2020**, *136*, 2607–2619. https://doi.org/10.1182/blood.2020005399.
141. Ippolito, L.; Morandi, A.; Taddei, M.L.; Parri, M.; Comito, G.; Iscaro, A.; Raspollini, M.R.; Magherini, F.; Rapizzi, E.; Masquelier, J.; et al. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Prostate Cancer Malignancy via Metabolic Rewiring and Mitochondrial Transfer. *Oncogene* **2019**, *38*, 5339–5355. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0805-7.
142. Kretschmer, A.; Zhang, F.; Somasekharan, S.P.; Tse, C.; Leachman, L.; Gleave, A.; Li, B.; Asmaro, I.; Huang, T.; Kotula, L.; et al. Stress-Induced Tunneling Nanotubes Support Treatment Adaptation in Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7826. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44346-5.
143. Yao, Y.; Fan, X.-L.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Li, X.; Xu, Z.-B.; Fang, S.-B.; Chiu, S.; Tse, H.-F.; Lian, Q.; et al. Connexin 43-Mediated Mitochondrial Transfer of iPSC-MSCs Alleviates Asthma Inflammation. *Stem Cell Rep.* **2018**, *11*, 1120–1135. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.012.
144. Yang, J.; Liu, L.; Oda, Y.; Wada, K.; Ago, M.; Matsuda, S.; Hattori, M.; Goto, T.; Ishibashi, S.; Kawashima-Sonoyama, Y.; et al. Extracellular Vesicles and Cx43-Gap Junction Channels Are the Main Routes for

Mitochondrial Transfer from Ultra-Purified Mesenchymal Stem Cells, RECs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10294. https://doi.org/10.3390/ijms241210294.

145. Ren, D.; Zheng, P.; Zou, S.; Gong, Y.; Wang, Y.; Duan, J.; Deng, J.; Chen, H.; Feng, J.; Zhong, C.; et al. GJA1-20K Enhances Mitochondria Transfer from Astrocytes to Neurons via Cx43-TnTs After Traumatic Brain Injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2022**, *42*, 1887–1895. https://doi.org/10.1007/s10571-021-01070-x.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CONTEXTE ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

La connexine 43 (Cx43), une protéine transmembranaire codée par le gène *GJA1*, appartient à une famille multigénique de protéines capables de s'oligomériser et de former des hémicanaux permettant des échanges entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires, ainsi que des canaux intercellulaires permettant une communication intercellulaire via les jonctions GAP. Dans le cadre du développement tumoral, la Cx43 semble avoir un rôle ambivalent car elle intervient tantôt comme un suppresseur tumoral, ou comme facteur pro-tumoral. Ces effets dépendent du stade de progression tumorale considéré et sont attribués soit à des fonctions liées à l'activité canal, ou soit des activités indépendantes de la perméabilité canalaire. Ainsi le rôle de la Cx43 peut dépendre de son niveau d'expression, mais également de sa localisation subcellulaire.

Le gène *GJA1*, permet non seulement de coder pour la Cx43, mais également pour six autres isoformes tronquées dans la partie N-terminale, chacune identifiée par son poids moléculaire. Parmi celles-ci, GJA1-20k, qui a fait l'objet de rares études récentes, semble la plus abondamment exprimée de manière endogène dans les tissus examinés. Elle est issue d'une traduction alternative à partir de la méthionine en position 213 et correspond à une partie du quatrième domaine transmembranaire et à l'entièreté de la partie C-terminale. Quelques rôles ont pu lui être attribué comme celui de protéine de réponse au stress, notamment hypoxique, dans des modèles d'ischémie/reperfusion cardiaque et cérébral. Dans ces modèles physiopathologiques, GJA1-20k joue un rôle de protéine chaperonne, permettant d'augmenter l'exportation de la Cx43 totale au niveau de la membrane plasmique des disques intercalaires, grâce à un remodelage du cytosquelette et exerce un contrôle de l'activité mitochondriale grâce une régulation du nombre et de la répartition des mitochondries.

Etant donnée la signature spécifique démontrée pour la Cx43 dans le cadre des métastases osseuses, notre équipe s'intéresse au rôle pro-tumoral de cette connexine particulière dans les capacités de dissémination, de ciblage osseux et de développement métastatique des cellules cancéreuses prostatiques. Des travaux précédents ont permis de mettre en évidence *in vitro* et *in vivo*, que la présence de Cx43 au niveau de la membrane plasmique était un prérequis nécessaire pour l'effet promigratoire exercé par le microenvironnement osseux. De plus, ce microenvironnement osseux, reproduit expérimentalement par un milieu conditionné

ostéoblastique, est capable d'augmenter l'expression de la Cx43, mais également de l'isoforme GJA1-20k. A ce jour, aucun rôle spécifique de GJA1-20k dans le domaine du cancer ne lui a cependant été attribué.

Les objectifs de mon travail ont donc été d'explorer les rôles potentiels de cette isoforme dans le cadre du cancer prostatique (PCa) métastatique osseux avec pour hypothèses :

I) GJA1-20k joue-t-elle un rôle de protéine chaperonne pour la Cx43 totale comme dans les modèles cardiaques et nerveux ?

II) GJA1-20k est-t-elle capable de modifier les capacités métastatiques des cellules tumorales prostatiques ?

III) GJA1-20k joue-t-elle un rôle de protéine de réponse au stress au sein de la niche osseuse en lien notamment avec l'activité mitochondriale ?

Dans un premier temps, notre étude s'est portée sur le premier rôle identifié de GJA1-20k, à savoir, celui de protéine chaperonne. Afin de l'étudier dans le cadre du PCa, le modèle qui a été utilisé est la lignée PC-3, issue de métastase osseuse et possédant un défaut déjà caractérisé d'exportation de la Cx43 totale à la membrane plasmique (Govindarajan *et al.*, 2002; Lamiche *et al.*, 2012; Boucher, 2018) . Deux transfections stables différentes ont été réalisées afin de surexprimer cette isoforme, et de caractériser son impact sur la localisation de la Cx43 par imagerie et fractionnement subcellulaire.

Dans un second temps, l'étude portera sur la caractérisation phénotypique des cellules, et notamment leur capacité prolifératives, migratoire, invasive, l'expression des cadhérines dans le cadre de l'EMT, et leur capacité d'adhérence aux ostéoblastes. L'impact de la surexpression de GJA1-20k sur l'activité mitochondriale sera également évaluée.

Enfin, dans un troisième temps, afin de se rapprocher au mieux des conditions de la niche ostéogénique osseuse, les cellules PC-3 seront placées en condition d'hypoxie et ou de conditionnement osseux afin d'appréhender le rôle de protéine de réponse au stress de GJA1-20k.

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles cellulaires

1. Lignée cellulaire PC-3

c) Origine

La lignée cellulaire cancéreuse humaine PC-3 (prostate cancer-3) (ATCC® CRL-1435) est une lignée cellulaire dérivée de métastases osseuses d'un adénocarcinome de la prostate de grade IV, prélevé chez un patient âgé de 62 ans. Ses caractéristiques principales (localisation, caryotype, statut hormonal et tumorigénicité) sont résumées dans la table 5.

Lignée	PC-3	LNCaP
Provenance	Homme caucasien de 62 ans atteint d'un adénocarcinome prostatique de grade IV	Homme caucasien de 50 ans atteint d'un adénocarcinome prostatique métastatique
Localisation	Métastase osseuse vertébrale	Métastase au niveau du nœud lymphatique supra-claviculaire gauche
Caryotype	Triploïde	Hypotétraploïde
Sensibilité androgénique	Négative (absence d'expression d'AR et PSA)	Positive (expression AR et PSA)
Tumorigénicité in vivo	Métastases ostéolytiques après xénogreffes intratibiale, intrafémorale et intracardiaque	Métastases ostéoblastiques et ostéolytiques après xénogreffes intratibiale et intracardiaque
Références	Kaighn et al., 1979	Horoszewick et al., 1983

Table 5 : Caractéristiques principales des lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et LNCaP

d) Transfections

Un schéma récapitulatif des transfections est disponible en figure 24.

- **1ère génération : Surexpression de la Cx43**

Une première génération de cellules PC-3 surexprimant la Cx43 a été établie au laboratoire en 2008 par transfection rétrovirale. Les particules rétrovirales contenaient soit un plasmide « pMSCVpuro natif » de 6,3kb, soit le même plasmide portant la séquence d'ADNc 1,1kpb

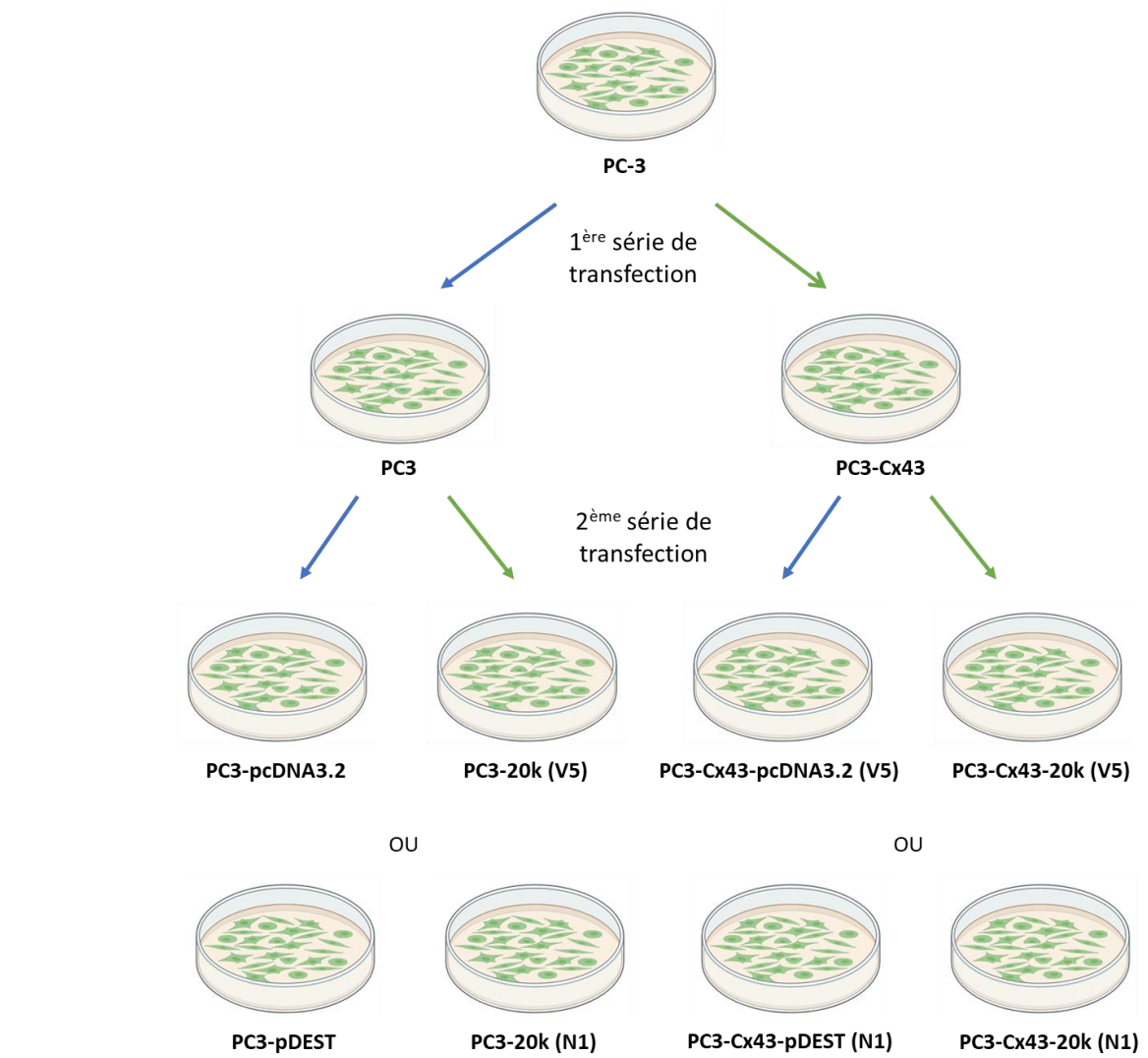
codant pour la Cx43 humaine. Cette séquence d'ADNc est placée sous le contrôle d'un promoteur viral « fort » LTR 5' (5' Long Terminal Repeat) qui permet une expression élevée de Cx43 dans les cellules transfectées. La sélection des cellules a été effectuée par ajout de puromycine à 1 µg/mL dans le milieu de culture.

Pour mes travaux de thèse, les cellules obtenues ont été désignées sous les noms suivants : PC3 (lignée contrôle) et PC3-Cx43 (lignée surexprimant la Cx43).

- **2ème génération : Surexpression de GJA1-20k**

Les cellules PC3-Cx43 obtenues précédemment ont été transfectées indépendamment avec deux plasmides : pDEST-mCherry-GJA1-20k-N1 (plasmide N1) et pcDNA3.2-GJA1-20K-V5 (plasmide V5). La transfection par lipofection a été réalisée à l'aide du réactif Fugene® (Promega), selon le protocole du fabricant, et la sélection a été effectuée par ajout de G418 (généticine) à 1,3 mg/mL dans le milieu de culture. Le plasmide pDEST-mCherry-GJA1-20k-N1 (Addgene plasmid #49861) code pour GJA1-20k et également pour les isoformes GJA1 de 11 et 7 kDa, fusionnées à la protéine fluorescente mCherry. Quant au plasmide pcDNA3.2-GJA1-20K-V5 (Addgene plasmid #49859), il ne code que pour GJA1-20k fusionné à une étiquette V5. Les contrôles de transfection ont été réalisés avec les plasmides vides correspondant (pcDNA3.2 et pDEST). Les cartes des plasmides se trouvent en figure 25.

Les lignées cellulaires issues de la transfection des cellules PC3 avec le plasmide N1 ou V5 codant pour GJA1-20k seront nommées PC3-20k (N1) et PC3-20k (V5), et les contrôles de transfection (vecteur vide) PC3-pCDNA3.2 et PC3-pDEST. Les lignées issues de la transfection des cellules PC3-Cx43 seront notées PC3-Cx43-20k (V5) et PC3-Cx43-20k (N1) et les contrôles de transfection (vecteur vide) PC3-Cx43-pCDNA3.2 (V5) et PC3-Cx43-pDEST (N1).



Cx43	Basal	Basal	Surexprimé	Surexprimé
GJA1-20k	Basal	Surexprimé	Basal	Surexprimé

Figure 24 : Récapitulation des transfections sur les PC-3

Les flèches bleues correspondent à une transfection contrôle, et les vertes correspondent à une transfection permettant soit la surexpression de GJA1-20k ou de la Cx43. Les noms des lignées s'affichent en dessous. En bas est indiqué si le niveau d'expression de la protéine est basal (issu de transfection contrôle), ou surexprimé.

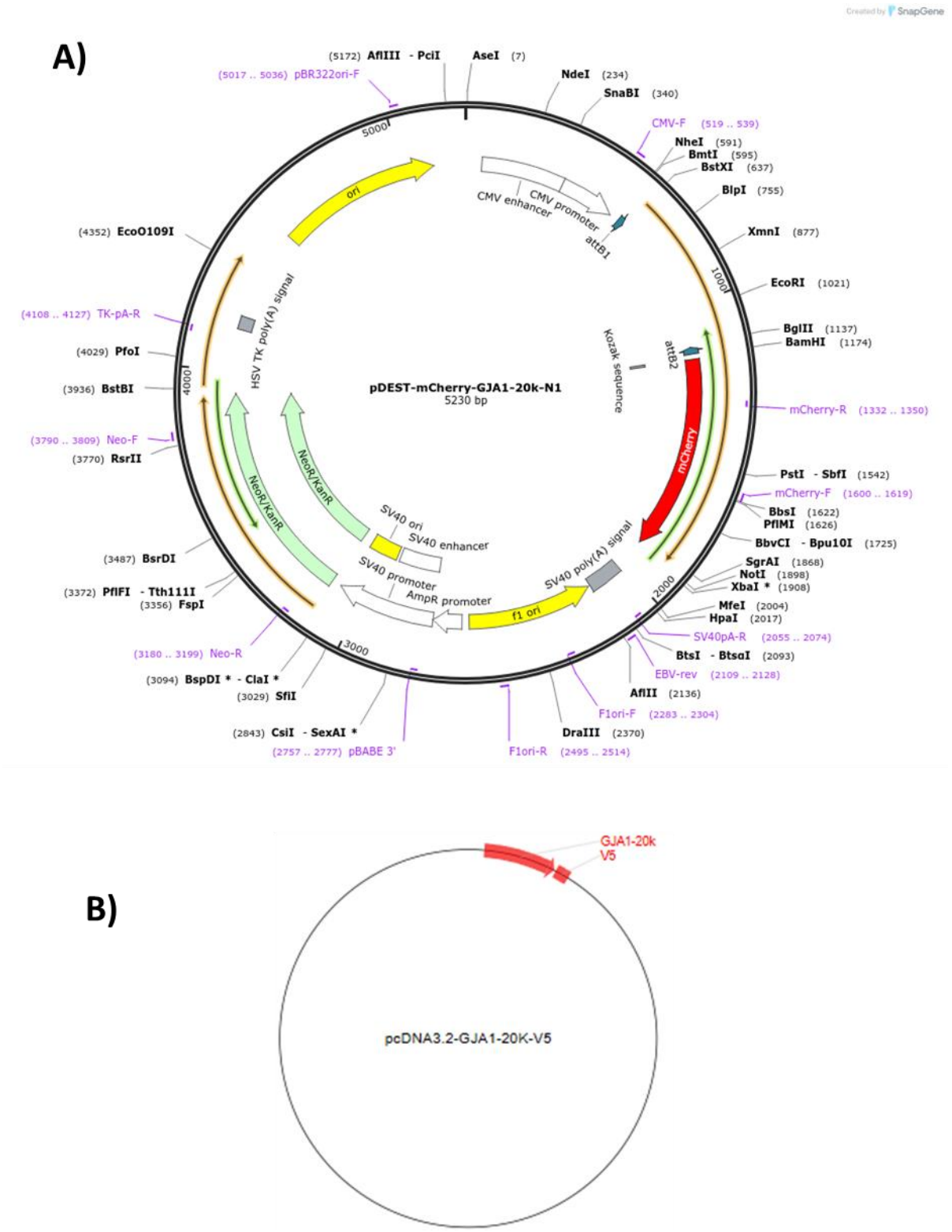


Figure 25 : Carte des plasmides utilisés pour la 2ème série de transfection (GJA1-20k)

Carte de la séquence du plasmide codant pour **A)** la protéine de fusion GJA1-20k-m-Cherry : pDEST-mCherry-GJA1-20k-N1 (#49861, Addgene), et pour **B)** la protéine de fusion pcDNA3.2-GJA1-20K-V5 (#49859, Addgene). Le second code pour le fragment C-terminal de la connexine 43 humaine en commençant à la M213, avec la M281 et M320 mutés en L, et un tag de fusion C-terminal V5.

2. Autre lignée : LNCaP

La lignée LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) (clone FGC ATCC ® CRL-1740) est une lignée cellulaire cancéreuse humaine dérivée d'une métastase ganglionnaire supraclaviculaire d'un adénocarcinome prostatique, chez un patient âgé de 50 ans. Ses caractéristiques principales (localisation, caryotype, statut hormonal et tumorigénicité) sont résumées dans la table 5.

3. Entretien

Les lignées LNCaP et PC-3 ont été cultivées dans un milieu de culture dit « complet » : composé de DMEM GlutaMAX™ (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (31966, gibco® by Life Technologies, France) contenant du rouge de phénol, du D-glucose (4,5 g/L), du pyruvate de sodium (0,1 g/L), et du GlutaMAX™ (200 mM). Ce milieu est supplémenté avec de la pénicilline à 100 UI/mL et streptomycine (100 µg/mL) (15140-122, gibco® by Life Technologies, France), ainsi qu'avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (P30-3306, PAN BIOTECH™, Allemagne). Les cellules sont cultivées en conditions stériles et incubées à 37°C en atmosphère humide, avec 5% de CO_2.

Le repiquage est effectué quand les cellules arrivent à confluence. Celles-ci sont rincées avec du milieu non-supplémenté, puis décollées à l'aide d'une solution de trypsine à 0,25% - EDTA (0,91 mM) (25200-056, gibco® by life technologies, France) après rinçage avec un milieu non-supplémenté. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout d'un volume équivalent de milieu complet. Les cellules sont récupérées, centrifugées 5 min à 300 g, puis le culot est re-suspendu dans 1 mL de milieu complet. Après comptage à l'aide d'une cellule de Malassez, les cellules sont ensemencées en fonction des besoins expérimentaux.

Lors des premiers passages, 1,5 à 3.10^6 cellules sont transférées dans des cryotubes, contenant 1 mL de milieu complet donc 10% de Dimethylsulfoxide (DMSO). Les cryotubes sont ensuite placés à -80°C pendant au moins 24h, puis transférés à -196°C pour une conservation à long terme.

4. Obtention du microenvironnement osseux

a) Culture primaire d'ostéoblastes

Les précurseurs ostéoblastiques ont été isolés à partir de cellules de calottes crâniennes (calvaria) de souriceaux Swiss âgés de 3 à 5 jours, euthanasiés par décapitation, en conditions stériles. Les calvaria, tissus non-calcifiés, ont été soumises à une série de digestion enzymatiques séquentielles, à 37°C sous agitation, afin d'obtenir une population enrichie et pure en ostéoblastes, et donc dépourvue d'ostéoclastes, fibroblastes, …

- La 1ère digestion : élimination du périoste (tissu conjonctif fibreux) et ostéoclastes

  Elle a été réalisée pendant 5 min avec une solution de trypsine 0,05% (Sigma) EDTA 0,15%, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM et Na2HPO4 3 mM, à pH 7,2, permet d'éliminer le périoste, et des cellules de type ostéoclastique présents dans le surnageant

- La 2ème digestion : élimination des fibroblastes

  Elle a été réalisée pendant 5 min avec de la collagénase de type II à 1 mg/mL (Sigma). Le surnageant contient essentiellement des éléments de la matrice osseuse non-calcifiée, des fibroblastes et des ostéoclastes

- Trois séries de digestion : élimination collagène et débris/récupération des ostéoblastes

  Trois digestions successives de 5 min avec la même solution de collagénase de type II, avec récupération des surnageants obtenus, dilués dans 1 mL de SVF pour inhiber la digestion. Ils sont ensuite regroupés, filtrés sur toile à bluter (maillage de 500 µm) afin d'éliminer les fibres de collagènes et débris.

Les ostéoblastes sont ensuite centrifugés à 300 g pendant 10 min à RT. Les ostéoblastes obtenus sont remis en suspension, dénombrés et 150.10^3 cellules sont ensuite ensemencées dans une flasque de 25 cm² à 37°C, dans un milieu dit « prolifération » : DMEM (31053, gibco® by Life Technologies, France), contenant du D-glucose (4,5 g/L), supplémenté avec 20% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et du GlutaMAX™ (200 mM).

Lorsque la confluence est atteinte (entre 3 à 5 jours), les cellules sont détachées avec un mélange trypsine/ EDTA à 0,25% pendant 5 min, centrifugées 10 min à 300 g, et resuspendues dans un

milieu de « différenciation » : composé de DMEM (31053, gibco® by Life Technologies, France), contenant du D-glucose (4,5 g/L), supplémenté avec 10% de SVF, de la pénicilline à 100 UI/mL et de la streptomycine à 100 µg/mL, du GlutaMAX™ (200 mM), et du β-glycérophosphate (10 mM) (G5422-25G, Sigma). Le β-glycérophosphate est le substrat d'une phosphatase alcaline, une enzyme clef dans le processus de différenciation des ostéoblastes.

Afin de préparer du milieu conditionné osseux (Osteoblastic-conditionned medium, ObCM), les ostéoblastes sont cultivés pendant 5 jours dans du milieu de différenciation, renouvelant le milieu au bout de 3 jours. Le surnagent est récolté, centrifugé à 300 g et à 14 000 g, puis stocké à -20°C (Boucher, 2018). La présence de certains éléments du milieu conditionné osseux « ObCM », démontrée par analyse du sécrétome est décrite dans la figure 26.

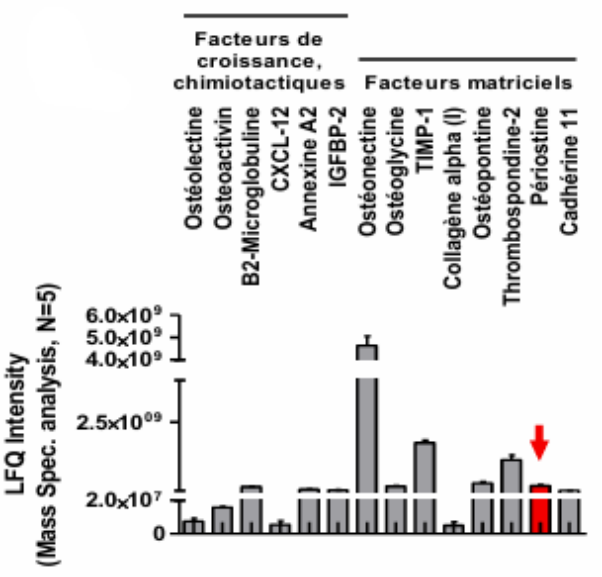


Figure 26 : Facteurs de croissance et matriciels présents dans le milieu conditionné osseux

Mise en évidence de facteurs de croissance, chimiotactiques et matriciels présents dans l'ObCM, par spectrométrie de masse LC-MSMS dans 5 échantillons indépendant de milieu conditionné osseux J5 (sans sérum). Figure issue des travaux de thèse du Docteur Jonathan Boucher (Boucher, 2018).

b) Adhérence sur Ostéoblastes

25.10^3 ostéoblastes issus de la culture primaire avant mise en contact avec le milieu de différenciation, sont déposés dans des puits de plaque 24 puits. 1 mL de milieu de prolifération est ajouté aux ostéoblastes pendant deux jours, puis ce milieu est remplacé par du milieu de différenciation pendant cinq jours. Après cinq jours de différenciation, la plaque est rincée avec

du milieu de culture sans sérum. En parallèle, des cellules PC3 ont été chargées au DiL à 10 µM dans du milieu de culture sans SVF, pendant 25 minutes, rincées, décollées et comptées. 50.10^3 cellules PC3 ont ensuite été déposé dans 1 mL de milieu sans sérum, sur les ostéoblastes. Après 2 heures d'incubation à 37°C, la plaque est rincée 4 fois, afin d'éliminer les cellules non-adhérentes, et observée au macroscope. Une image du puit en entier est effectuée, et la surface d'occupation des cellules PC3 est quantifiée.

II. Analyses protéiques

1. Extraction protéique totale

Les cellules sont ensemencées à raison de 100 à 200.10^3 cellules/puits dans une plaque de culture 6 puits (35 mm). Après 24-96h à 37°C, les plaques sont déposées sur de la glace et les cellules sont rincées deux fois avec une solution froide de Phosphate Buffered Saline (PBS) (13,7 mM NaCl, KCl 2,7 mM, 0,2 mM KH_2PO_4, 1,0 mM Na_2HPO_4, pH=7,4). Elles sont ensuite lysées avec une solution tampon de radio-immunoprécipitation (Radio-immunoprecipitation Assay, RIPA) (50 mM Tris HCl ; 15 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 0,05% NP40 ; 0,5% DOC ; 1% Triton X100 ; 0.01% SDS pH ; 7,4), contenant des inhibiteurs de protéases (4% final, cOmplete™ Mini EDTA-free, 11836170001, Roche) et de phosphatases (1% final, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, P5726, Sigma).

Les échantillons (Fraction Totale, FT) sont ensuite soniqués 3 fois 5 s puis centrifugés pendant 12 min à 12 000 g à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubles sont collectés et stockés à -20°C. La quantification des protéines est réalisée grâce au kit (DC Protein Assay, de chez Bio-Rad Laboratories Inc., Californie), basé sur une méthode de dosage colorimétrique améliorée et dérivée de la technique de Lowry et al, 1951. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 750 nm, et les concentrations protéiques sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec une gamme standard d'albumine sérique bovine (Bovin Serum Albumin, BSA).

2. Extraction protéique fractionnée

Les cellules sont ensemencées à $1x10^6$ cellules dans des boîtes de culture de 60 mm de diamètre puis incubées pendant 48 h. Un rinçage avec du milieu de culture non-supplémenté est effectué avant de décoller les cellules à l'aide d'un racloir. Les cellules récoltées sont centrifugées pendant 5 min à 300 g. Le surnageant est éliminé, le culot est resuspendu dans 1 mL de la solution de lavage fournie dans le kit Mem-PerTM Plus (89842, ThermoFisher) et est de nouveau centrifugé pendant 5 min à 300 g. Cette étape est répétée une seconde fois. Après les 2 cycles de lavage, le surnageant est éliminé et 150 µL de tampon de perméabilisation sont ajoutés au culot. L'échantillon est placé sur glace et vortexé toutes les 2 min pendant 10 min. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 15 min à 16 000 g à RT. Le surnageant, contenant les protéines issues de la fraction cytosolique (FC), est délicatement récupéré, soniqué et stocké à -20°C. Le culot est resuspendu dans 100 µL de la solution de solubilisation et incubé 30 min à 4°C sous agitation constante. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 15 min à 16 000 g à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines de la fraction membranaire (FM), est récupéré, soniqué et stocké à -20°C. La concentration protéique de chacune des fractions FC et FM est réalisée selon la même méthode que celle utilisée pour la fraction totale (FT).

3. Western-blot

Les échantillons ont été préparés de manière à avoir 50 µg de protéines totales, diluées dans du tampon de charge Laemmli 5X (300 mM Tris-HCl, 10% SDS, 25% β-mercaptoéthanol, 60% glycérol, 0,05% Bleu de Bromophénol, pH 6,8). Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 min, refroidies sur la glace puis déposées sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10% ou à 12% si la protéine d'intérêt à un poids moléculaire supérieur ou inférieur à 100 kDa respectivement. L'électrophorèse est réalisée dans du tampon de migration (25 mM Tris-base, Glycine 200 mM, 0,01% SDS 10%, qsp 1L eau MilliQ) pendant 30 min à 80V pour que les protéines se concentrent à l'interface entre les deux gels de concentration et de séparation, puis à 100V pendant 2 h. Le témoin de poids moléculaire utilisé est le PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder (26619, ThermoFisher), avec les poids moléculaires affichées allant de 10 à 250 kDa.

Une fois la migration des protéines terminée, celles-ci sont transférées sur membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF), à l'aide d'un système de transfert humide (Trans-blot BioRad), pendant 1h20 à 200 mA dans une solution de tampon de transfert 1X (25 mM Tris-base, 200 mM Glycine). La qualité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge ponceau (5 min sous agitation), suivie d'un rinçage avec du TBS-T pendant 5 min (20 mM Tris-base, 0,15 mM NaCl, 0,01% de Tween20).

Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1h30 à RT (*Room Temperature*) dans une solution de saturation TBS-T contenant 5% de lait écrémé (Régilait) ou 5% de BSA selon l'anticorps utilisé. Elles ont ensuite été incubées sous agitation toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage (Table 6 : Anticorps).

Le lendemain les membranes sont lavées six fois avec du TBS-T (solution de rinçage) pendant 5 min afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire, puis les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, GAM ou GAR-HRP, dilué au 1/2500 ou 1/5000 dans du TBS-T 5% lait, pendant 1 h à RT. Elles sont par la suite lavées avec la solution de rinçage trois fois pendant 10 min. La révélation a été réalisée par chimiluminescence grâce au kit de détection Immobilon® Forte Western blot HRP substrate (WBLUF, Millipore), et visualisée à l'aide d'un système d'imagerie Las-3000 (Fugifilm, USA). La quantification du signal est réalisée à l'aide du logiciel Image J.

Target	Source	Dilution	Application	Reference	Supplier
Connexix43 C-terminal	Mouse	1/1000, 5% BSA 1/250	Western blotting Immunostaining	#610062	BD Transduction Laboratories™
Connexin43 N-terminal clone P1E11.B19	Mouse	1/500, 5%,lait 1/75	Western blotting Immunostaining	#MABT903	Merck-Millipore
GAPDH	Mouse	1/10 000, 5% lait	Western blotting	#5G4	Hytest
Alpha Tubuline	Mouse	1/10 000, 5% lait	Western blotting	T9026	Sigma
E-cadherin	Mouse	1/1000, 5% lait 1/250	Western blotting Immunostaining	#610081	BD Transduction Laboratories™
N-cadherin	Mouse	1/1000, 5% lait 1/250	Western blotting Immunostaining	#610920	BD Transduction Laboratories™
TOM20	Mouse Ig2a	1/250	Immunostaining	sc-17764	Santa cruz
Axl (C89E7)	Rabbit	1/1000, 5% BSA	Western blotting	#8861	Cell signaling
Ki-67	Rabbit	1/200	Immunostaining	Ab-16667	Abcam
Cadherin-11	Mouse	1/1500, 5% lait 1/250	Western blotting Immunostaining	#321700	Life technology
Flotillin-1	Rabbit	1/250	Immunostaining	ab133497	Abcam
p21	Mouse	1/1000, 5% lait	Western blotting	Sc-6246	Santa cruz
eIF4E	Rabbit	1/1000	Western blotting	HY-80118	MCE
p-el4FE	Rabbit	1/1000	Western blotting	HY-80812	MCE
Beta-caténine	Mouse	1/2000, 5% lait	Western blotting	Sc-59737	Santa cruz
mTOR	Mouse	1/1000, 5% lait	Western blotting	Sc-517464	Santa cruz
DAPI	---	1/1000	Immunostaining	32670	Sigma
HIF1alpha	Rabbit	1/1000	Western blotting	Ab2185	Abcam
GAM Ig1, 2a et 2b	Goat	1/5000	Western blotting	107005, 108005 et 109005	Southern Biotech
GAM-HRP	Goat	1/2500 - 1/5000, 5% lait	Western blotting	A0168	Sigma
GAR-HRP	Goat	1/2500 - 1/5000, 5% lait	Western blotting	A0545	Sigma
GAM-488, Alexa Fluor	Goat	1/250	Immunostaining	A11029	Invitrogen
GAM-568, Alexa Fluor	Goat	1/250	Immunostaining	A11011	Invitrogen

Table 6 : Anticorps utilisés

4. Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre (diamètre 12 mm) déposées dans des puits d'une plaque 24 puits, à une densité comprise entre 25.10^3 et 1.10^5 cellules/puits dans 500 µL de milieu complet. Après une incubation de 24 à 96 h selon la protéine ciblée et la confluence souhaitée, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X froid. La fixation des cellules est réalisée avec du méthanol glacé pendant 9 min, suivie de deux rinçages au PBS 1X triton X100 à 0,1% afin de perméabiliser les cellules. Celles-ci sont ensuite incubées pendant 1h à RT dans une solution de blocage PBS 1X triton X100 0,1%, BSA 2%. Les lamelles sont alors récupérées et placées sur une goutte (18 µL) déposée préalablement sur du parafilm et qui contient l'anticorps dilué au 1/50 à 1/250 dans la solution de saturation. Les lamelles sont incubées toute la nuit à 4°C.

Le lendemain, les lamelles sont rincées deux fois avec du PBS 1X avant d'être redéposées sur une goutte contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/250 dans la solution de saturation, pendant 1h à RT à l'obscurité. Pour les anticorps, se référer à la table 6. Après deux nouveaux rinçages, les noyaux des cellules sont marqués avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000 dans du PBS 1X) pendant 15 min à RT à l'obscurité. Enfin, après deux derniers rinçages effectués au PBS 1X, les lamelles sont montées sur des lames en verre avec du milieu de montage Mowiol. Les observations ont été réalisées au microscope confocal (Olympus FV3000). L'analyse des images et la quantification des signaux ont été effectuées avec ImageJ/Fiji. Des contrôles négatifs (sans anticorps primaire et/ou secondaire) ont été systématiquement réalisés.

5. Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'extraction et les RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées comme précédemment (Clarhaut *et al.*, 2009).
Amorce pour la Cx43 humaine : F : 5'-GCTGGTGGTGTCCTTGGTGTC-3' et R : 5'-CAGGAGGAGACATAGGCGAGAGG-3' ; et la GAPDH : 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' et R : 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'.

III. Etude de la fonctionnalité

L'activité fonctionnelle de la Cx43 a été évaluée à l'aide de deux approches complémentaires, le test d'incorporation du Lucifer Yellow pour mesurer l'activité hémicanal et le test du parachute pour évaluer l'activité canalaire intercellulaire.

1. Hémicanaux : Test d'incorporation du Lucifer Yellow

La fonctionnalité des hémicanaux de la Cx43 a été évaluée par le test d'incorporation du Lucifer Yellow (LY), basé sur la capacité du colorant à pénétrer dans les cellules via des hémicanaux ouverts. L'ouverture des hémicanaux a été induite par la déplétion en calcium du milieu extracellulaire (Lopez *et al.*, 2016).

Des cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 14.10^3 cellules/puits dans du milieu complet. Après 48 h de culture, les puits sont rincés avec l'une des solutions suivantes :

- Solution A (avec Ca^{2+}) : 142 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 25 mM D-glucose, pH 7,35.
- Solution B (sans Ca^{2+}) : 142 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES, 25 mM D-glucose, pH 7,35.

Puis les cellules ont été incubées pendant 25 min à 37°C dans l'une des conditions suivantes (Verselis and Srinivas, 2013) :

- Solution A (contrôle basal, les hémicanaux sont fermés)
- Solution B (déplétion en Ca^{2+})
- Solution B + Lucifer Yellow (0,25 mg/mL)
- Solution B + LY + acide flufénamique (FFA) (100 µM, inhibiteur des hémicanaux, concentration non cytotoxique)

Après incubation, les cellules ont été rincées avec la solution A pour stopper l'incorporation du colorant, puis immédiatement observées au macroscope MVX100 (Olympus) afin d'évaluer qualitativement par fluorescence l'incorporation du LY (Figure 27A).

2. Canaux : Test du parachute

Le test du parachute (de précharge) permet d'évaluer la communication intercellulaire et donc de mesurer la fonctionnalité des canaux. Deux populations cellulaires sont ensemencées : des « cellules receveuses » ensemencées dans des plaques 6 puits et des « cellules donneuses » ensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 6 cm). Après 48 h, les cellules donneuses sont rincées deux fois avec du PBS 1X et chargées 20 min à 37°C avec une sonde fluorescente lipophile vybrant DiL (traceur membranaire, 10 µM) et de la calcéine-AM (traceur cytoplasmique diffusible, 5 µM). Elles sont ensuite rincées, détachées avec de la trypsine 0,25%, centrifugées pendant 10 min à 200 g et comptées. 3000 cellules donneuses sont déposées (parachutées) sur les cellules receveuses non-marquées. Après 7 h de co-culture, les cellules sont observées au microscope confocal Olympus, à l'objectif x40, à immersion. Les cellules donneuses apparaissent jaunes (DiI rouge + calcéine verte), tandis que les cellules receveuses fluorescentes en vert traduisent un transfert de calcéine via les jonctions gap (Figure 27B).

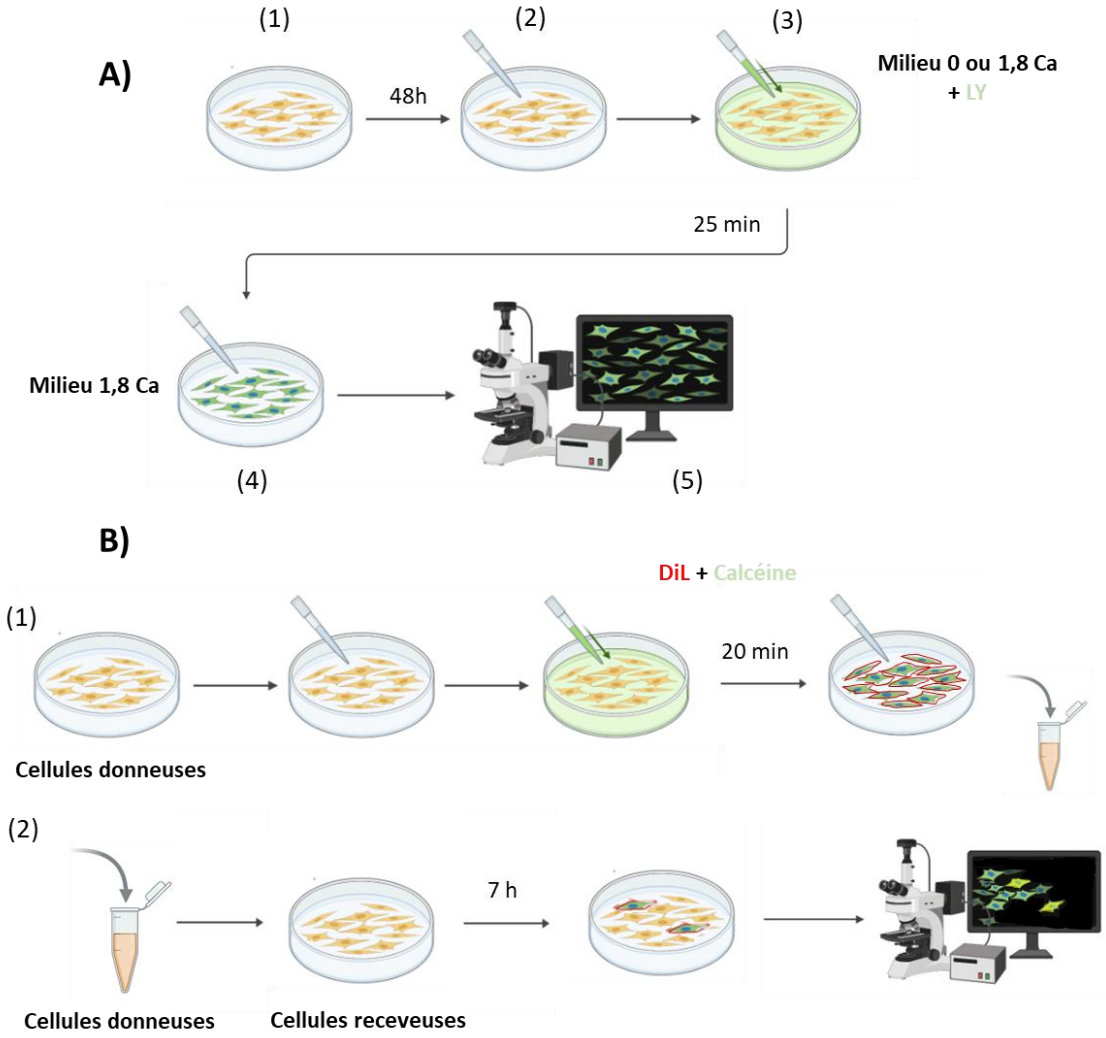


Figure 27 : schéma récapitulatif des tests de fonctionnalité

A) Test du Lucifer Yellow : (1) Les cellules sont ensemencées à faible densité pendant 48h. (2) Elles sont ensuite rincées avec du milieu calcique ou non suivant le plan de plaque. (3) Le milieu est chargé en Lucifer Yellow (LY), en présence de calcium ou non. Le LY, un traceur diffusible peut pénétrer les cellules ayant des connexons ouverts. (4) Les cellules sont rincées avec du milieu calcique, afin de fermer les hémicanaux. (5) Observation des cellules au microscope confocal. **B)** Test de parachute : Deux jeux de cellules sont ensemencés pendant 48h. (1) Le premier jeu de cellules est rincé, puis le milieu est chargé avec de la calcéine-AM (5 µM) et du DiL (10µM, marqueur membranaire rouge). Les cellules sont ensuite rincées, décollées, et (2) parachutées sur un tapis cellulaire non-marqué, les cellules receveuses. Au bout de 7 h, la répartition de fluorescence dans les cellules est observée au microscope confocal.

IV. Etude du phénotype cancéreux

1. Migration collective

L'étude de la migration collective a été réalisé à l'aide d'un test de blessure (*wound healing assay*) sur un tapis cellulaire confluent. Des cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 250.10^3 cellules /puits dans 3 mL de milieu de culture complet. Après trois jours d'incubation, les cellules à confluence sont traitées avec de la mitomycine (10 µg/mL) pendant 1h30 dans du milieu de culture sans SVF, afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Une blessure linéaire est alors effectuée avec un cône jaune (cône de 20-200 µL) sur le tapis cellulaire. Le puits est rincé avec du milieu de différenciation afin de retirer les débris cellulaires. Les cellules sont ensuite incubées dans du milieu complet, de différenciation ou de l'ObCM. Des images ont été acquises à T0, 8 et 12 h post-blessure au microscope optique (objectif x40), afin de suivre la fermeture de la blessure au cours du temps. L'aire non recouverte par les cellules a été mesurée à chaque temps à l'aide du logiciel ImageJ, et le pourcentage de recouvrement a été calculé par rapport à la surface initiale mesurée à T0.

2. Invasion

L'étude des capacités invasives des cellules a été réalisée à l'aide d'un test de chambre de Boyden modifiée, utilisant des inserts recouverts de Matrigel® afin de reproduire une barrière extracellulaire.

Les cellules tumorales ont été ensemencées dans des inserts de porosité 8 µm, préalablement recouvert de Matrigel (25 µL dilué au 1:10), à raison de 50.10^3 cellules (ou 20.10^3 en condition co-culture avec des ostéoblastes) dans 200 µL de milieu de culture sans SVF. Les inserts sont ensuite placés dans des puits d'une plaque 24 puits contenant soit des ostéoblastes à 5 jours de différenciation, soit 800 µL de milieu conditionné osseux ObCM, ou soit 800 µL de milieu de différenciation (contrôle si utilisation de l'ObCM). Après 17 h, les cellules restantes sur la face supérieure de l'insert sont retirées grâce à un coton-tige, et seules les cellules invasives présentes sur la face inférieure de l'insert sont fixées au méthanol glacé pendant 9 min, puis marquées au DAPI pendant 10 min. Les filtres sont alors découpés et montés entre lame et lamelle dans du milieu de montage Mowiol. L'observation a été réalisée au macroscope MVX100 (Olympus) à l'aide du logiciel CellSens Dimension et le nombre de noyaux marqués au DAPI a été comptabilisé afin de quantifier les cellules invasives.

3. Prolifération /viabilité cellulaire

a) Etude de la prolifération

L'étude de la prolifération cellulaire a été réalisée à l'aide d'un test basé sur l'incorporation du bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue synthétique de la thymidine incorporé dans l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire. Cette incorporation a été détectée par immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-BrdU.

Pour cela, 4.10^3 cellules/puits sont ensemencées dans des plaques 96 puits à fond noir (655086, Greiner) et incubées 48 h avec 100 µL de milieu complet. 10 µL de solution de BrdU ont été ajoutés dans chaque puits (10 µM final), puis les cellules sont incubées pendant 4 h à 37°C. Le milieu a ensuite été retiré par aspiration, 200 µL de solution de fixation ont été ajoutés à chaque puits et laissés incuber à RT pendant 30 min pour fixer les cellules. La solution a été alors retirée par retournement de la plaque pour vider les puits, puis 100 µL d'anticorps anti-BrdU couplés à la peroxydase (anti-BrdU-POD) sont ajoutés et incubés à RT pendant 1h30. Après trois lavages successifs au PBS 1X (2 min chacun), 100 µL de solution de substrat ont été ajoutés dans chaque puits et incubés à l'obscurité pendant 3 min. La lecture du résultat a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Mithras permettant de quantifier la lumière émis lors de la réaction enzymatique à 405 nm.

b) Viabilité cellulaire

L'évaluation de la viabilité cellulaire a été réalisée à l'aide du test XTT, un test colorimétrique basé sur la réduction du sel de tétrazolium (XTT) en cristaux de formazan par les enzymes mitochondriales des cellules métaboliquement actives.

Pour cela, 4.10^3 cellules sont ensemencées dans des puits d'une plaque 96 puits, dans 100 µL de milieu culture complet, ou autres, selon les besoins de expérimentaux. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24 à 96 h, à 37°C. Des puits « contrôle », sans cellules, ont également été préparés sur la plaque.
Le jour de l'observation, il est ensuite ajouté de 25 µL du kit XTT Cell Proliferation kit II (11465015001, Roche) suivant les recommandations du fournisseur. 4 h plus tard, l'absorbance est lue à 490 nm au spectrophotomètre Mithras.

Un comptage post-XTT a été réalisé suivant les besoins expérimentaux. Après aspiration du milieu, 75 µL de trypsine/EDTA sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 10 min. Enfin, 25 µL de milieu complet et 25 µL de bleu trypan ont été ajoutés, puis les cellules ont été dénombrées grâce à une cellule de Malassez.

c) Apoptose

175.10^3 cellules sont ensemencées et incubées pendant 48 h à 37°C, avec ou sans staurosporine à 0,2 µg/mL, une molécule activant la voie apoptotique intrinsèque. Les cellules sont ensuite rincées avec 2 mL de PBS 1X, avant d'être décollées à l'aide d'une solution de Versene préalablement préchauffées à 37°C, pendant 30 min à 37°C. S'ensuit deux centrifugations de 5 min à 300 g, entrecoupées d'une étape de rinçage avec 2 mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite marquées avec de l'anti-annexinV-FITC et de l'iodure de propidium, suivant les recommandations du kit (556547, BD pharmigen), pendant 15 min à 37°C. L'analyse cytométrique s'effectue ensuite au FACS-Verse (Boucher, 2018).

4. Anoïkis

La survie à l'anoïkis, étape clef de la cascade métastatique, a été étudiée à l'aide d'un système empêchant l'adhérence cellulaire par recouvrement de la surface des puits de culture avec du poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PolyHEMA). Ce polymère forme une couche non adhésive, forçant ainsi les cellules à croître en suspension.

a) Viabilité

Les puits d'une plaque 12 puits ont été préalablement recouvert avec 200 µL par puits de solution de PolyHEMA (poly(2-hydroxyéthyl-méthacrylate), soluble dans l'éthanol (120 mg/mL, 10nM final), la nuit, à 37°C, sous atmosphère sèche, afin empêcher les cellules d'adhérer. Le lendemain, 1 mL de milieu complet contenant 55.10^3 cellules a été déposé dans chaque puits de la plaque. 6 jours plus tard (J6), les cellules sont récoltées et culottées pendant 30 min. Le milieu est délicatement prélevé et déposé dans un autre tube. 200 µL de ce tube sont prélevés pour resuspendre le culot cellulaire correspondant. L'ensemble est alors prélevé et déposé dans un puits d'une plaque 96 puits. Un test XTT est ensuite réalisé comme

précédemment décrit, et des comptages par coloration au bleu trypan sont réalisés dans les puits, afin de déterminer le pourcentage de cellules viables à J6.

b) Taille des sphères

En parallèle, le diamètre maximal et la surface d'occupation des sphères qui se forment sont étudiés. Pour cela, 25.10^3 cellules sont ensemencées dans des puits de plaque 24 puits contenant du milieu de culture complet, et préalablement recouverts de PolyHEMA. Après 6 jours de culture, le diamètre maximal de chaque sphère est mesuré au microscope optique (grossissement x40). De plus, une image complète du puits a été acquise au macroscope (grossissement ×1) afin de déterminer la surface totale occupée par les sphères et d'en calculer le pourcentage d'occupation par rapport à la surface totale du puits.

5. Capacité de résistance aux stress cellulaires

a) Le stress hypoxique

L'hypoxie, condition fréquemment rencontrée par les cellules cancéreuses au cours du développement tumoral, a été reproduite au laboratoire à l'aide d'une chambre à hypoxie (HypoxyLab, Oxford Optronix). Le taux d'oxygène a été fixé à 1% par remplacement de l'O_2 par de l'azote, tandis que le taux de CO_2 a été maintenu à 5% et la température d'incubation à 37°C.

Pour la préparation d'extraits protéiques, les cellules sont ensemencées à raison de 200.10^3 cellules/puits dans des plaque 6 puits avec 2 mL de milieu complet pour des incubations de 24 et 48 h et 3 mL pour des incubations de 72 et 96 h, afin de compenser l'assèchement lié à l'atmosphère de la chambre à hypoxie. Après incubation, les cellules sont lysées sur glace avec 50 µL de tampon de lyse pour 24 h de culture, puis 25 µL supplémentaires ont été ajoutés par tranche de 24 h afin de garantir une concentration minimale de 2 µg/µL en protéines.

b) Le stress oxydatif

Le stress oxydatif a été évalué par la quantification de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'aide de la sonde fluorescente carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (carboxy-DCFDA, Sigma, réf. 21884). 20.10^3 cellules/puits sont ensemencées dans des plaques 96 puits à fond noir plat et incubées à 37°C pendant 48 h. Après deux rinçages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées dans 100 µL de milieu sans sérum contenant 10 µM de carboxy-DCFDA pendant 1 h à 37°C à l'obscurité. Les puits sont de nouveau rincés avec du PBS 1X et les cellules sont lysées dans du tampon RIPA. La fluorescence est mesurée immédiatement à l'aide d'un spectrophotomètre Mithras, avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm.

V. Etude du réseau mitochondrial

1. Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale a été évaluée à l'aide d'un test d'incorporation du Tétraméthylrhodamine éthyl ester (TMRE), un colorant cationique fluorescent lipophile. Ce marqueur traverse les membranes cellulaires et s'accumule spécifiquement dans les mitochondries actives, proportionnellement à leur potentiel membranaire mitochondrial. Ainsi, plus le potentiel mitochondrial est élevé, plus le signal fluorescent du TMRE est intense, reflétant l'activité mitochondriale (Antigny *et al.*, 2009).

25.10^3 cellules ont été ensemencées dans des boîtes de 35 mm de diamètre et incubées pendant 48 h dans 1 mL de milieu complet. Après deux rinçages avec la solution KREBS 1,8ca (142 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl2, 1,2 mM KH2PO4, 1,2 mM MgSO4, 11,7 mM Glucose et 25 mM NaHCO3), les cellules sont incubées dans une solution de 990 µL de KREPS 1.8ca avec 10 µL de TMRE (10 nM final), pendant 5 min à RT dans l'obscurité. Si nécessaire, 1 µL de Hoechst est ajouté pour visualiser les noyaux. Finalement, deux rinçages sont effectués avec la solution KREPS 1.8ca et l'analyse s'effectue immédiatement après, par acquisition en Z (pas de 0,3) du signal TMRE au microscope confocal Olympus. Un empilement d'images (*stacking*) est réalisé et l'intensité de fluorescence est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

2. Quantité de mitochondries

a) *ADN mitochondrial*

L'ADN mitochondrial a été extrait à partir de $2x10^6$ cellules cultivées pendant 2 jours dans du milieu complet, puis détachées, centrifugées, rincées 2 x avec du PBS 1X stérile avant d'être stockées sous forme de culot sec à -80°C. L'extraction a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fabriquant. Le nombre de copies d'ADN mitochondrial a ensuite été quantifié par qPCR, grâce au système de PCR en temps réel CFX Touch (Bio-Rad), en utilisant des amorces spécifiques des gènes mitochondriaux ND1 et MT-ND4, ainsi que des gènes nucléaires de référence GAPDH et B2M (β2-microglobuline) (Desquiret-Dumas *et al.*, 2017).

b) *Quantification de TOM20*

La protéine TOM20, localisée dans la membrane externe des mitochondries, a été utilisée comme marqueur de la masse mitochondriale, sa quantité étant corrélée au nombre de mitochondries.

25.10^3 cellules ont été ensemencés sur une lamelle en verre placée dans un puits d'une plaque 24 puits, puis incubées à 37°C en normoxie, en hypoxie, et en présence ou non d'ObCM. Une immunofluorescence a ensuite été réalisée selon le protocole décrit précédemment, suivie d'une acquisition d'images en Z au microscope confocal afin de permettre la quantification du signal avec le logiciel ImageJ/FiJi.

Deux approches ont été utilisées pour l'analyse des images. La première consistait à détourer l'ensemble de chaque cellule afin de mesurer le signal total par cellule. La seconde reposait sur une macro (Figure 28) permettant de créer un masque centré sur le noyau et de quantifier la fluorescence de part et d'autre de celui-ci, selon une épaisseur de ligne définie (ici 10 UI). Cette méthode génère un profil de distribution du signal, exporté sous Excel pour calculer la répartition en deux zones : périnucléaire et périphérique. Les valeurs obtenues pour chaque zone ont été additionnées afin de déterminer ensuite le pourcentage de signal TOM20 spécifique dans les régions périphériques et périnucléaires.

```
1  //travailler avec les séries Z en format oir
2  // double click sur Line et choisir épaisseur
3
4  roiManager("reset");
5  run("Clear Results");
6  close("\\Others");
7
8  run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
9  imgtitle=getTitle();
10 run("Split Channels");
11
12 //selection image des noyaux
13 selectWindow("C1-"+imgtitle);
14 setAutoThreshold("Li dark");
15 run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity show=Masks exclude include add");
16
17 selectWindow("C2-"+imgtitle);
18 setBackgroundColor(0, 0, 0);
19
20 for (i = 0; i < roiManager("count"); i++) {
21 roiManager("select", i);
22 run("Clear", "slice");
23 }
24
25 // definition des lignes
26 roiManager("reset");
27 selectWindow("C2-"+imgtitle);
28 setTool("line");
29
```

Figure 28 : Macro ImageJ pour la quantification de signaux en Z avec masque des noyaux

Ce script de macro ImageJ permet de quantifier un signal sur une zone que l'on définit par un rectangle passant par le noyau. Un masque est appliqué sur le noyau, permettant de s'affranchir du signal nucléaire, et de pouvoir quantifier la répartition d'un signal suivant un axe. Réalisée par le Dr Anne Cantereau-Becq pour ce projet.

3. Etude de la fonction mitochondriale

a) Technique du Seahorse

La technique du Seahorse permet de mesurer en temps réel deux paramètres clefs du métabolisme cellulaire, grâce au Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies) :

- Le taux de consommation d'oxygène (*Oxygen Comsumption Rate ;* OCR) qui est un indicateur de la respiration mitochondriale (exprimé en pmoles 02/min) ;
- Le taux d'acidification du milieu (*Extracellular Acidification Rate ;* ECAR) qui est un indicateur de l'activité glycolytique (exprimé en mpH/min)

Les cellules cancéreuses PC-3, surexprimant ou non GJA1-20k, sont ensemencées dans des plaques spéciales Seahorse (seahorse XF24 V7 microplate) à raison de 10.10^3 cellules/puits. Le lendemain, le milieu de culture est retiré et remplacé par du milieu DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) contenant 2 mM de L-glutamine, 10 mM de D-glucose et 1 mM de pyruvate. Les cellules sont incubées 1 h à 37°C puis les inhibiteurs suivants sont ajoutés séquentiellement dans chaque puits :

- 1,5 µM d'oligomycine pour inhiber l'ATP synthase (Complexe V de la chaîne respiratoire) et induire une diminution de l'OCR permettant de quantifier la respiration liée à la production d'ATP ;
- 2 µM de carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), un agent découplant qui va dissiper le gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne mitochondriale, court-circuitant ainsi la force proton-motrice nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Cela va entraîner une augmentation de la consommation d'oxygène (OCR), reflétant la respiration découplée maximale. Cette étape permet de déterminer la capacité respiratoire maximale des mitochondries.
- 0,5 µM de roténone et 0,5 µM d'antimycine A pour inhiber respectivement les complexes I et III et permettre de mesurer la respiration non-mitochondriale.

Ces injections permettent de calculer plusieurs paramètres bioénergétiques : respiration basale, respiration liée à l'ATP, capacité maximale, capacité de réserve, ainsi que le profil énergétique global (OXPHOS vs glycolyse).

b) Oxygraphie

La respiration mitochondriale a été mesurée sur des cellules perméabilisées à la digitonine à l'aide d'un oxygraphe équipé d'une l'électrode de Clark (Strathkelvin Instruments), équipé d'une chambre thermostatique à agitation magnétique contenant un tampon de respiration (2,77 mM CaK_2-éthylèneglycol-tétracétique (EGTA), 7,23 mM K_2EGTA, 1,38 mM $MgCl_2$, 3 mM K_2HPO_4, 20 mM taurine, 0,5 mM dithiothréitol (DTT), 90 mM méthanesulfonate de potassium, 10 mM méthanesulfonate de sodium, 20 mM imidazole, 2 mg/mL de BSA), ajusté à pH 7,1, et maintenu à 27°C. $2{,}4.10^6$ cellules ont été directement perméabilisées dans la chambre d'oxygraphie avec 15 µg/mL de digitonine afin de pouvoir mesurer les capacités respiratoires totales. Après 15 minutes de perméabilisation, la consommation d'oxygène a été enregistrée en temps réel suite à l'addition séquentielle des substrats suivants : 1 mM pyruvate, 4 mM malate, 2 mM ADP, 15 mM succinate et 0,99 mM N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)-ascorbate. Les données sont exprimées en nmoles O2/min/10^6 cellules.

Chaque substrat permet d'explorer des étapes spécifiques de la chaîne respiratoire mitochondriale :

- Le pyruvate est converti en Acétyl-CoA qui va alimenter le cycle de Krebs.
- Le malate contribue également au cycle de Krebs en permettant la production de NADH utilisé par le complexe I de la chaîne respiratoire.
- L'ADP stimule la phosphorylation oxydative et donc la production d'ATP, ce qui a pour conséquence d'augmenter la consommation d'oxygène.
- Le succinate est un substrat du complexe II, la succinate déshydrogénase, qui va produire du FADH2.
- Le TMPD, réduit par l'ascorbate, transfert ses électrons directement au complexe IV (cytochrome c), ce qui permet de stimuler spécifiquement le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc de mesurer la capacité fonctionnelle maximale du complexe IV.

La figure 29 résume où agissent les différentes molécules utilisées pour ces deux techniques.

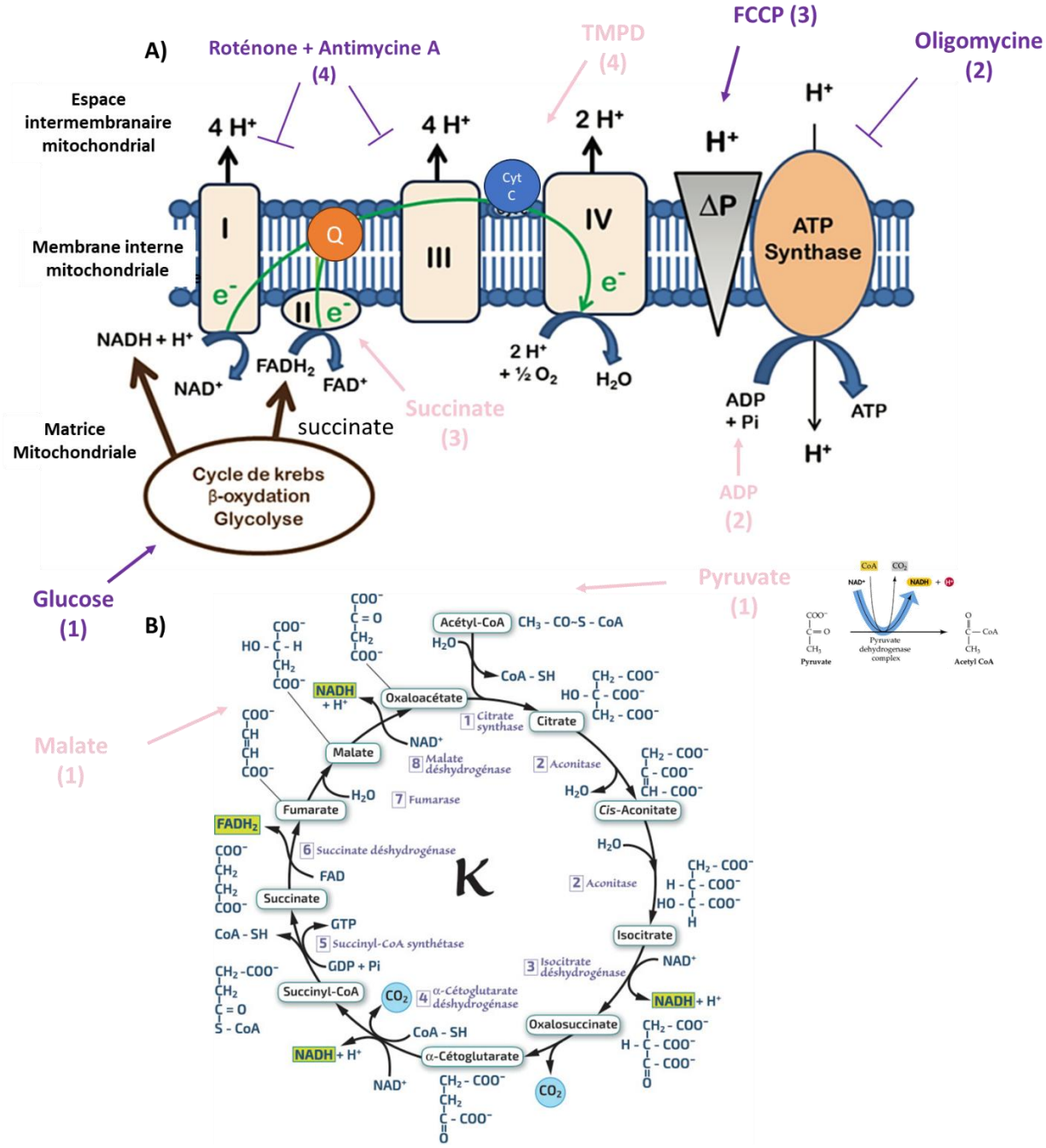


Figure 29 : Chaîne respiratoire mitochondriale et du cycle de Krebs

A) Schéma de la respiration cellulaire (phosphorylation oxydative) avec ses différents complexes. **B)** Schéma du cycle de Krebs (de l'acide citrique).
- complexe I : NADH déshydrogénase = NADH-coenzyme Q oxydoréductase
- complexe II : succinate déshydrogénase = succinate-coenzyme Q oxydoréductase
- complexe III : coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase
- complexe IV : cytochrome c oxydase

Les éléments de couleur violette indiquent où agissent les molécules ajoutées lors d'une expérience de Seahorse ; et en rose pour l'oxygraphie. Les nombres entre parenthèse indiquent l'ordre d'ajout des molécules.

c) *Analyse des milieux de culture*

Afin de compléter les données obtenues par Seahorse et de confirmer les effets observés sur l'acidification du milieu et l'activité glycolytique, des dosages intra- et extracellulaires de lactate, glucose et bicarbonate ont été réalisés. Pour cela, 1.10^6 cellules ont été ensemencés dans des boîtes de culture (diamètre 100 mm) contenant 10 mL du milieu complet. Après 24 et 48 h d'incubation, 1 mL de milieu est récolté afin de déterminer les concentrations de glucose (g/L), d'ion bicarbonate HCO3- (mmol/L) et de lactate (mmol/L). Les cellules sont décolllées, centrifugées et comptées, afin d'établir un culot sec de 1.10^6 pour les dosages en intracellulaire. Une mesure du pH des milieux restants est également effectuée.
Les trois kits utilisés selon les recommandations des fabricants sont GLUC3 (Glucose HK Gen.3), LACT2 (Lactate Gen.2) et CO2-L (Bicarbonate Liquid) de chez COBAS®.
L'ATP a également été mesuré à 24 et 48 h, grâce au kit ATPlite luminescence, sur plaque 96 puits à fond noir et plat, où 10.10^3 cellules sont ensemencées dans 100 µL de milieu complet.

VI. Etude de l'état de quiescence des cellules

1. Quantification du Ki67

Le Ki67 est une protéine nucléaire exprimée exclusivement dans les cellules en phase active du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), mais absente en phase G0. Elle constitue ainsi un marqueur de prolifération cellulaire.

Une analyse par immunofluorescence est réalisée afin de détecter les cellules exprimant le Ki67 ($Ki67^+$) par rapport aux cellules $Ki67^-$, qui ne présentent pas de signal nucléaire et sont considérées comme quiescentes. Comme précédemment, les cellules cancéreuses PC-3, surexprimant ou non GJA1-20k, sont fixées avec du méthanol. Mais, une étape de démasquage au citrate de sodium (10 mM) est effectuée, pendant 20 min à 95°C, afin de restaurer l'accessibilité du site antigénique. Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X froid, saturées avec une solution de blocage (PBS 1X ; Triton 0,5% ; BSA 1% ; *Donkey* Sérum 3%) pendant 2 h, et enfin incubées la nuit avec un anticorps primaire dirigé contre le Ki67. La suite est identique au protocole du II-4). Les noyaux sont contre-colorés avec du DAPI afin de visualiser

l'ensemble des cellules. L'analyse est effectuée par microscopie confocale et le pourcentage de cellules Ki67$^+$ est calculé sur au moins 10 champs aléatoires par condition expérimentale.

2. Cytométrie en flux

Afin de déterminer la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, des expériences de cytométrie en flux sont réalisées après coloration au 7AAD (7-Aminoactinomycine D), s'intercalant dans les ADN bicaténaires, et la pyronine-Y, colorant cationique qui intercale l'ARN.

Après un temps défini de culture, les cellules sont rincées avec du milieu de culture sans SVF, puis 3 mL de trypsine sont ajoutés pendant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite stoppée par l'ajout d'un volume équivalent de milieu de culture complet. Après rinçage, les cellules sont récupérées, puis centrifugées pendant 5 min à 300 g. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 500 µL de PBS 1X, pour un nouveau cycle de centrifugation de 5 min à 300 g. Le culot est resuspendu dans 400 µL de PBS 1X. Goutte à goutte sont ajoutés 4,6 mL d'éthanol à 70° à RT, tout en vortexant le tube. Les cellules sont ensuite placées à -20°C pendant 20 min pour fixer et perméabiliser les cellules. Trois centrifugations de 15 min à 4000 g à 4°C, sont entrecoupées deux lavages du culot cellulaire avec 2 mL de PBS, pour finalement le resuspendre dans 500 µL de PBS 1X. 100 µL de cette suspension cellulaire sont mis de côté afin de servir de contrôles non-marqués, auxquels on ajoute 400 µL de PBS 1X. 400 µL de la suspension cellulaire sont ensuite prélevés, où est ajouté successivement du 7-AAD à 10µg/mL final (ATT Bioquest, ref AAT-17501) pendant 5 min, puis de la pyronine-Y (MCE, ref HY-D0971) à 4 µg/mL final pendant 15 min. Enfin, 200 µL de PBS1X sont ajoutés, avant analyse au FACS Verse, afin de déterminer les différentes phases du cycle cellulaire.

VII. Etude du calcium

1. Analyse des oscillations calciques

Pour étudier l'activité calcique intracellulaire, 50.10^3 cellules sont ensemencées dans des boîtes à fond verre (diamètre 20 mm) dans du milieu complet. 48h plus tard, les cellules sont rincées deux fois avec la solution A contenant du calcium (voir section III-1)), puis incubées pendant 20 min à 37°C avec 1 mL de solution A contenant 3 µM de Fluo4-AM, un indicateur fluorescent du calcium intracellulaire (F14201, invitrogen). Les cellules sont ensuite rincées deux fois, soit avec la solution A (contenant 1,8 mM calcium), soit avec la solution B (sans calcium). Ensuite, 1 mL de solution A ou B sont ajoutés dans chaque boîte pour la mesure des oscillations calciques. L'acquisition est réalisée pendant 15 min à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé au logiciel Axiovision, permettant de suivre en temps réel les variations de fluorescence liées aux flux calciques.

Dans une seconde série d'expériences, afin de tester l'implication des récepteurs à l'inositol triphosphate (IP_3R), les oscillations calciques sont analysées selon le même protocole, mais en présence de Xestospongine C (XeC, ab120914, Abcam), un inhibiteur sélectif de ces récepteurs. Après 5 min d'acquisition, la XeC est ajoutée à une concentration finale de 7 µM, afin d'évaluer l'impact de l'inhibition des IP_3R sur la libération de calcium dans le cytosol. La XeC bloque l'ouverture des IP_3R, empêchant ainsi la sortie de calcium du réticulum endoplasmique. L'analyse se poursuit pendant 5 min supplémentaires après l'ajout de XeC, puis encore 5 min pour observer un éventuel retour des oscillations. Le nombre de pics calciques est quantifié avant et après l'ajout de XeC, permettant une comparaison directe de l'activité calcique dépendante des IP_3R.

VIII. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism (version 8.0.2) et les données exprimées en moyenne de N expériences (*Mean*) ± l'erreur standard (SD). Afin de pouvoir appliquer ces tests statistiques, les expériences ont au moins été réalisées en N=3. Les tests réalisés sont par exemple des paramétriques et non-paramétriques : t-test et Wilcoxon-Mann-Whitney, des analyses de la variance (one way ANOVA (*ANalysis Of Variance) ou two way ANOVA*) suivi de test post-HOC comme Bonferroni, ... Les données ont été considérées statistiquement significatives pour une valeur de $p< 0,05$ (*). Les significativités allant de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,01$ (***) à $p < 0,001$; « ns » signifiant que les jeux de données ne sont significativement pas différents.

RÉSULTATS

I. Validation des modèles de surexpression de GJA1-20k

1. Validation protéique

La lignée cellulaire sur laquelle repose ce travail est la lignée PC-3, dérivée d'un adénocarcinome de grade IV du cancer de la prostate, et isolée à partir d'une métastase osseuse. Cette lignée cellulaire couramment utilisée, correspond à un modèle de cellules particulièrement agressives, contrairement à d'autres lignées comme les cellules LNCaP, dérivée d'une métastase ganglionnaire.

La lignée PC3-Cx43, surexprimant de manière stable la Cx43, et la lignée contrôle PC3 (transfectée avec le plasmide vide) ont été caractérisées dans le cadre des travaux de thèse de Coralie Lamiche et de Jonathan Boucher menés ultérieurement au laboratoire (Lamiche *et al.*, 2012; Boucher, 2018). La lignée PC3-Cx43 correspond à une population totale non-clonale, présentant une augmentation d'environ trois fois du niveau d'expression protéique de Cx43 par rapport à la lignée contrôle, sans modification d'expression des Cx26 et 32. Une légère augmentation de l'expression de l'isoforme GJA1-20k est également observée dans les PC3-Cx43. Il est important de souligner que, quel que soit son niveau d'expression, la Cx43 demeure majoritairement dans le cytoplasme de ces cellules.

Dans le cadre de cette thèse, afin d'étudier le rôle propre de GJA1-20k, une seconde série de transfection dans les cellules de la lignée PC3 contrôle pour surexprimer stablement cette isoforme a été réalisée en utilisant deux plasmides distincts appelés pcDNA3.2-GJA1-20K-V5 et pDEST-mcherry-GJA1-20k-N1. Le premier plasmide code uniquement pour l'isoforme GJA1-20k, tandis que le second code pour GJA1-20k, mais également pour les isoformes GJA1-7k et GJA1-11k. Cela a permis d'obtenir deux nouvelles lignées cellulaires nommées PC3-20k (V5) et PC3-20k (N1) ainsi que les deux lignées contrôles respectives : PC3-pcDNA3.2 (V5) et PC3-pDEST (N1).

L'analyse par Western blot, réalisée sur des fractions protéiques totales, révèlent une augmentation significative de 3,3 fois du niveau de GJA1-20k dans les cellules PC3-20k (V5)

par rapport aux cellules contrôles correspondantes, PC3-pcDNA3.2 (V5). De manière similaire, une augmentation d'expression de GJA1-20k d'environ 3 fois est observée dans les cellules PC3-20k (N1) comparées aux cellules contrôles PC3-pDEST (N1) (Figure 30A). Les trois lignées contrôles, PC3, PC3-pcDNA3.2 (V5) et pDEST (N1), expriment des taux de GJA1-20k comparables, confirmant que l'augmentation d'expression de GJA1-20k observée résulte bien de la transfection de la séquence codante correspondante. Il faut noter que la protéine GJA1-20k surexprimée est une protéine de fusion dont la masse moléculaire varie selon le plasmide utilisé. Ainsi, pour les PC3-20k (V5), la protéine de fusion a un poids moléculaire de 21,4 kDa résultant du poids moléculaire de GJA1-20k (20 kDa) et de l'étiquette (tag) V5 (1,4 kDa). Pour les cellules PC3-20k (N1), le poids moléculaire de la protéine de fusion est de 48 kDa, correspondant au poids moléculaire de GJA1-20k (20 kDa) et de la protéine fluorescente m-cherry (28 kDa).

Par ailleurs, les résultats obtenus par Western blot ne montrent pas l'expression des isoformes GJA1-7k et GJA1-11k (fusionnées à la m-cherry et attendues à 35 et 39 kDa respectivement). Ces résultats indiquent que, dans les conditions expérimentales étudiées, ces isoformes, bien que théoriquement exprimables suite à la transfection avec le plasmide N1, ne sont pas produites, ne sont pas stables ou ne sont pas détectables.

Enfin, l'analyse du taux de Cx43 totale (*full-lenght*-Cx43, FL-Cx43) montre une expression stable dans l'ensemble des cinq lignées étudiées (Figure 30B), indiquant que la surexpression de GJA1-20k n'affecte pas le niveau global de Cx43.

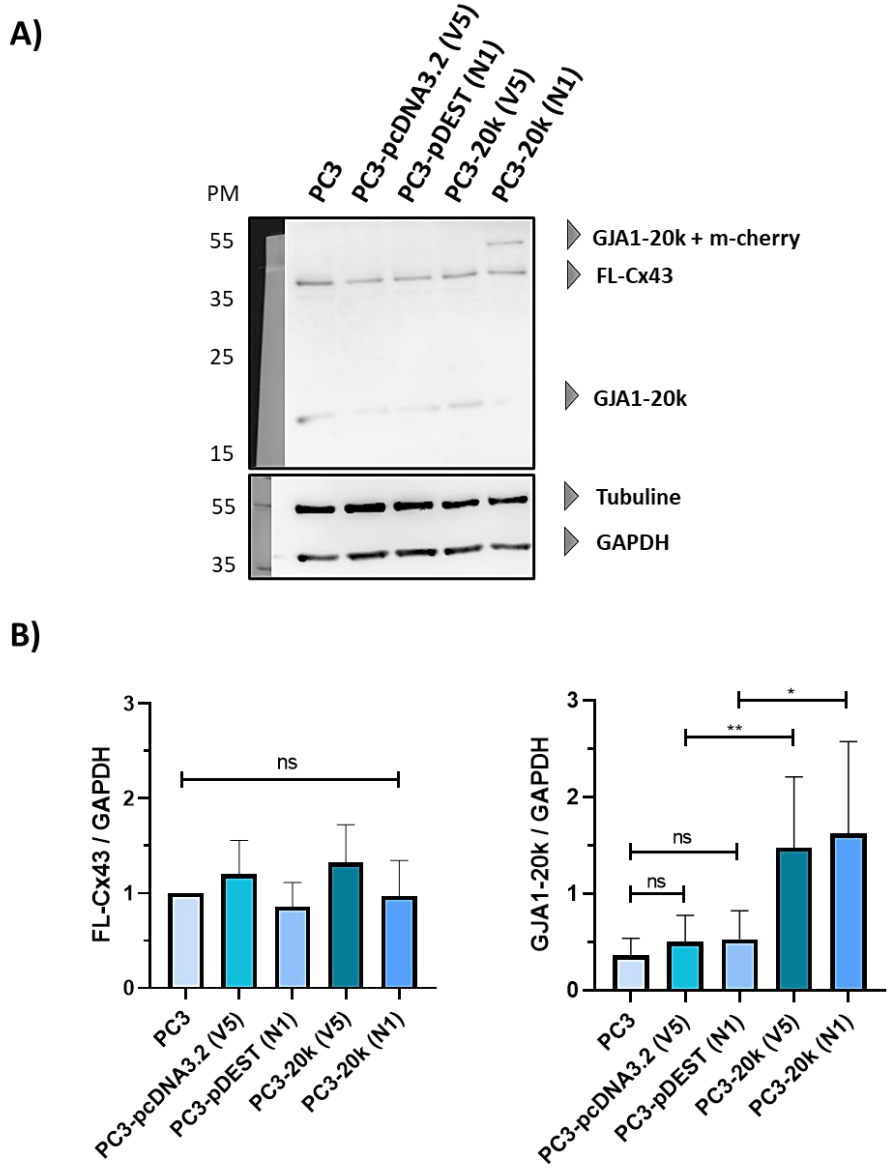


Figure 30 : Validation des modèles de surexpression de GJA1-20k

A) Western blot représentatif montrant l'expression, de Cx43 (43 kDa), de GJA1-20k (20 kDa) et de la protéine de fusion GJA1-20k/m-cherry (48 kDa) dans les cellules contrôles (PC3, PC3-pcDNA3.2 et PC3-pDEST) et les cellules surexprimant GJA1-20k (PC3-20k (N1) et (V5)). **B)** Quantification du niveau d'expression de GJA1-20k et de Cx43, normalisé sur la GAPDH et rapportée à l'expression de Cx43 dans les PC3 (fixée à 1). La Tubuline et la GAPDH ont été utilisées comme contrôle des dépôts. Les données représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes (N = 4). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

La localisation de Cx43 a été évaluée par plusieurs approches complémentaires, dont les résultats se sont révélés concordantes. Ainsi, des Westerns blots ont été réalisés à partir de fractions subcellulaires (Figure 31), permettant de séparer la fraction membranaire (FM, incluant toutes les membranes) et la fraction cytosolique (FC). Les résultats montrent un enrichissement de la présence de la Cx43 de 46% pour les PC3-20k (V5) et de 44% pour les PC3-20k (N1) dans la fraction membranaire par rapport à leurs contrôles respectifs. L'efficacité du fractionnement a été vérifiée par la distribution de marqueurs spécifiques dans ces différentes fractions. La présence de E-cadhérine, protéine localisée dans la membrane plasmique, est détectée exclusivement dans la FM, confirmant l'absence de contamination de la FC par la FM. De la même façon, la GAPDH et la tubuline, présentes dans le cytoplasme, se retrouvent majoritairement dans la FC. La tubuline n'est pas détectée dans la FM (Figure 31B) alors qu'une petite proportion de GAPDH est retrouvée dans la FM (d'où l'utilisation de la tubuline comme contrôle complémentaire).

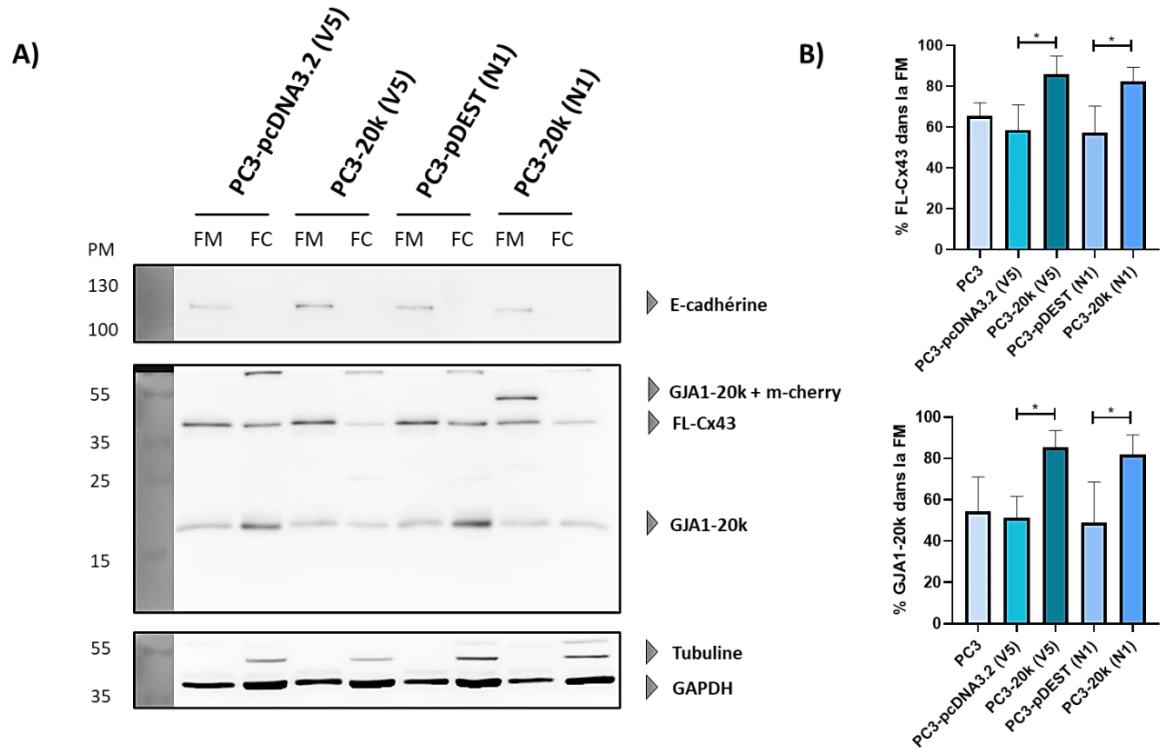


Figure 31 : La surexpression de GJA1-20k induit une localisation membranaire de la Cx43

A) Image représentative de Westerns blot de Cx43 réalisés à partir d'extraits protéiques de cellules PC-3 surexprimant ou non GJA1-20k fractionnés en deux : fraction membranaire (FM) et cytosolique (FC). **B)** Analyse du pourcentage de Cx43 totale et de GJA1-20k dans la fraction membranaire (FM). L'expression de la E-cadhérine a été utilisée comme contrôle de la FM, celles de la GAPDH et de la tubuline comme contrôles pour la FC. Un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de Cx43. Les données représentent la moyenne ± écart type de 5 expériences indépendantes (N = 5). * $p<0,05$.

Cette augmentation de la localisation membranaire de la Cx43 a été confirmée par un immunomarquage utilisant un anticorps dirigé contre la partie N-terminale qui ne met en évidence que la forme totale de la Cx43. Une immunofluorescence punctiforme caractéristique des connexines est observée au niveau membranaire dans les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k, alors qu'elle reste majoritairement cytoplasmique dans les cellules contrôles (Figure 32).

Ces résultats indiquent que la surexpression de GJA1-20k dans les cellules métastatiques PC3 favorise une redistribution de la Cx43 vers la membrane plasmique.

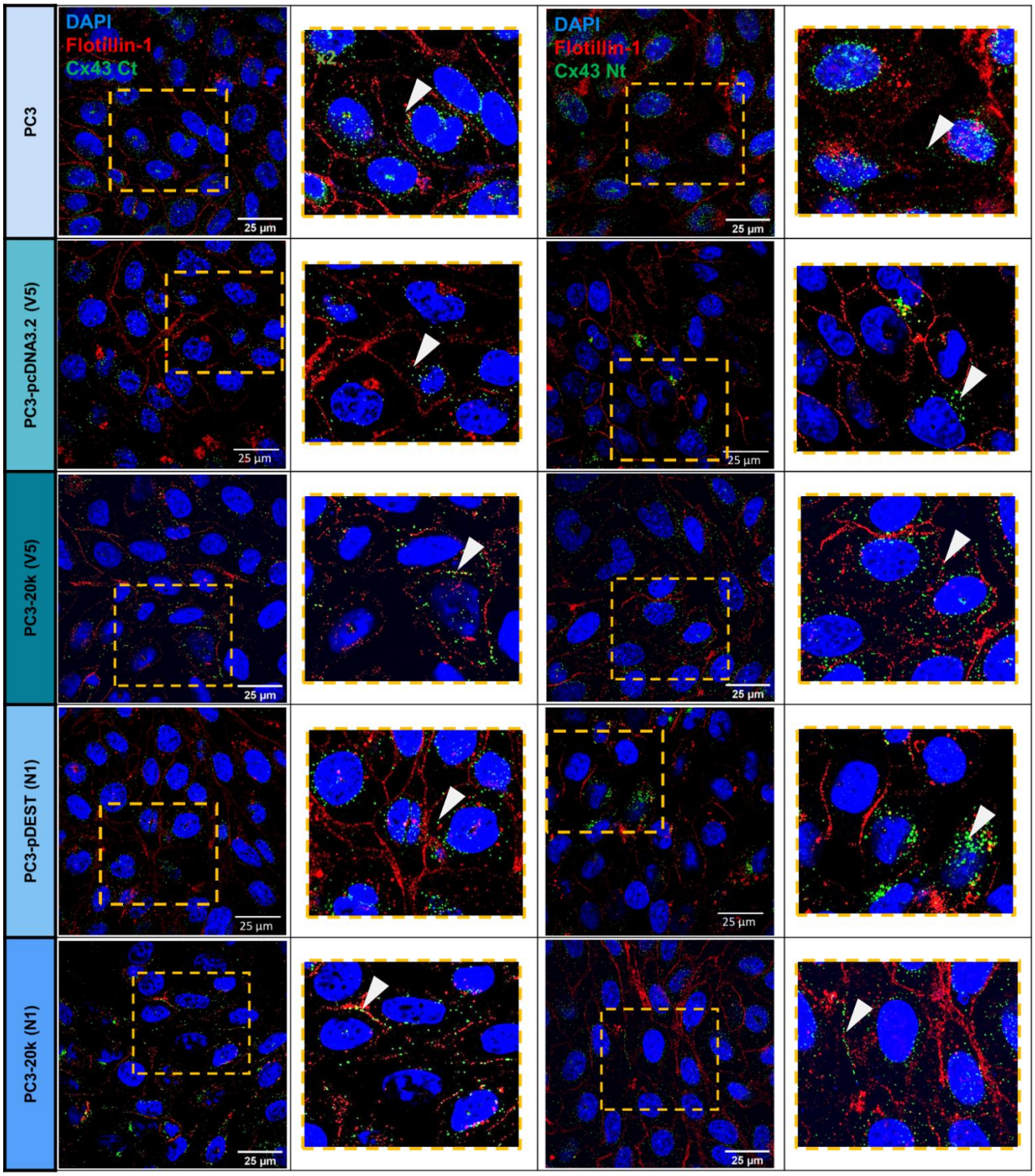


Figure 32 : La surexpression de GJA1-20k induit une localisation membranaire de la Cx43

C) Images représentatives des immunomarquages de la Cx43 (visualisée en vert, tête de flêche) dans les cellules PC-3 surexprimant ou non GJA1-20k obtenues à l'aide d'anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale (gauche) et N-terminale (droite). La flotilline-1, marqueur de la membrane plasmique, est détectée en rouge et les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). (N = 3, duplicat).

2. Validation fonctionnelle

Afin de valider l'effet fonctionnel de la surexpression de GJA1-20k sur l'activité de la Cx43 membranaire dans les cellules PC3, deux types d'expériences ont été menés : des mesures de diffusion de molécules fluorescentes i) entre les cellules pour évaluer la communication intercellulaire directe via les jonctions GAP et ii) entre le milieu extracellulaire et les cellules via les hémicanaux (Figure 33 et 34).

La communication intercellulaire par jonction GAP (CIJC) a été évaluée à l'aide du test de précharge (également appelé test du « parachute »), basé sur le transfert de calcéine (662 kDa) entre cellules. Ainsi, des cellules donneuses, préchargées en calcéine, sont déposées sur un tapis de cellules receveuses et le transfert de la molécule fluorescente est quantifié (voir Matériel et Méthodes). Les cellules surexprimant GJA1-20k présentent un taux de couplage quatre fois supérieur à celui des cellules contrôles, passant de 10 à 40% de cellules couplées dans les cellules PC3-20k (Figure 33).

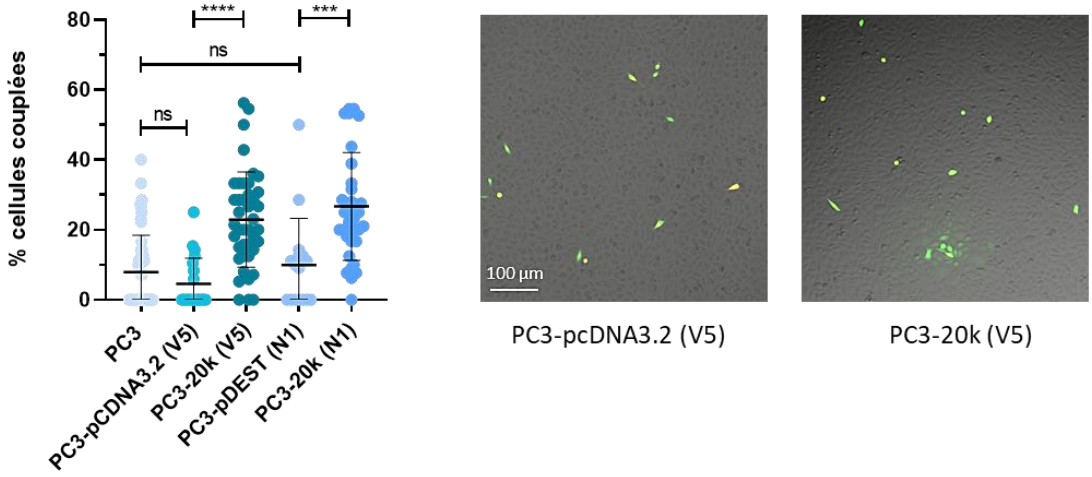


Figure 33 : La surexpression de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des canaux jonctionnels des cellules métastatiques prostatiques

A) Quantification du pourcentage de cellules couplées évalué par le test de parachute, réalisé 7h après le dépôt des cellules donneuses (moyenne ± SD ; N = 3). A droite : Images représentatives illustrant la diffusion de la calcéine (verte) dans le tapis cellulaire à partir des cellules donneuses (jaune). *** $p<0,001$ à **** $p<0,0001$.

L'activité des hémicanaux a été mesurée à l'aide du test d'incorporation du Lucifer Yellow (LY), un traceur fluorescent capable de pénétrer les cellules présentant des hémicanaux ouverts dans un milieu dépourvu de calcium. Comme précédemment, les cellules surexprimant GJA1-20k présentent un pourcentage de cellules fluorescentes quatre fois supérieur à celui des cellules contrôles, passant de 1 à 4% (Figure 34).

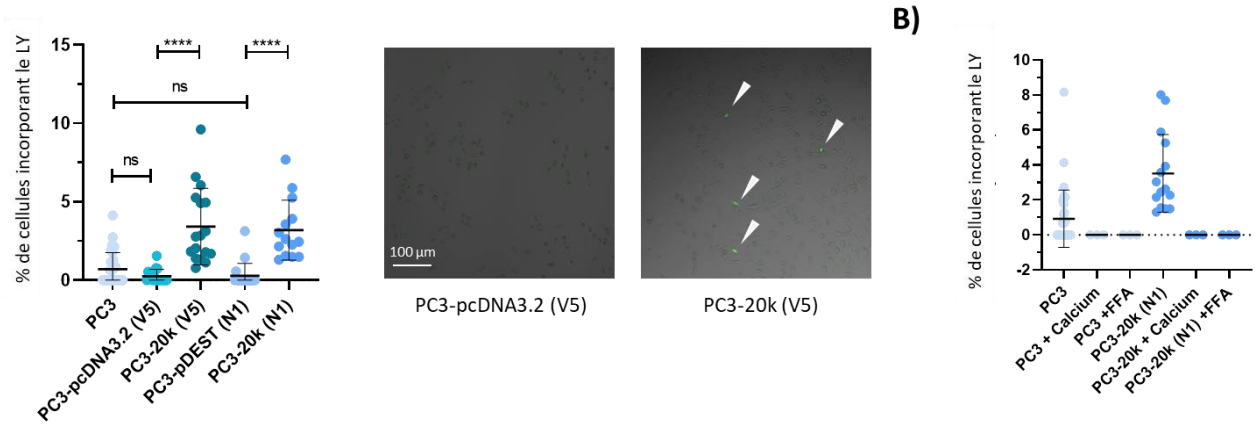


Figure 34 : La surexpression de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des hémicanaux des cellules métastatiques prostatiques

A) Quantification du nombre de cellules ayant capté le Lucifer Yellow (LY) (gauche), accompagnée d'images représentatives des cellules PC3-20k (V5) fluorescentes (flèches blanches) par rapport aux cellules contrôles. **B)** Contrôles montrant l'absence de captation du LY en présence de calcium extracellulaire ou de l'inhibiteur des hémicanaux FFA, validant la spécificité du test (moyenne ± SD ; N = 3). *** p<0,001, **** p<0,0001.

La spécificité de l'activité hémicanal a été confirmée par deux approches : l'utilisation à 100 µM d'acide flufénamique (FFA), un inhibiteur pharmacologique des hémicanaux, et l'utilisation d'un milieu contenant 2 mM de $CaCl_2$ qui va induire la fermeture des hémicanaux. Dans ces deux conditions, l'incorporation de LY par les cellules tumorales prostatiques est totalement bloquée (Figure 34B).

L'ensemble de ces résultats démontrent que la surexpression de GJA1-20k dans les cellules PC3 métastatiques favorise non seulement une relocalisation membranaire de la Cx43, mais également une restauration fonctionnelle de ses propriétés de canal, tant au niveau des jonctions intercellulaires que des hémicanaux.

II. Caractérisation phénotypique des modèles de surexpression de GJA1-20k

1. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la viabilité et la prolifération cellulaire

L'impact de la surexpression de GJA1-20k sur la viabilité et les capacités prolifératives des cellules PC-3 a été évalué à l'aide du test XTT à différents temps (24, 48, 72 et 96 heures), complété par un comptage cellulaire manuel, et par un test d'incorporation de BrdU réalisé à 72 h (Figure 35).

Le test XTT reposant sur la conversion du sel tétrazolium XTT en un produit coloré soluble (formazan) par les enzymes mitochondriales actives, permet d'estimer la viabilité et l'activité métabolique des cellules par simple mesure d'absorbance à 490 nm. L'intensité de cette absorbance est proportionnelle au nombre de cellules viables et donc, indirectement à la prolifération. Dans nos conditions expérimentales, la surexpression de GJA1-20k a entrainé une diminution progressive de l'absorbance au cours du temps, atteignant une baisse d'environ 20 % à 72 h (Figure 33A et B). Cette baisse est corrélée à une diminution de 15 % du nombre total de cellules comptabilisées à 72 h, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles. (Figure 35B).

Parallèlement, le test d'incorporation de la BrdU, reposant sur la capacité de cet analogue de la thymidine à s'intégrer dans l'ADN des cellules en phase S, a révélé une diminution de 36 % de la prolifération cellulaire à 72 h dans les deux modèles de surexpression de GJA1-20k, comparativement à leurs témoins (Figure 35C).

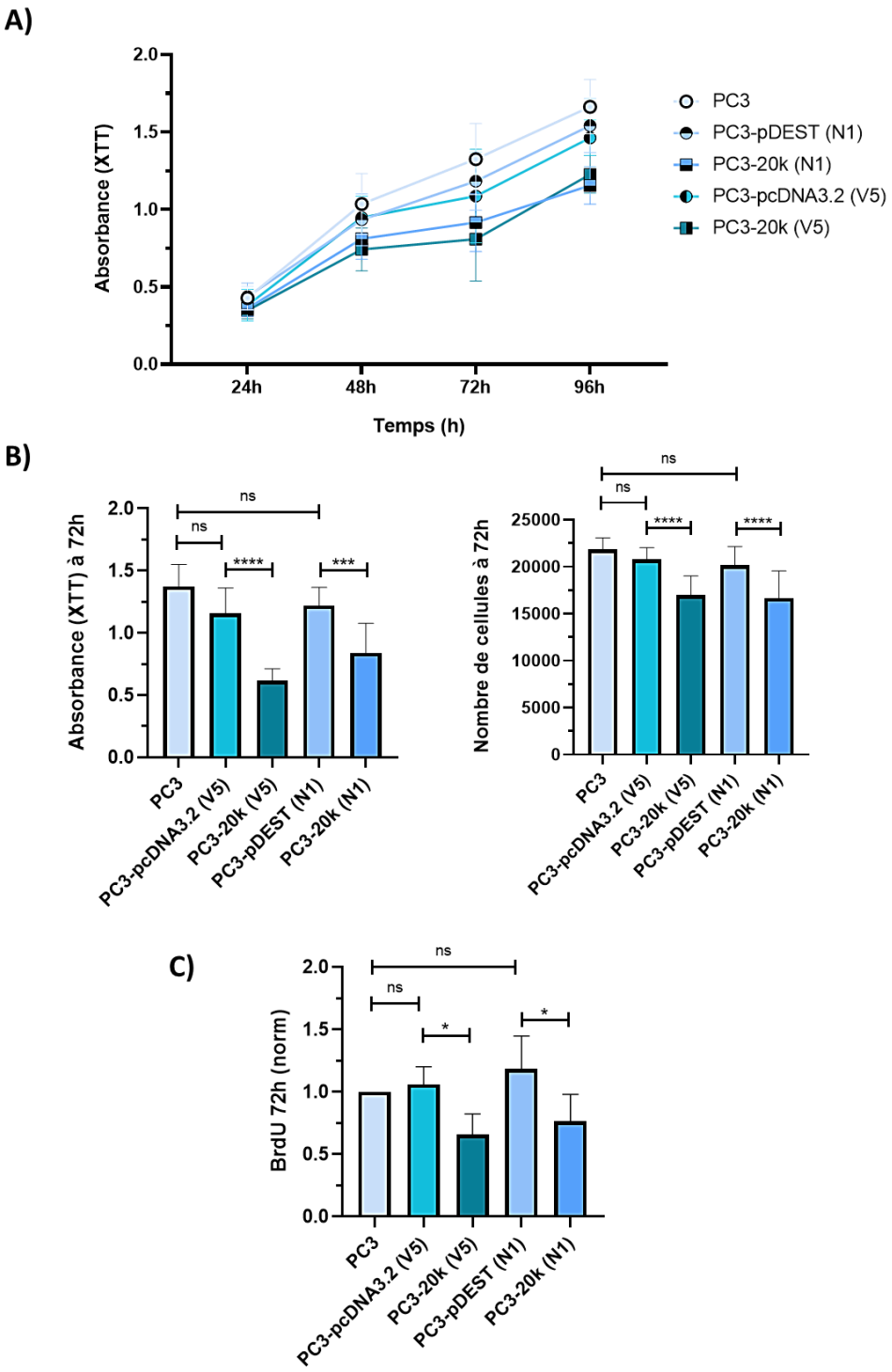


Figure 35 : La surexpression de GJA1-20k diminue la prolifération des cellules métastatiques prostatiques

A) Evolution de la viabilité cellulaire au cours du temps de culture (24 à 96 h) des cellules surexprimant GJA1-20k ou non, mesurée par le test XTT (moyenne ± SD ; N = 3). B) Histogramme représentant l'absorbance mesurée (gauche) et le nombre de cellules par puits correspondant après 72 h de culture (droite) pour chacune des lignées (moyenne ± SD ; N=3, en triplicats). C) Taux de prolifération cellulaire évalué par le test d'incorporation de la BrdU après 72 h de culture pour chacune des lignées (moyenne ± SD ; N = 4, en triplicats). * $p<0,05$ à **** $p<0,0001$.

Concernant l'effet sur l'apoptose, les résultats obtenus montrent une diminution du pourcentage de cellules apoptotiques total de 50 %, par rapport à l'apoptose mesurée en conditions basales. Bien que réduit, cet effet anti-apoptotique reste présent en condition d'apoptose induite par la staurosporine à 0,2 µg/µL (Figure 36).

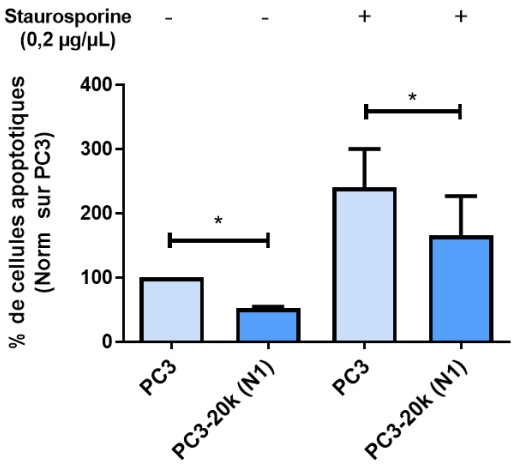


Figure 36 : La surexpression de GJA1-20k augmente la résistance à l'apoptose des cellules prostatiques métastatiques

Pourcentage de cellules PC3 et PC3-20k (N1) Annexine V-positives en conditions basales ou après traitement avec 0,2 µg/µL de staurosporine pendant 48 h. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules apoptotiques normalisé par rapport à l'apoptose basale des cellules PC3 (moyenne ± SD ; N = 3). * $p<0,05$.

L'ensemble de ces résultats indique que la surexpression stable de GJA1-20k dans les cellules PC3 métastatiques s'accompagne d'une inhibition significative de la prolifération cellulaire au cours du temps, et d'une résistance des cellules face à l'apoptose.

2. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la transition épithélio-mésenchymateuses des cellules cancéreuses prostatiques

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus clé de la cascade métastatique qui implique notamment une modification de l'état de différenciation des cellules tumorales. Ce processus se caractérise notamment par une baisse de l'expression des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, et une augmentation des marqueurs mésenchymateux, comme la N-cadhérine ou la vimentine, conférant aux cellules des propriétés migratoires et invasives accrues.

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de GJA1-20k sur cette transition, des extraits protéiques ont été préparés à différents temps de culture (de 24 à 96 h) et analysés par Western blot pour mesurer les niveaux d'E-cadhérine et de N-cadhérine (Figure 37). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. Une quantification du rapport E/N-cadhérine a ensuite été effectuée, puis normalisée par rapport aux cellules PC3 contrôles (Figure 37B). Ce rapport est significativement augmenté à partir de 72 h de culture dans les cellules surexprimant GJA1-20k, de 3 fois pour les cellules PC3-20k (V5) et de 2 fois pour les cellules PC3-20k (N1) dans les lignées contrôles. L'expression de la N-cadhérine reste globalement stable quelles que soient les cellules considérées.

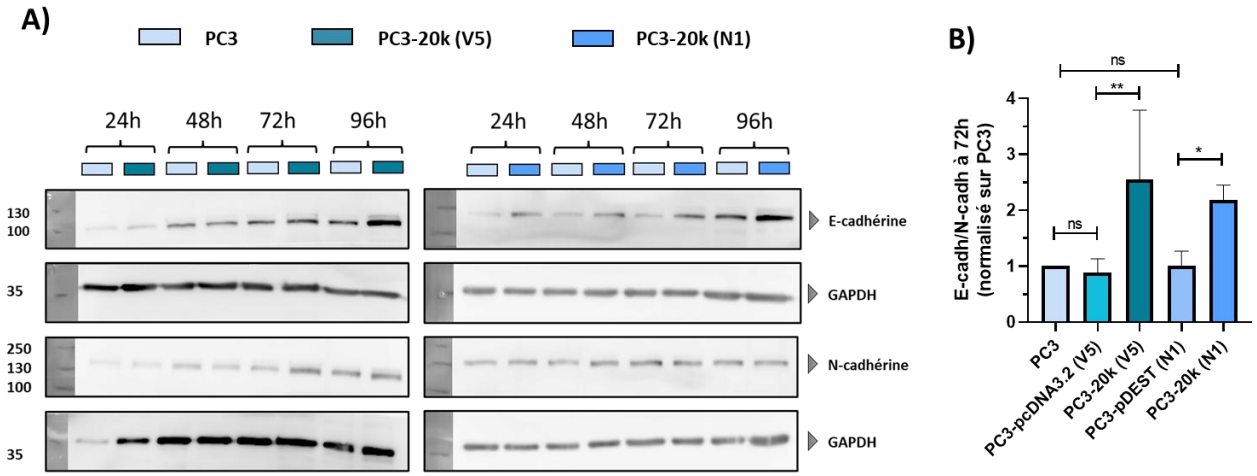


Figure 37 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression de la E- et de la N-cadhérine dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Western blot représentatif des niveaux d'expression de E- et N-cadhérine dans les différentes lignées cellulaires. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. **B)** Histogramme représentant le rapport E/N-cadhérine normalisé par rapport à celui des cellules PC3 contrôles après analyse densitométrique de l'intensité des signaux sous ImageJ (N = 4). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD, * $p<0,05$.

Un immunomarquage, réalisé à 72 h de culture, a permis d'observer la localisation des deux cadhérines (Figure 38), la E-cadhérine et la N-cadhérine étant marquées en vert et la flotilline-1, utilisée comme marqueur membranaire, marquée en rouge. Les résultats montrent une augmentation du signal membranaire de la E-cadhérine dans les cellules surexprimant GJA1-20k par rapport aux cellules contrôles. La localisation de la N-cadhérine, ainsi que son niveau d'expression, ne varient pas entre les différentes conditions.

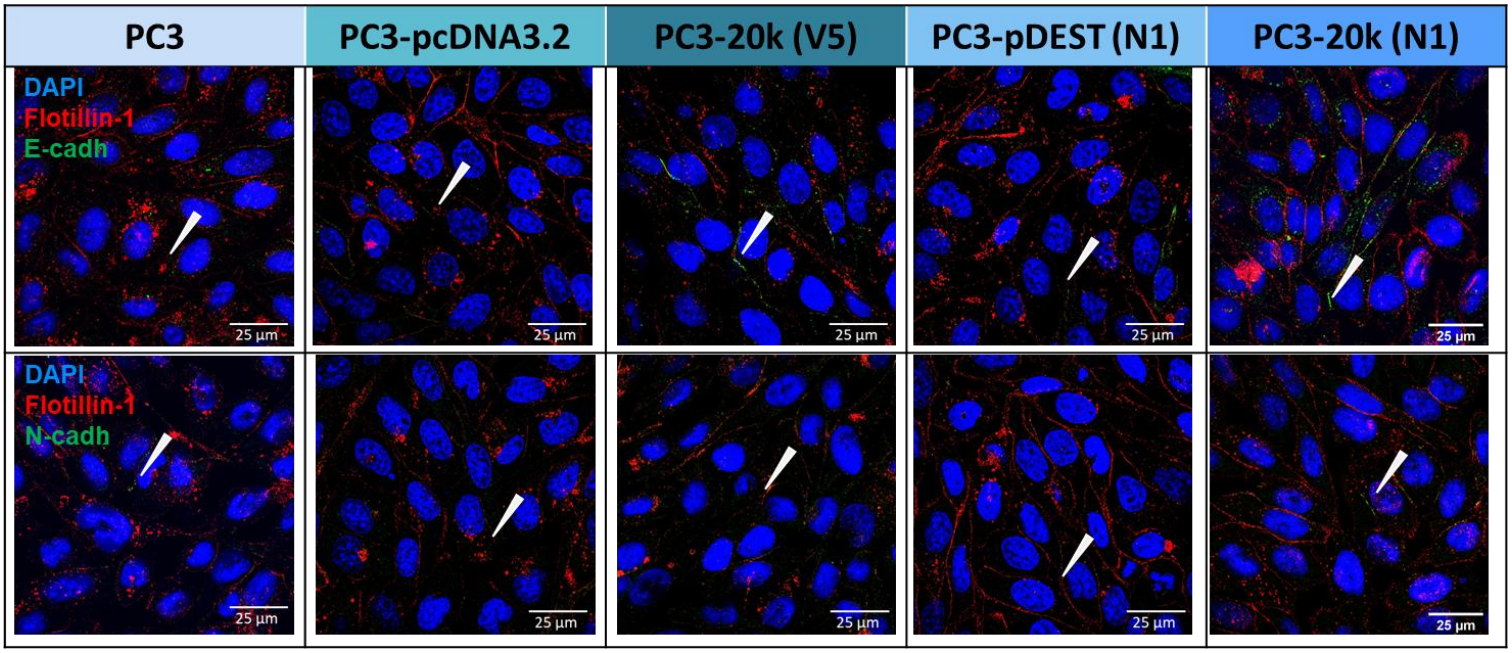


Figure 38 : Expression et localisation des cadhérines dans les cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k

Images représentatives de l'immunomarquage réalisé après 72h de culture montrant la localisation de E-cadhérine et N-cadhérine (vert) dans les cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k. La flotilline-1, marqueur de la membrane plasmique, est détectée en rouge et les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu) (N = 3).

Ces résultats suggèrent que la surexpression de GJA1-20k, en induisant l'expression de la E-cadhérine, favorise l'induction d'une transition mésenchymo-épithéliale (MET) qui pourrait contribuer à limiter les propriétés métastatiques des cellules métastatiques prostatiques.

3. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur les capacités de migration et invasion des cellules cancéreuses prostatiques

La migration cellulaire est une étape clef de la cascade métastatique, permettant aux cellules tumorales de s'échapper de la tumeur primaire pour rejoindre la circulation sanguine et lymphatique, puis de coloniser des sites secondaires. Elle est un reflet du potentiel agressif des cellules tumorales, et les études précédemment menées au laboratoire ont démontré un rôle pro-invasif de la Cx43 lorsqu'elle est localisée à la membrane plasmique dans les cellules LNCaP. Afin d'évaluer le potentiel migratoire de nos modèles cellulaires, un test de migration collective de type « *wound healing* » a été réalisé. Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre la confluence, la prolifération a été bloquée avec de la mitomycine, puis une blessure mécanique rectiligne a été générée dans le tapis cellulaire. La dynamique de fermeture de la blessure a été suivie par microscopie après 8 et 12 h de culture (Figure 39A). Les résultats démontrent que, quel soit le modèle utilisé, les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k présentent une baisse significative de leur capacité de migration, avec une réduction de recouvrement de 30% à 8 h et de 25% de réduction à 12 h, par rapport aux cellules contrôles respectives. Par ailleurs, les lignées contrôles ne montrent pas de différence significative de fermeture entre elles.

L'invasion tumorale est un processus plus complexe que la migration seule, impliquant la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par des protéases, principalement des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Cette invasion a été évaluée par un test de Boyden modifié, utilisant des chambres Transwell dont les filtres sont recouverts de Matrigel®, une MEC reconstituée. Après 17 h d'incubation, les cellules ayant traversé la membrane ont été fixées, colorées et quantifiées par analyse d'images (Figure 39B). La surexpression de GJA1-20k a induit une diminution significative du nombre de cellules invasives de 40% pour les cellules PC3-20k (N1) et de 60% pour les cellules PC3-20k (V5) par rapport à leur contrôle respectif.

L'ensemble de ces résultats démontrent que la surexpression de GJA1-20k inhibe la migration et l'invasion des cellules métastatiques prostatiques, réduisant ainsi leurs capacités dynamiques nécessaires à la dissémination tumorale.

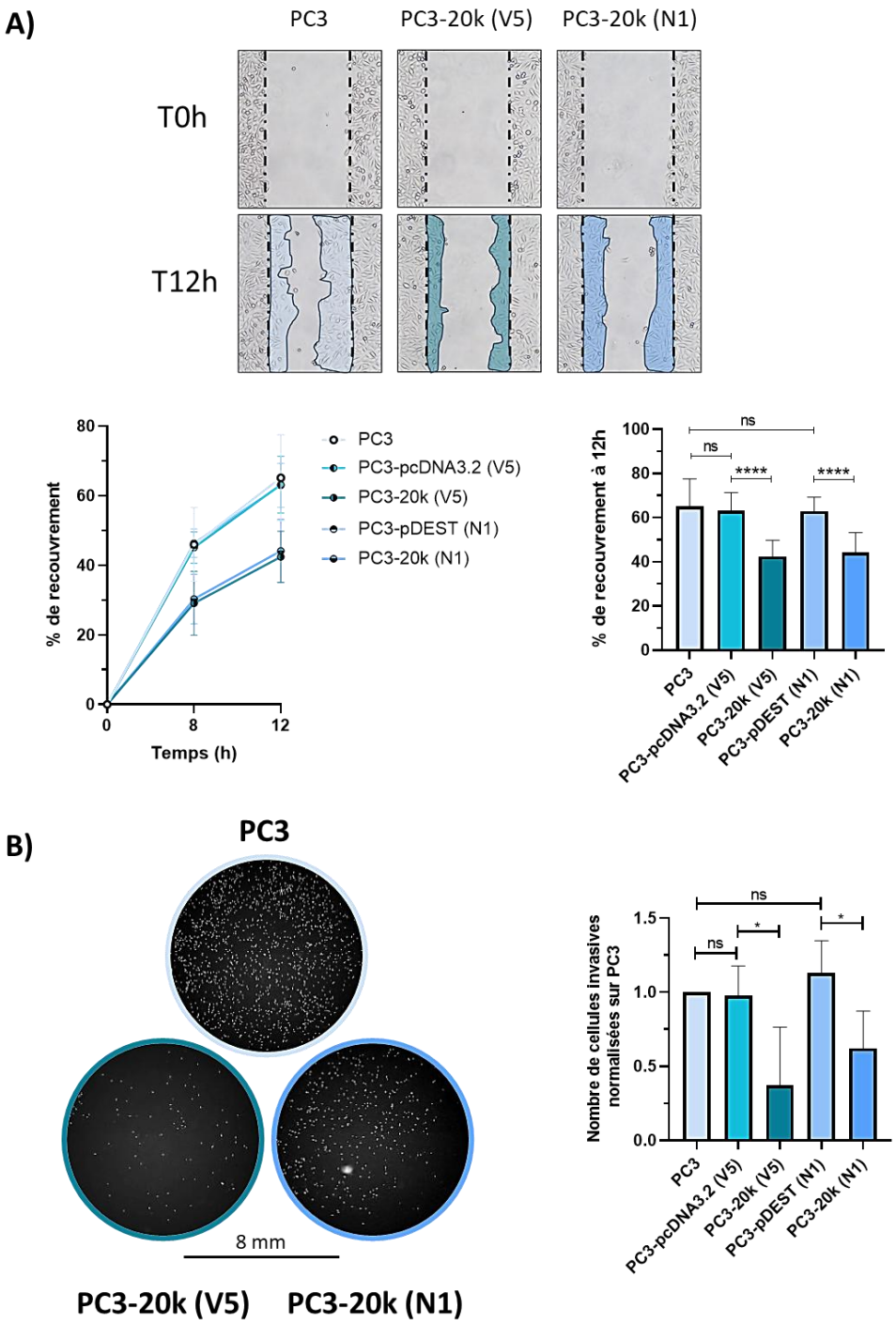


Figure 39 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur les capacités migratoires et invasives des cellules prostatiques métastatiques

A) En haut : images représentatives du test de migration collective (« wound healing ») montrant l'aire de recouvrement (en couleur) de la blessure après 12 h de culture pour chaque lignée. En bas à gauche : Courbe d'évolution du pourcentage de recouvrement au cours du temps pour les différentes lignées. En bas à droite : Quantification du pourcentage de recouvrement à 12 h (moyenne ± SD ; N = 12, en duplicat). **B)** Gauche : images représentatives des cellules PC3 surexprimant la GJA1-20k ou non ayant traversé la membrane lors du test d'invasion en chambre de Boyden modifiée recouverte de Matrigel®. À droite : Histogramme correspondant à la quantification du nombre de cellules invasives pour chaque lignée (moyenne ± SD ; N = 3).

4. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la résistance à l'anoïkis

Une des étapes critiques de la cascade métastatique, après l'intravasation, est la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine. Privées d'ancrage à la matrice extracellulaire, ces cellules disséminantes doivent résister à la mort cellulaire induite par la perte d'adhérence : l'anoïkis.

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de GJA1-20k sur la résistance à l'anoïkis, les cellules PC-3 ont été cultivées dans des boîtes de culture recouvertes de polyHEMA, un polymère chargé positivement qui empêche les cellules d'adhérer au support. Après 6 jours de culture, les cellules non-adhérentes forment des sphères dont la taille et la morphologie varient selon les lignées cellulaires (Figure 40A). La surface totale occupée par les sphères dans le puits, ainsi que leur diamètre maximal, sont mesurés. Après cette première série d'analyse, l'ensemble des cellules d'un puits (plaque de 12 puits) est récupéré, déposé dans une autre plaque afin de réaliser un test XTT, puis de nouveau récupéré pour effectuer finalement un comptage cellulaire.

Les cellules surexprimant GJA1-20k présentent un taux de survie de 80% après 6 jours de culture sans adhérence alors que les lignées contrôles présentent un taux de survie de 65% (Figure 40B).

De plus, le diamètre maximal des sphères formées par les cellules PC3-20k (N1 et V5) est deux fois supérieur à celui des sphères formées par les cellules contrôles. Enfin, la surface totale occupée par les sphères dans les puits est également significativement plus élevée lorsqu'elles ont pour origine les cellules surexprimant GJA1-20k (Figure 40C).

Ces résultats démontrent que la surexpression de GJA1-20k confère aux cellules métastatiques prostatiques une meilleure résistance à l'anoïkis, favorable à leur survie en conditions non adhérentes.

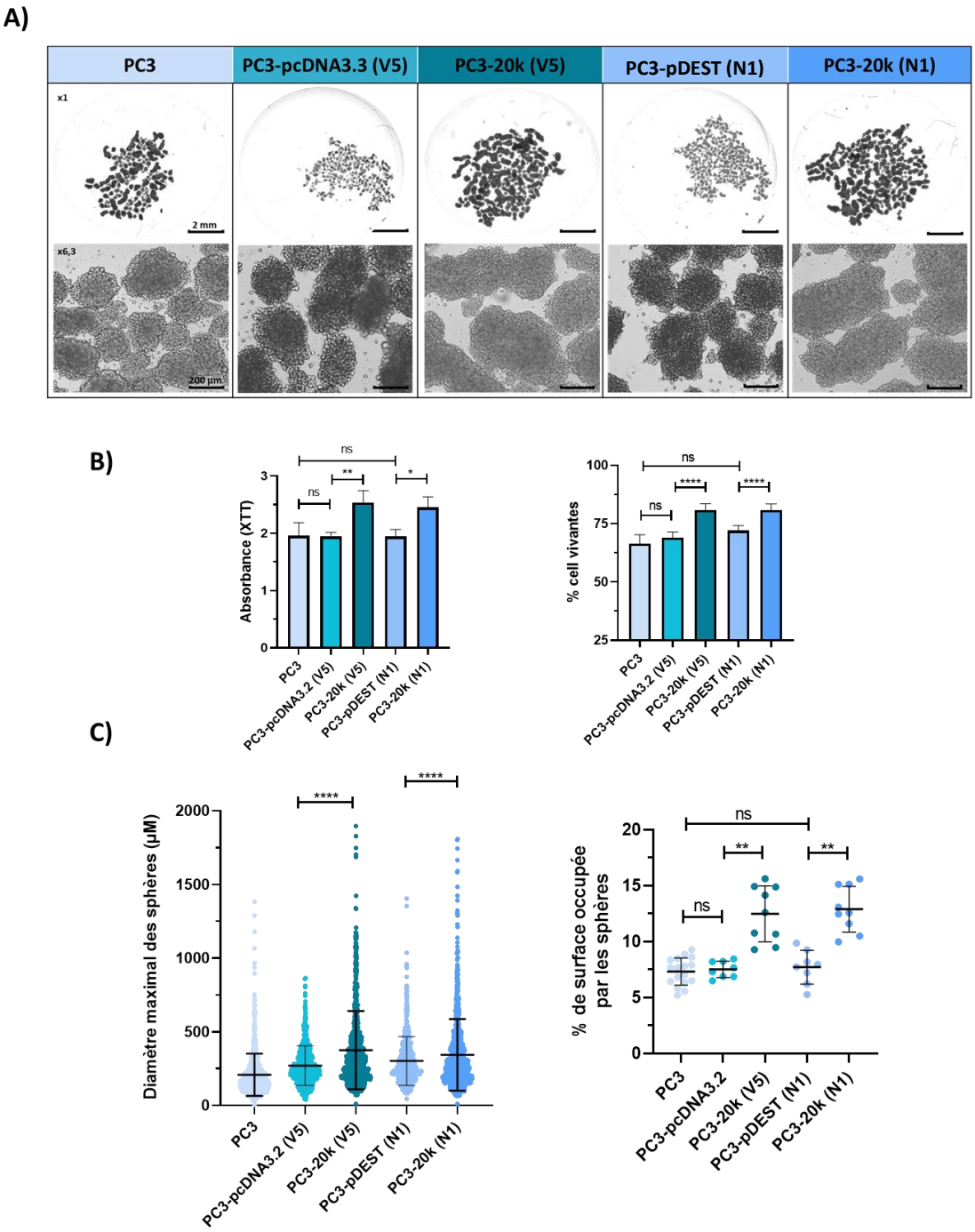


Figure 40 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la survie des cellules prostatiques métastatiques en condition d'anoïkis

A) Images représentatives des sphères formées par les cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k et cultivées 6 jours en absence d'adhérence (PolyHEMA, 10 nM), observées au macroscope (x1, échelle 2 mm) et au microscope (x6,3, échelle 200 µm)**. B)** Viabilité cellulaire évaluée par le test XTT (gauche) et pourcentage de cellules vivantes associées (droite) après 6 jours de culture dans les mêmes conditions (N = 3, en triplicat). **C)** Quantification de la taille maximale des sphères obtenues à J6 sans adhérence (gauche : PC3 n=1030, PC3-pcDNA3.2 n=630, PC3-20k (V5) n=790, PC3-pDEST n=545 et PC3-20k (N1) n=925) et pourcentage de la surface occupée par les sphères dans les puits (N = 3, en triplicat). Résultats exprimés en moyenne ± SD, * $p<0,05$ à **** $p<0,0001$.

5. Impact de GJA1-20k sur l'activité mitochondriale des cellules cancéreuses métastatiques prostatiques

Au cours du développement tumoral, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme énergétique, notamment via des modifications de l'activité mitochondriale. Dans ce contexte, nous avons étudier l'impact de la surexpression de GJA1-20k sur l'organisation et l'activité mitochondriale dans nos différentes cellules cancéreuses prostatiques.

La masse mitochondriale a été estimée par un immunomarquage de TOM20, une protéine présente spécifiquement au niveau de la membrane mitochondriale externe. L'intensité du signal de fluorescence a été quantifié dans sa totalité en Z (sur toute la hauteur cellulaire) pour chaque cellule et le long de l'axe front de migration/queue de rétraction afin d'apprécier sa localisation et sa répartition au sein de la cellule (Figure 41 et 42). Les cellules PC3-20k (V5) présentent ainsi une diminution significative de l'intensité du signal TOM20 et donc de la quantité de mitochondries par rapport aux cellules contrôles (Figure 41). Ce résultat est corrélé à une réduction significative du nombre de copies d'ADN mitochondrial par cellules, mesuré par qPCR, dans les cellules PC3-20k (V5) et également dans les cellules PC3-20k (N1) par rapport à leurs cellules contrôles respectives (Figure 41B).

En parallèle, la production de ROS a été mesurée dans les lignées PC3 et PC3-20k. Ces résultats montrent que la surexpression de GJA1-20k a diminué cette production, en condition basale, sans induction de stress oxydatif (Figure 41C).

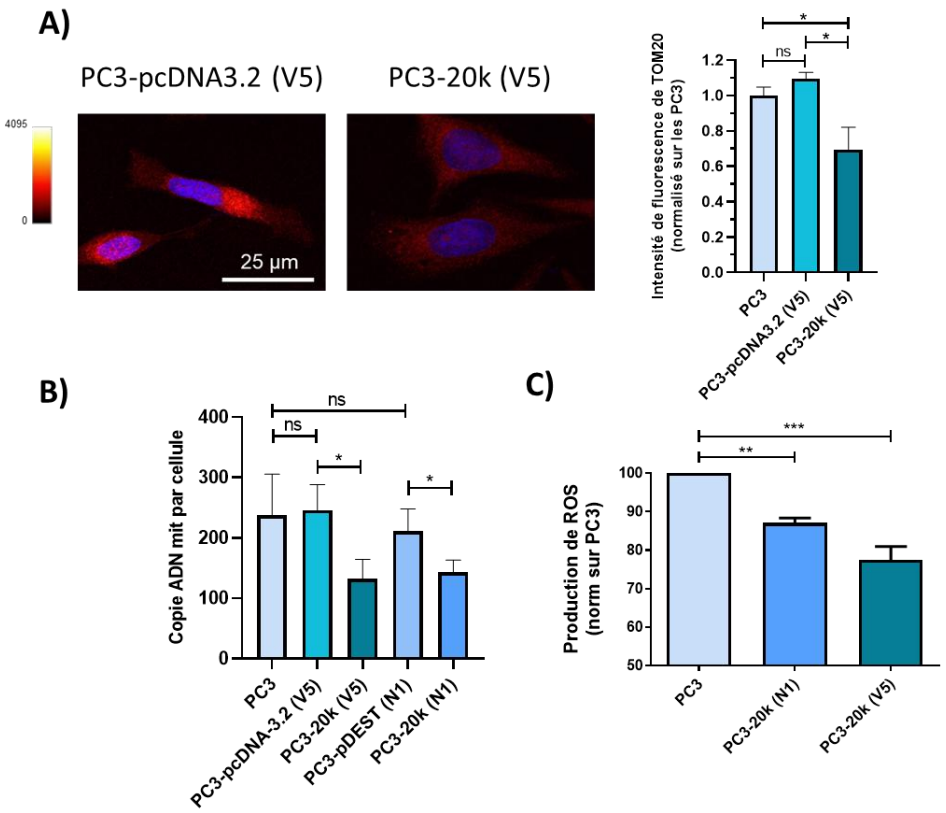


Figure 41 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur le nombre de mitochondries et la production de ROS dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Images représentatives montrant l'expression du TOM20 (rouge) par immunofluorescence et des noyaux (DAPI, bleu) dans les cellules PC3-20k (V5) et les cellules contrôles après 48h de culture, et quantification du signal sur l'ensemble de la cellule après acquisition d'images en Z-stack (N = 3, échelle 25 µm). **B)** Analyse du nombre de copie d'ADN mitochondrial par cellule (N = 5). **C)** Quantification de la production de ROS après 48 h de culture dans les différentes lignées PC3 (N=4). Résultats exprimés en moyenne ± SD, * $p<0,05$ à *** $p<0.001$.

De plus, l'analyse de la distribution du signal de TOM20 selon le grand axe de la cellule montre une relocalisation des mitochondries vers la périphérie du noyau en présence de GJA1-20k. Pour les cellules PC3-20k (V5), une baisse de 10% du signal en zone périnucléaire (APP) a été mesurée par rapport au signal présent dans les cellules contrôles PC3-pcDNA3.2 (V5) (Figure 42A).

L'activité mitochondriale a ensuite été évaluée sur cellules vivantes par un marquage au TMRE (Tetra-Methylrhodamine Ethyl Ester), un indicateur du potentiel de membrane mitochondrial. Les résultats montrent une diminution significative de 50% du signal mesuré dans les cellules surexprimant GJA1-20k par rapport aux cellules contrôles (Figure 42B), indiquant une baisse de l'activité mitochondriale.

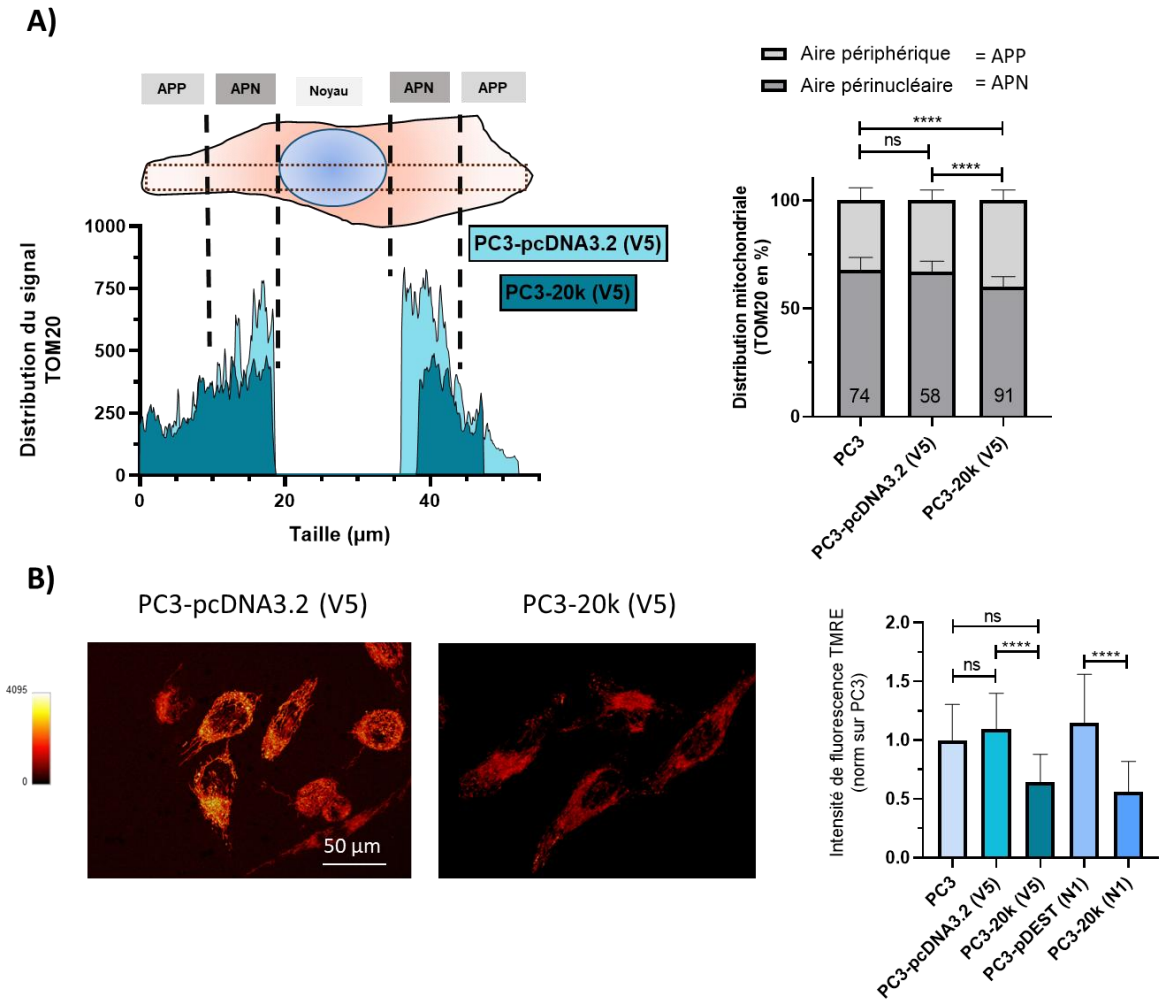


Figure 42 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la distribution mitochondriale dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Représentation et analyse de la distribution des mitochondries en périphérie (APP) et en périnucléaire (APN), basée sur l'intensité de l'immunomarquage de TOM20 mesurée le long du grand axe des cellules (zone délimitée par un rectangle en pointillé) (N = 3). **B)** Images représentatives et quantification de l'intensité du signal TMRE obtenues sur cellules vivantes, compilées en Z-stack (N = 3). Résultats exprimés en moyenne ± SD, *p<0,05 à *** p<0,0001.

Afin de compléter l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial, une analyse fonctionnelle de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale a été réalisée à l'aide de l'analyseur Seahorse. Celui-ci permet de mesurer en temps réel à la fois le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) reflétant respectivement la respiration mitochondriale et l'activité glycolytique des cellules.

L'ajout de 25 mM de glucose aux cellules, préalablement incubées dans un milieu sans glucose, fournit un substrat permettant l'activation de la glycolyse. Cela se traduit par une augmentation de l'ECAR, reflétant la glycolyse basale. L'ajout d'oligomycine va inhiber l'ATP synthase (Complexe V) et ainsi bloquer la phosphorylation oxydative en interrompant la production d'ATP. La cellule va alors compenser cette baisse en augmentant la glycolyse pour produire de l'ATP, avec pour conséquence une nouvelle hausse de l'ECAR. Cette augmentation permet de calculer la capacité glycolytique maximale et donc la réserve glycolytique (glycolyse compensatoire).

Ensuite, l'ajout de FCCP, un agent découplant mitochondrial, va dissiper le gradient électrochimique de protons à travers la membrane mitochondriale interne forçant la chaîne respiratoire à fonctionner à son maximum pour restaurer ce gradient. Cette étape permet de quantifier la respiration mitochondriale maximale en complément de la respiration basale déjà mesurée.

Enfin, l'inhibition des complexes I et III de la chaîne respiratoire par l'ajout de roténone et d'antimycine A (Rot/AA) bloque complétement la respiration mitochondriale, ce qui se traduit par une diminution drastique de l'OCR.

L'ensemble de ces mesures effectuées sur les cellules PC3-20k(V5) indique que la surexpression de GJA1-20k induit une diminution globale de la respiration mitochondriale par rapport aux cellules contrôles : baisse de 34% de la respiration basale et maximale, et baisse de 53% de la capacité de réserve respiratoire (« *spare respiratory capacity* »), qui reflète la capacité des mitochondries à répondre à une demande énergétique accrue. Plus précisément, il s'agit de la différence entre la respiration basale d'une cellule et sa respiration maximale possible lorsqu'elle est stimulée. De plus, les cellules PC3-20k(V5) produisent également moins d'ATP lié la chaîne respiratoire (« ATP-linked respiration ») (Figure 43A).

Par ailleurs, la surexpression de GJA1-20k a entrainé une baisse générale de l'activité glycolytique : une diminution de 30% de la glycolyse, de 25% des capacités glycolytiques et de 26% de la capacité à augmenter la glycolyse en réponse à un stress énergétique ou à une demande accrue en ATP (réserve glycolytique) (Figure 43B).

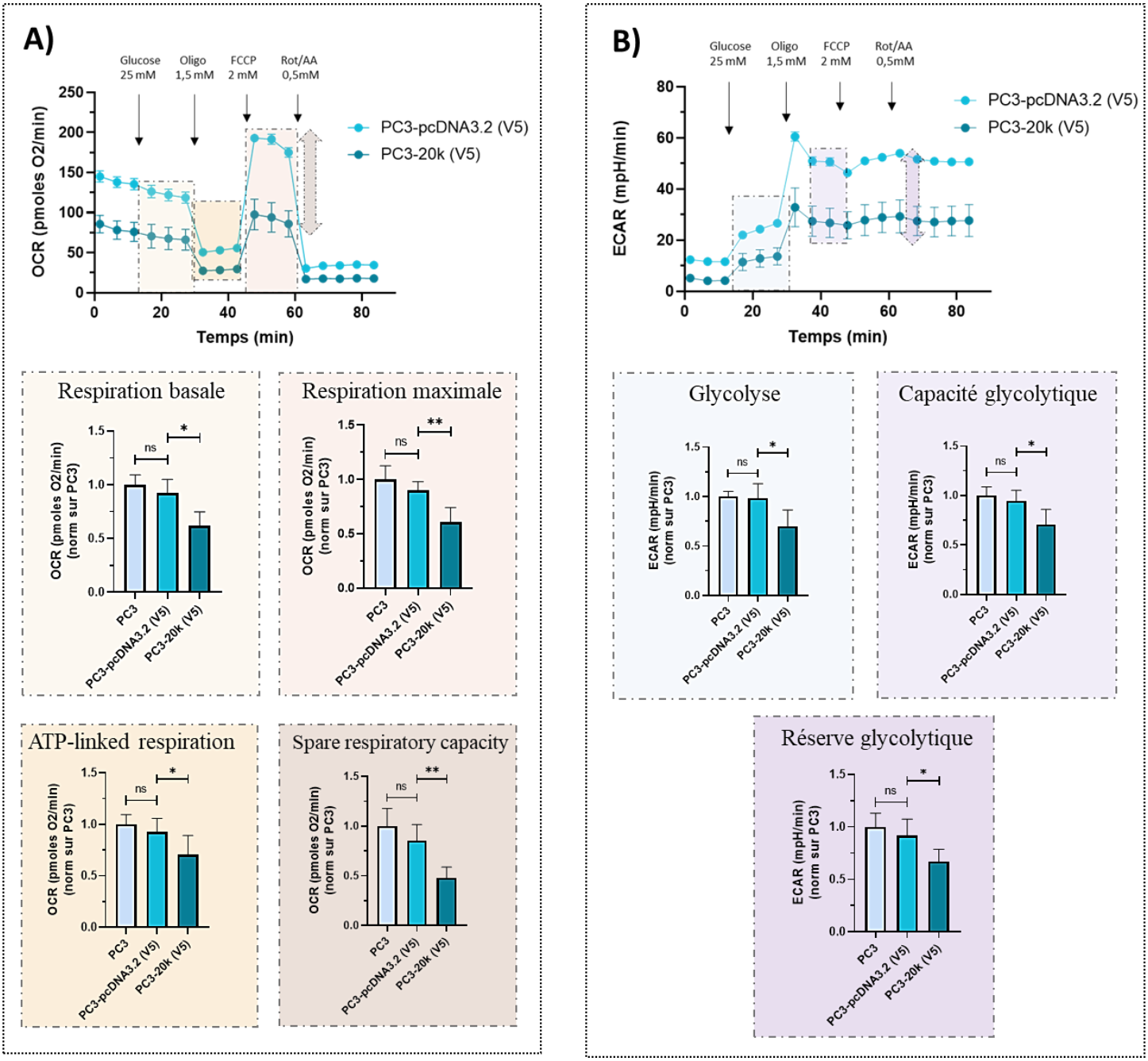


Figure 43 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la respiration mitochondriale et la glycolyse des cellules prostatiques métastatiques

A et B) Analyse par le Seahorse de la respiration (OCR) et de la glycolyse (ECAR) des cellules PC3, PC3-pcDNA3.2 et PC3-20k (V5). En haut : Courbes représentatives de l'évolution en temps réel de l'OCR et de l'ECAR des cellules PC3-20k (V5) et contrôles en conditions basales et après ajout séquentiel de glucose et d'inhibiteurs spécifiques. **A)** La respiration basale est indiquée par un carré jaune, la respiration maximale en rose, la respiration liée à l'ATP « *ATP-linked respiration* » en orange et la capacité des mitochondries à répondre à une demande énergétique accrue « *spare respiratory capacity* » en marron**. B)** La glycolyse est indiquée par un carré bleu, la capacité glycolytique et réserve glycolytique par un carré parme et violet respectivement. Les données représentent la moyenne ± SD de 4 expériences indépendantes (N = 4, en triplicat).

Afin de déterminer si l'altération de la capacité métabolique oxydative était due à une modification intrinsèque de la chaîne respiratoire mitochondriale ou à une différence dans la disponibilité des substrats, la consommation totale d'O_2 dans des cellules perméabilisées, a été mesuré par oxygraphie. Aucune différence significative n'a été observée entre les lignées, quel que soit le substrat ajouté à la solution de respiration (Figure 44). Donc que la capacité oxydative maximale, en présence d'un excès de substrats, est équivalente et n'est pas altérée par GJA1-20k.

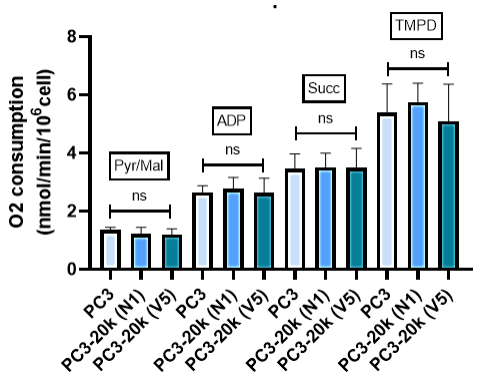


Figure 44 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la capacité oxydative maximale des cellules prostatiques métastatiques

Consommation d'oxygène mesurée par oxygraphie dans des cellules PC3 et PC3-20k (N1 et V5), perméabilisées à la digitonine et soumises à l'addition séquentielle de différents substrats et composés : pyruvate/malate (Pyr/Mal); ADP ; succinate (Succ) ; N,N,N′,N′-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) (N = 4).

La surexpression de GJA1-20k est responsable d'une baisse de l'activité mitochondriale liée à une baisse du nombre et de l'activité intrinsèque des mitochondries, mais également d'une redistribution des mitochondries vers la périphérie des cellules métastatiques prostatiques, conduisant à un changement du profil énergétique (Figure 45).

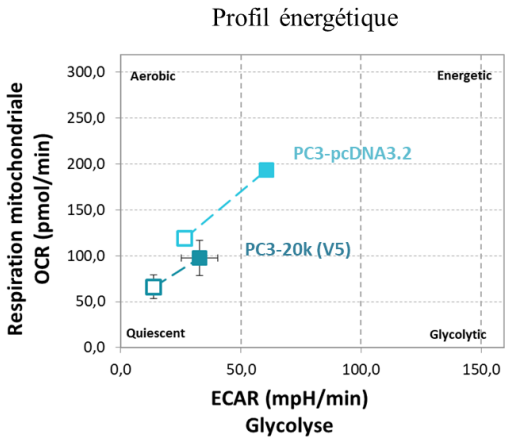


Figure 45 : Profil énergétique des cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k)

Phénotype énergétique cellulaire déterminé par la technologie Agilent Seahorse XF des cellules PC3-pcDNA3.2 et PC3-20k (V5). Le phénotype basal est représenté par un symbole vide et le phénotype en condition de stress métabolique est indiqué par un symbole plein.

6. Impact de surexpression de GJA1-20k sur le métabolisme glucidique

Afin d'approfondir l'analyse des conséquences de la surexpression de GJA1-20k sur le métabolisme glucidique des cellules cancéreuses prostatiques, plusieurs métabolites et paramètres liés à l'activité cellulaire ont été dosés dans le milieu extracellulaire après 24 et 48h de culture. Les concentrations en glucose, lactate, d'ATP intracellulaire, ions bicarbonate (HCO_3^-) et le pH du milieu ont ainsi été comparées à celles du milieu de base (DMEM) en début d'expérience (T=0).

Cette analyse montre que les cellules surexprimant GJA1-20k consomment environ deux fois moins de glucose que les cellules contrôles. Par exemple à 48 h, pour les cellules PC3-pDEST (N1), une baisse de 58% de la consommation de glucose est observée, et pour les cellules PC3-20k (V5), une baisse de 41%, par rapport à leur contrôle respectif (Figure 46A). Reflétant cette diminution du métabolisme glucidique, les deux lignées PC3-20k, après 48 h de culture, n'ont consommé que 35% du glucose initialement présent dans le milieu à T0 (Figure 46B). De manière cohérente, la concentration en lactate est également réduite de 30% par rapport aux à cellules contrôles (Figure 46C).

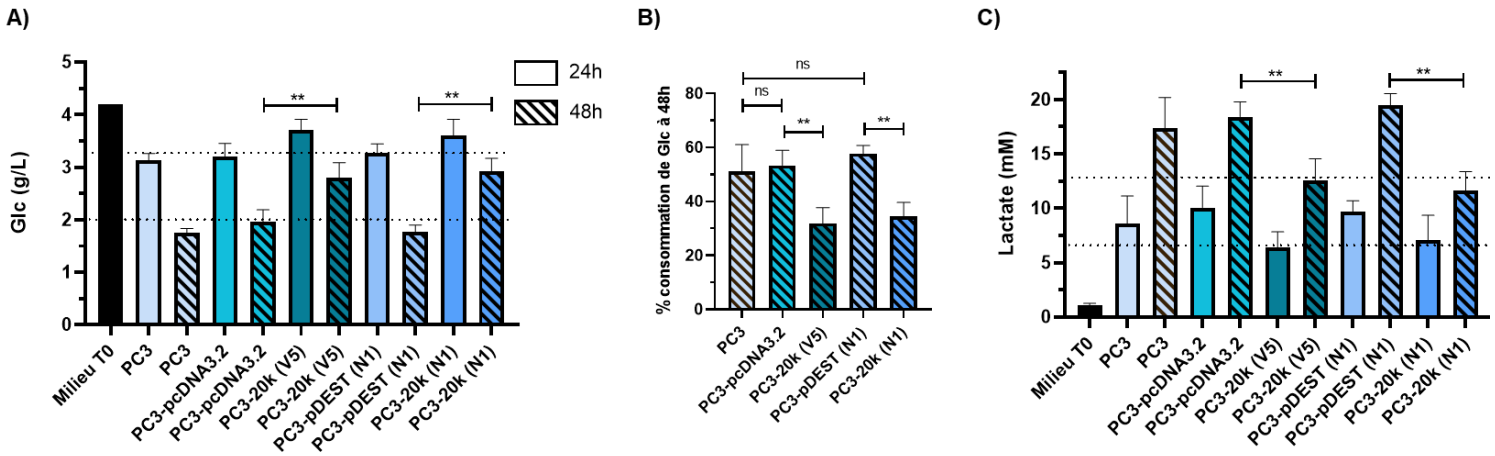


Figure 46 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la consommation de glucose et la production de lactate dans les cellules prostatiques métastatiques

Les cellules surexprimant ou non GJA1-20k ont été cultivées pendant 24 et 48h. **A)** le glucose (Glc) extracellulaire a été dosé (g/L), **B)** le pourcentage de consommation de glucose à 48 h a été mesurée et **C)** la concentration du lactate extracellulaire a été mesurée (mM). « Milieu T0 » correspond au milieu de culture contrôle sans cellules. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. (N=4). ** $p<0,01$.

La concentration intracellulaire d'ATP varie dès le début de l'expérience : à T0, elle est supérieure de 12 % dans les cellules PC3 et de 8% dans les cellules PC3-20k (V5) respectivement. Cette différence s'observe toujours à 24 et 48 h de culture, avec une concentration d'ATP supérieure de 13 % dans les cellules PC3-20k par rapport aux PC3 à 48 h (Figure 47).

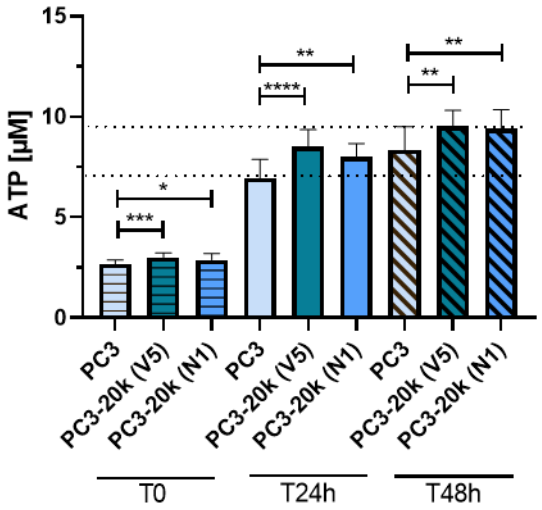


Figure 47 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur la concentration intracellulaire d'ATP dans les cellules prostatiques métastatiques

Dosage de la concentration intracellulaire d'ATP (en µM) dans les cellules PC3 et PC3-20k (N1 et V5) à différents temps de culture (T0, 24 et 48 h). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD, N=4, ** $p<0,01$.

En complément de l'analyse réalisée avec le Seahorse, l'acidité du milieu de culture a été analysée par mesure du pH après 24 et 48h (Figure 48A et B). Il en ressort que le pH du milieu de culture ne varie que très peu au cours du temps pour les lignées PC3-20k (-1,2% pour N1 et V5), contrairement à leurs contrôles respectifs [-3,3% pour PC3-pDEST(N1) et -3,8% pour PC3-pcDNA3.2(V5)].

Le dosage des ions bicarbonates présents dans les différents milieux de culture après 24 et 48 h de culture révèle que cette molécule tampon est également moins utilisé, environ deux fois moins, par les cellules surexprimant GJA1-20k notamment après 48 h (Figure 48A).

Enfin, et comme attendu, aucune différence significative de consommation ou de production de métabolites, ni de variation de pH, n'a été observée entre les cellules contrôles après 24 et 48 h de culture (lignes pointillées Figure 48).

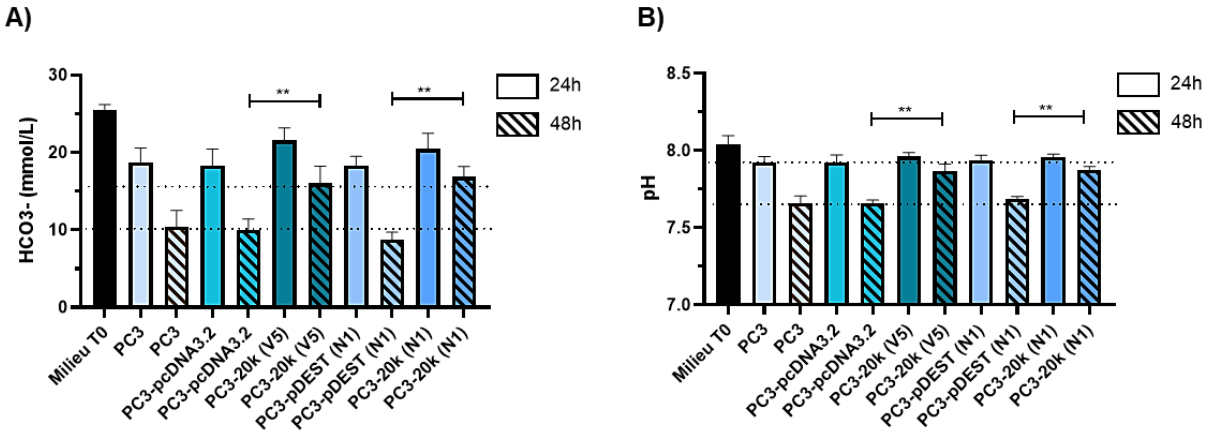


Figure 48 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'acidification du milieu extracellulaire

A) Dosage des ions bicarbonate $HCO3^-$ (mmol/L) et **B)** mesure du pH du milieu après culture des cellules PC3 et PC3-20k (N1 et V5) pendant 24 et 48 h. « Milieu T0 » correspond au milieu de culture contrôle sans cellules. Moyenne ± S, N=4, ** $p<0,01$.

Complétant les résultats obtenus par le test du Seahorse, les dosages de différents métabolites du milieu de culture confirment que la surexpression de GJA1-20k induit une baisse de la consommation de glucose, de la production de ses métabolites et donc du métabolisme cellulaire dans les cellules métastatiques prostatiques.

III. Etude de l'expression de GJA1-20k dans les conditions de la niche métastatique osseuse

1. Modulation de l'expression de GJA1-20k par le milieu conditionné osseux

Afin d'évaluer l'effet du microenvironnement osseux sur les cellules tumorales prostatiques, du milieu conditionné ostéoblastique (osteoblastic-conditioned medium, ObCM) a été préparé à partir de la culture pendant cinq jours d'ostéoblastes primaires isolés de calvaria de souris. Ce modèle a été caractérisé dans le cadre des travaux de thèse du Dr Jonathan Boucher (Boucher, 2018). Il a ainsi démontré que l'ObCM induit, sur les cellules LNCaP, une augmentation de l'expression de la Cx43 totale ainsi que de son isoforme tronquée GJA1-20k, corrélée à une hausse significative des capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses (Boucher *et al.*, 2020).

Afin de compléter ces résultats, l'effet de l'ObCM a été testé sur les cellules PC3, cultivées en présence de ce microenvironnement osseux pendant différents temps, de 24 à 96 h. Des analyses par Western blot ont été réalisées sur des extraits protéiques totaux afin d'observer les niveaux d'expression de la Cx43 totale (FL-Cx43) et de GJA1-20k après ce traitement (Figure 49A).

Après 96 h de traitement, l'ObCM, a induit une augmentation de Cx43 totale dans la lignée PC3 de +50%. Cependant cet effet de l'ObCM est d'autant plus visible pour la GJA1-20k, surtout à 96 h, où son taux d'expression a été multiplié par quatre. Cet effet de l'ObCM est plus faible et constant pour la Cx43 au cours du temps, alors que pour GJA1-20k, il est progressif. A partir de 48 h de culture en ObCM, GJA1-20k devient l'isoforme majoritairement exprimée par les cellules métastatiques prostatiques, représentant 65% du signal par Western blot (Figure 49B).

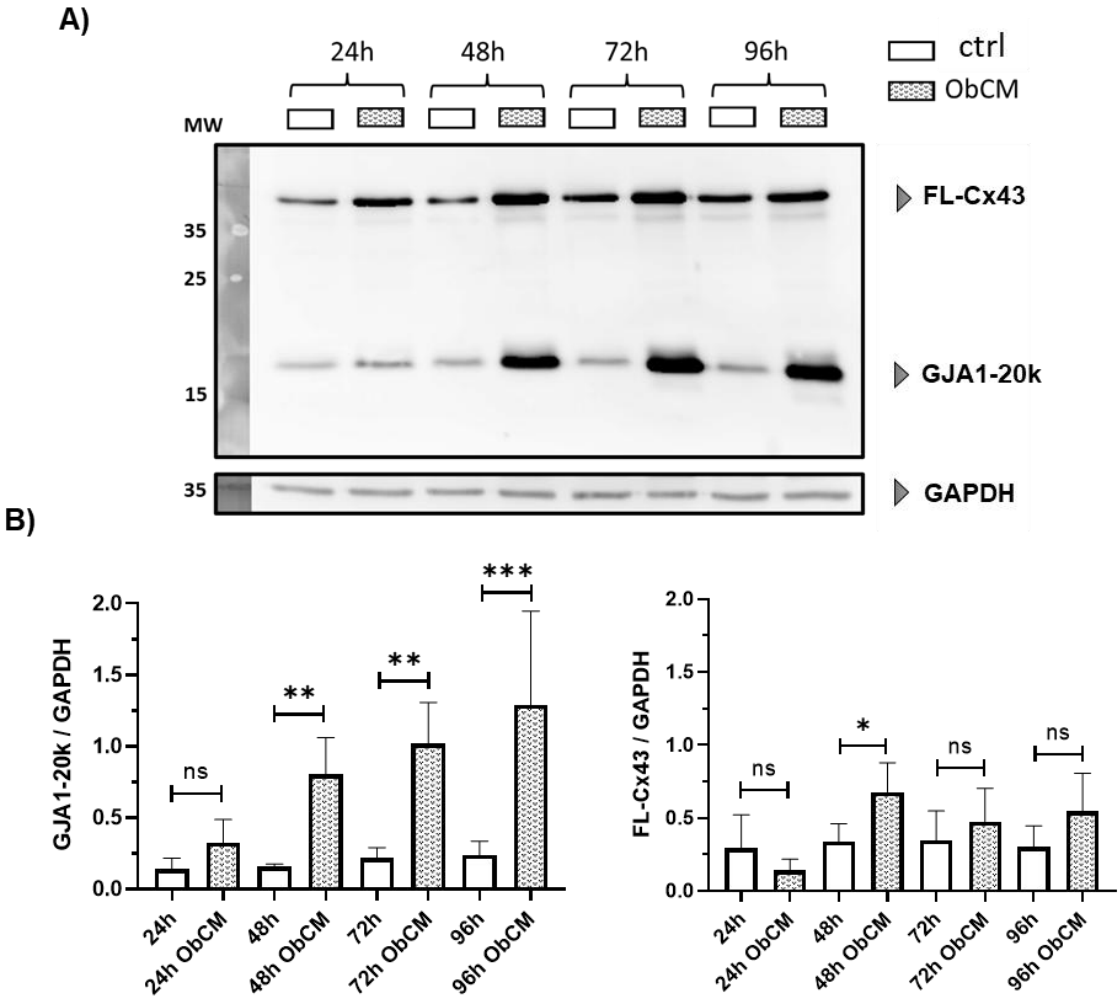


Figure 49 : Effet du microenvironnement osseux sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules PC3

A) Western blot représentatif des niveaux d'expression de GJA1-20k et de la forme totale de Cx43 (FL-Cx43) dans la lignée PC3 de 24 h à 96 h de culture en présence du milieu conditionné osseux (ObCM) ou du milieu de différenciation contrôle (Ctrl). **B)** Quantification de l'intensité des signaux par analyse densitométrique sous ImageJ. La GAPDH a été utilisé comme contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3). * p< 0,05 à *** p<0,001.

Le microenvironnement osseux induit préférentiellement au cours du temps l'expression de GJA1-20k par rapport à la forme totale de Cx43. Cette stimulation différentielle pourrait refléter une adaptation spécifique des cellules tumorales prostatiques à la niche osseuse, en cohérence avec les effets observés lorsque GJA1-20k est stablement surexprimée dans ces cellules.

2. Expression de GJA1-20k en condition hypoxique

La niche métastatique osseuse ostéogénique, en plus des acteurs cellulaires comme les ostéoblastes, est caractérisée également par un environnement fortement hypoxique (1% d'O2) (Thompson *et al.*, 2025). Afin d'étudier l'impact potentiel de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k, les cellules PC3 ont été cultivées au cours du temps en normoxie ou en condition d'hypoxie stable à 1% O_2.

En hypoxie, les cellules tumorales prostatiques présentent des modifications morphologiques marquantes, notamment l'apparition de longues projections membranaires observées en microscopie à contraste de phase par rapport aux cellules cultivées en normoxie (Figure 50A). Afin de valider la mise en place de l'hypoxie, l'expression de HIF1-α, facteur de transcription connu pour être induit en absence d'oxygène a été analysée par Western blot. Une augmentation de cette expression est observée avec un pic significatif à 4 h (Figure 50B), validant ainsi les conditions expérimentales.

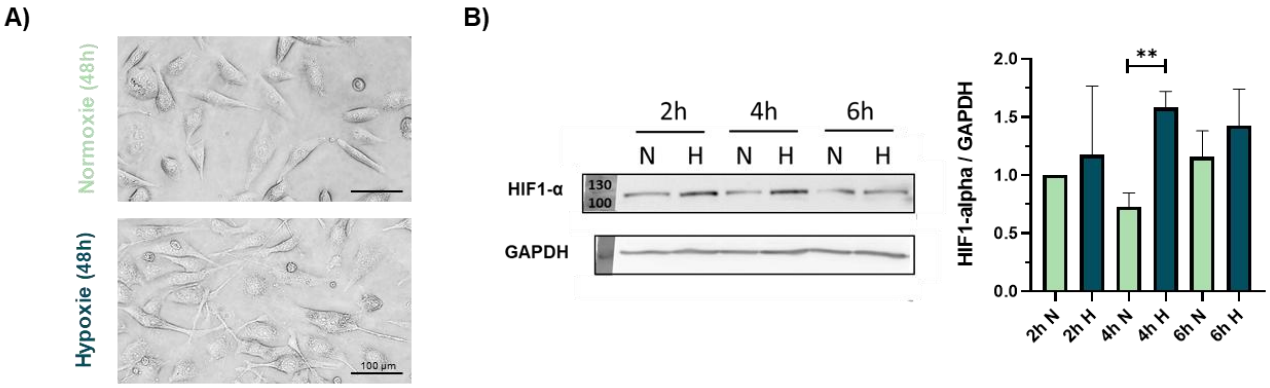


Figure 50 : Validation des conditions expérimentales d'hypoxie

A) Image représentative de la morphologie des cellules PC3 observées au microscope en contraste de phase après 48 h de culture en condition normoxique (N) ou hypoxique (H, 1 % O_2). **B)** Western blot représentatif des niveaux d'expression d'HIF-1α entre 2 et 6 h de culture en hypoxie (H) ou normoxie (N) et quantification de l'intensité des signaux par analyse densitométrique sous Image. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 2). ** $p<0,01$.

Les cellules PC3 ont alors été maintenues en hypoxie de 48 à 96 h, et l'expression de la Cx43 totale et de GJA1-20k a été analysée par Western blot (Figure 51). Alors que l'expression de Cx43 totale n'augmente que 1,5 fois par rapport à la normoxie, celle de GJA1-20k est significativement augmentée après 48 h en hypoxie (+116% par rapport normoxie, soit fois 2,2). Cette augmentation d'expression de GJA1-20k reste cependant transitoire car aucune différence significative ne persiste après 72 et à 96 h en hypoxie (Figure 51A). Il est également à noter

que, contrairement à la condition de stimulation par l'ObCM, l'expression de Cx43 reste plus élevée que GJA1-20k en hypoxie, sauf après 48 h d'hypoxie, où GJA1-20k représente 58% du signal total (Figure 54C).

Dans le modèle cardiaque, GJA1-20k est décrite comme une protéine de réponse au stress, dont l'expression augmente lors d'un stress de type ischémie/reperfusion (Basheer *et al.*, 2018). Afin de mimer ce phénomène, les cellules PC3 ont été cultivées 48 h en hypoxie suivies d'un retour de 24 h en normoxie. Dans ces conditions, l'expression de GJA1-20k est significativement augmentée après 48 h d'hypoxie, et son niveau redevient comparable à celui observé après 72 h en normoxie après seulement 24 h de réoxygénation des cellules PC3 (Figure 51B). Ces résultats indiquent que l'augmentation d'expression de GJA1-20k est directement liée à l'hypoxie et qu'elle est réversible.

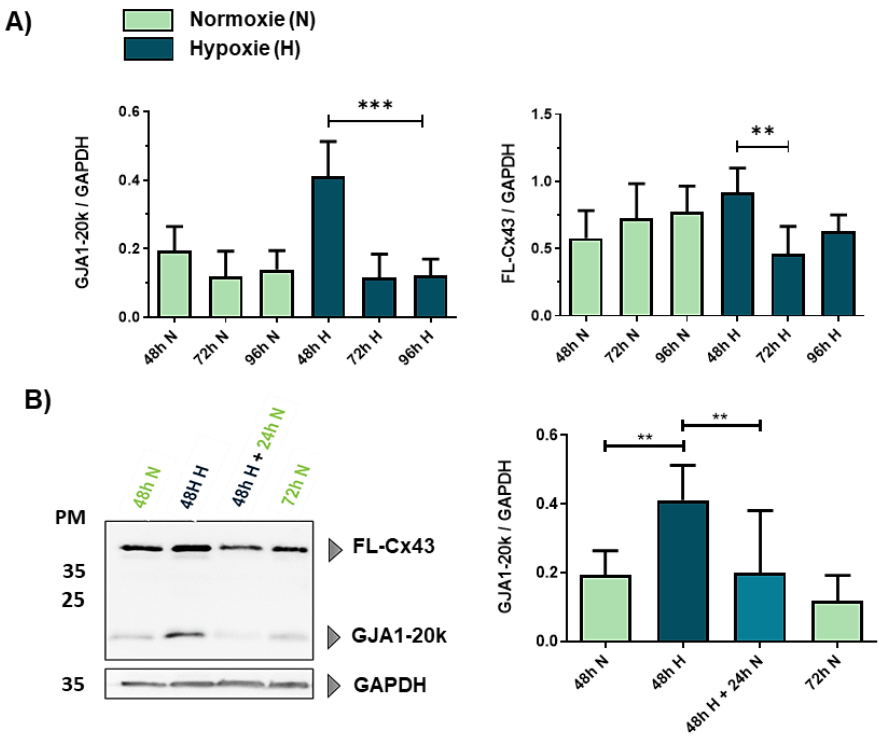


Figure 51 : Effet de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Après analyse par Western blots (non montrés), quantification de l'expression de GJA1-20k et de, Cx43 (FL-Cx43), rapportée à celle de la GAPDH utilisée comme contrôle de charge, dans les cellules PC3 cultivées pendant différents temps (48, 72 et 96 h) en condition normoxique ou hypoxique **B)** Western blot représentatif des niveaux de Cx43 totale (FL-Cx43) et de GJA1-20k dans les cellules PC3 cultivées en normoxie (48 et 72 h), en hypoxie (48 h) et en hypoxie (48 h) suivi d'un retour en normoxie (24 h). Quantification de l'expression de GJA1-20k dans ces conditions de culture rapportée à celle de la GAPDH utilisée comme contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3). ** $p < 0.01$ à *** $p<0.001$.

Enfin, afin de déterminer si cette régulation d'expression de GJA1-20k après 48 h d'hypoxie est bien due à un processus post-transcriptionnel, fréquemment retrouvé en condition de stress (Young *et al.*, 2008), une quantification des niveaux du transcrit a été effectuée après 48 h de culture par RT-qPCR. Aucune différence significative de la quantité d'ARNm de Cx43 n'a été retrouvée entre les conditions de normoxie et d'hypoxie (Figure 52).

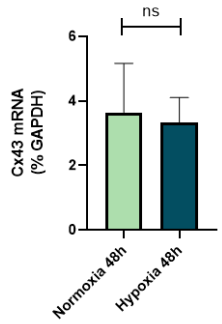


Figure 52 : Effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm GJA1 dans les cellules prostatiques métastatiques

Quantification par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de Cx43 dans les cellules PC3 cultivées en condition normoxique ou hypoxique pendant 48 h. La GAPDH est utilisée comme gène de ménage. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3).

L'expression de GJA1-20k a également été observée lorsque les cellules PC3 ont été soumises à un stress oxydatif, en présence de H_2O_2 à 250 µM pendant 48 h. Les résultats montrent que le stress oxydatif a entrainé une augmentation de deux fois du taux de GJA1-20k, contrairement à l'expression de la FL-Cx43, qui est restée globalement stable (Figure 53).

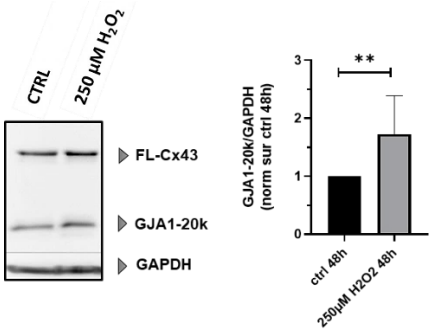


Figure 53 : Effet du stress oxydatif sur l'expression de GJA1-20k dans les cellules prostatiques métastatiques

Analyse par Western blot de l'expression de Cx43 totale (FL-Cx43) et de GJA1-20k après 48 h de culture en présence ou absence d'H_2O_2 à 250 µM, et quantification associée de l'expression de GJA1-20k par rapport à celle de la GAPDH. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 4). ** $p < 0.01$ à *** $p<0.001$.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle GJA1-20k agirait également comme une protéine de réponse au stress hypoxique (et oxydatif) dans les cellules métastatiques prostatiques, et que son induction semble reposer sur un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, possiblement lié à une traduction alternative.

3. Expression de GJA1-20k en condition de niche ostéogénique

La niche ostéogénique est composée de l'ensemble du microenvironnement osseux et est caractérisée par une forte hypoxie. Ce contexte constitue un milieu stressant auquel les ces cellules cancéreuses métastatiques doivent s'adapter pour survivre et éventuellement permettre de développer une tumeur secondaire. Afin de modéliser cette niche ostéogénique, les cellules ont été cultivées simultanément en présence d'ObCM et en condition d'hypoxie (1% d'O_2).

Compte-tenu des résultats précédents montrant qu'individuellement l'ObCM et l'hypoxie induisait significativement l'expression de GJA1-20k après 48 h, le même temps de culture a été utilisé pour évaluer l'effet combiné des deux conditions. Les résultats présentés en figure 54 confirment d'une part que l'hypoxie seule induit une augmentation significative de 5 fois de l'expression de GJA1-20k, et d'autre part qu'un traitement avec de l'ObCM augmente significativement l'expression de GJA1-20k de 16 fois. La combinaison des deux conditions a induit une augmentation significative d'expression, multipliée par 32 par rapport à la normoxie (Figure 54A et B).

Concernant la Cx43 totale (FL-Cx43), son expression n'a été que peu modifiée par l'hypoxie par rapport à son isoforme, tandis qu'en présence d'ObCM, elle a été augmentée de trois fois. La combinaison des deux n'a pas augmenté son niveau d'expression par rapport à l'ObCM seul, contrairement à son isoforme (Figure 54A et B).

Ainsi dans les conditions normoxiques, le taux de GJA1-20k, sur l'ensemble des signaux, n'est que de 26%, la cellule exprimant donc la Cx43 totale comme forme préférentielle. En revanche, lorsque les cellules sont en hypoxie ou en présence d'ObCM, les taux d'expression sont légèrement en faveur de GJA1-20k, 58% contre 42% pour la FL-Cx43, et 65% contre 35% respectivement. Fait intéressant, la niche ostéogénique (hypoxie + ObCM) reverse les taux de

connexine par rapport à une zone qui serait plus oxygénée, comme au niveau de la sortie des vaisseaux, où il est retrouvé à 82% la forme à l'isoforme GJA1-20 kDa (Figure 54C).

Aucune différence significative de la quantité d'ARNm de la Cx43 n'a été retrouvé entre les conditions de normoxie et d'hypoxie, comme précédemment. Par contre, des résultats devant être confirmés semblent montrer une tendance à l'augmentation lorsque les cellules sont en présence d'ObCM (Figure 54D).

En condition de normoxie, GJA1-20k représente seulement 26 % du signal total, indiquant une prédominance de la forme complète Cx43 totale. En hypoxie ou en présence d'ObCM, cette proportion s'inverse en faveur de GJA1-20k. Fait notable, la condition mimant la niche ostéogénique (hypoxie + ObCM) induit une inversion nette du profil d'expression, avec 82 % du signal correspondant à GJA1-20k.

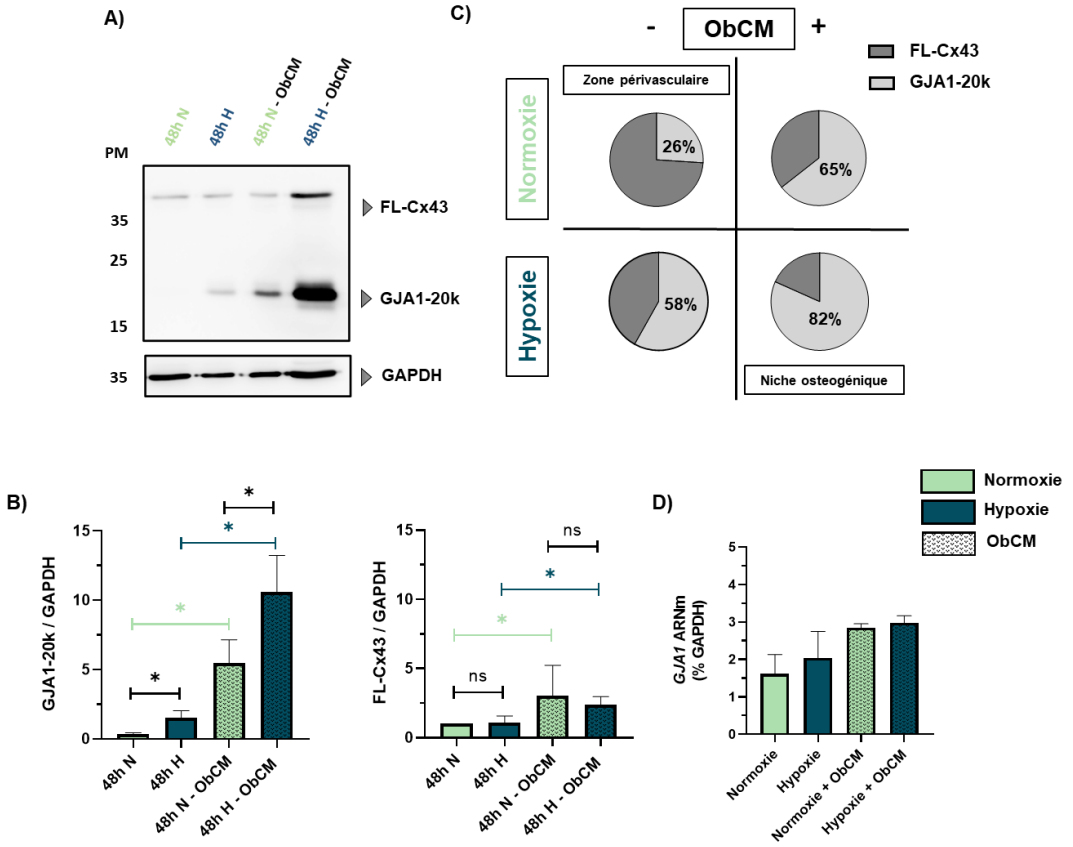


Figure 54 : Effet des conditions de la niche ostéogénique et de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k et de la Cx43 totale dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Western blot représentatif des niveaux d'expression de Cx43 totale (FL-Cx43) et de GJA1-20k dans les cellules PC3 après 48h de culture en normoxie ou hypoxie (1% d'O2) et en présence ou non d'ObCM, et **B)** quantification de l'intensité des signaux par analyse densitométrique sous ImageJ (N=3 ; * p< 0,05) **C)** Distribution moyenne du taux de GJA1-20k dans les différentes conditions, basée sur les résultats de Western blot. Les pourcentages indiquent le taux de GJA1-20k. **D)** Quantification par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm GJA1 dans les cellules PC3 après 48h de culture en condition normoxique ou hypoxique (N = 2). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt et gène de ménage.

4. Rôle de GJA1-20k dans l'adhérence aux ostéoblastes

Comme mentionné dans l'introduction, les ostéoblastes participent activement à l'établissement des cellules cancéreuses au sein de la niche métastatique osseuse, et entretiennent ensemble un cercle vicieux notamment par la sécrétion de facteurs solubles. Par ailleurs des interactions directes entre cellules cancéreuses et ostéoblastes ont également été mis en évidence, suggérant un rôle clef de l'adhérence dans l'adaptation des cellules tumorales à leur nouvel environnement.

Cette capacité des cellules tumorales à interagir directement avec les ostéoblastes a été évaluée par un test d'adhérence. Pour cela, des cellules PC3 marquées au DiL, un traceur fluorescent non-diffusible, ont été déposées sur un tapis cellulaire d'ostéoblastes à J5 de différenciation, jour de référence pour la récolte de milieu conditionné osseux. Après 2 h d'incubation, les cellules non adhérentes ont été éliminées par rinçage pour ne garder que celles ayant adhérées aux ostéoblastes. Le nombre de ces cellules adhérentes a été comptabilisé à l'aide d'un macroscope.

Dans ces conditions, les cellules surexprimant GJA1-20k présentent une adhérence significativement plus importante aux ostéoblastes, avec en moyenne 3 fois plus de cellules comptées sur le tapis cellulaire par rapport aux cellules contrôles (Figure 55).

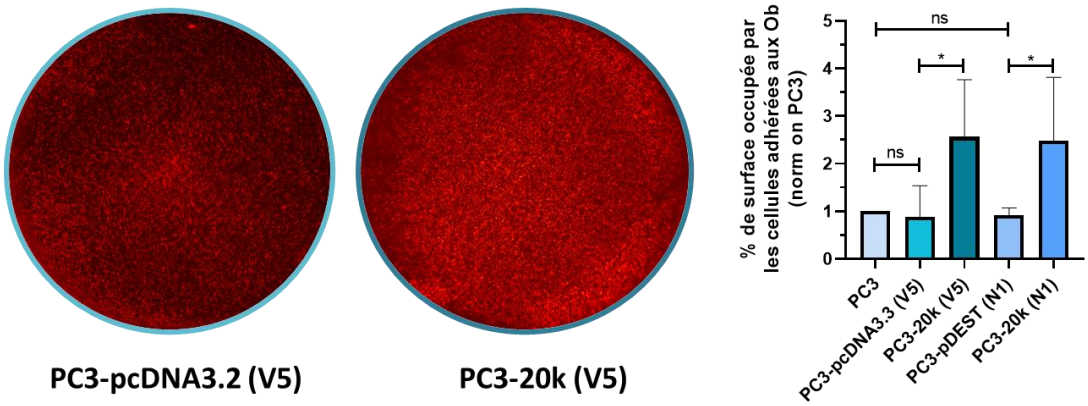


Figure 55 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'adhérence des cellules prostatiques métastatiques

Images représentatives des cellules PC3-pcDNA 3.2 et PC3-20k (V5) fluorescentes adhérentes sur les ostéoblastes après 2 h de co-culture. La quantification des résultats est exprimée en pourcentage de surface occupée par les cellules fluorescentes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3) * $p<0,05$.

La cadhérine-11 (cadhérine ostéoblastique ou OB-cadhérine) ayant été largement impliquée dans l'interaction entre cellules métastatiques osseuses et ostéoblastes, son niveau d'expression dans les différentes lignées a été recherché. L'analyse de son expression dans les cellules PC3 par Western blot fait apparaitre un doublet à 100 et 120 kDa. De façon intéressante, dans les cellules PC3-20k (V5) ou (N1) surexprimant GJA1-20k, seul le signal à 120 kDa est détecté alors que le doublet persiste dans les cellules contrôles respectives (Figure 56).

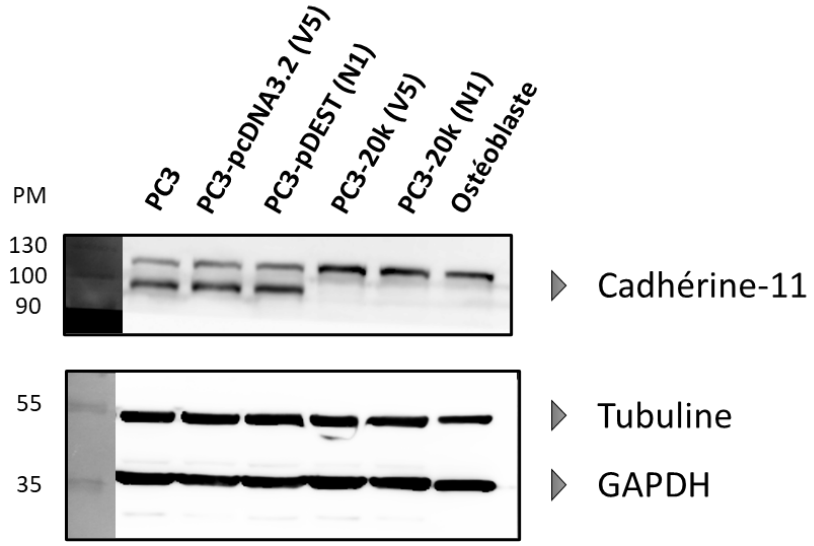


Figure 56 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression de la cadhérine-11 dans les cellules prostatiques métastatiques

Image représentative d'un Western blot pour analyser l'expression la cadhérine-11 à partir d'extraits protéiques totaux des différentes lignées PC3 cultivées pendant 48 h. Un contrôle ostéoblastique (50 µg) a également été utilisé dans le dernier puits. La GAPDH et la tubuline ont été utilisées comme contrôle de dépôt (N = 2).

Ces résultats montrent que la surexpression de GJA1-20k augmente l'adhérence des cellules tumorales prostatiques métastatiques aux ostéoblastes, corrélée avec une modification potentielle du profil d'expression de la cadhérine-11.

5. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur l'agressivité des cellules en présence d'ObCM

Afin d'évaluer l'impact de GJA1-20k, en présence de milieu conditionné osseux ou d'ostéoblastes sur la migration collective et l'invasion, les expériences précédentes (« *wound healing* » et chambre de Boyden) ont été reproduites avec les différentes lignées.

Comme attendu et observé précédemment, en condition contrôle (sans ObCM), la surexpression de GJA1-20k induit une diminution significative de la migration (Figure 57). En présence d'ObCM, le pourcentage de recouvrement de fermeture de la blessure passe de 61% à 71% après 12 h d'incubation, indiquant une stimulation de la migration cellulaire par l'environnement osseux.

La présence de l'ObCM a augmenté les capacités migratoires des PC3, toutefois l'effet est moindre pour les cellules surexprimant GJA1-20k.

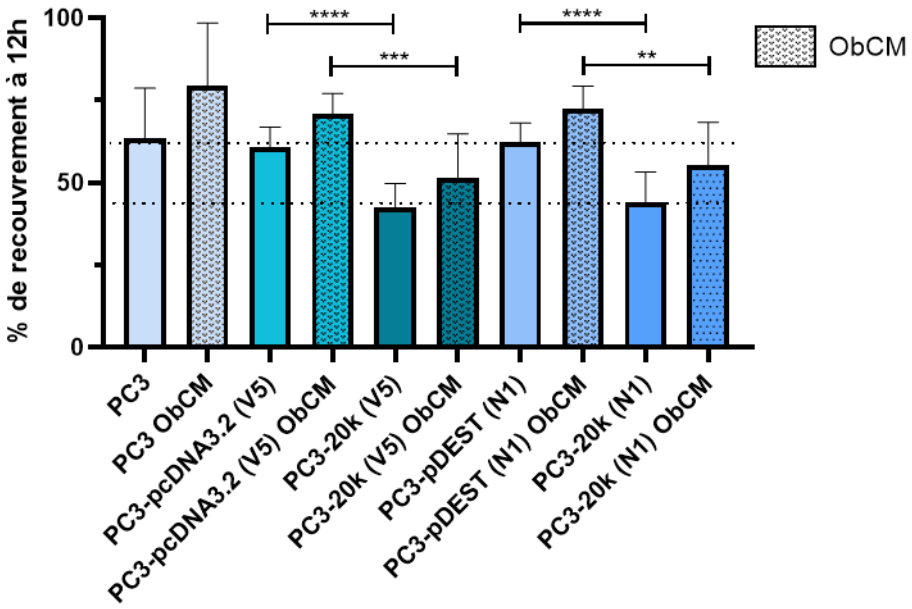


Figure 57 : Effet du microenvironnement osseux sur la migration des cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k

Quantification du pourcentage de recouvrement 12 h après la blessure, lors d'un test de migration collective (« wound healing »), par les différentes lignées PC3 en présence ou non d'ObCM. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; (N = 3, en quadruplicat). ** $p<0,01$ à **** $p<0.0001$.

Pour l'invasion, les résultats sont similaires à ce que l'on retrouve précédemment en condition contrôle. Par contre le nombre de cellules invasives est un peu plus élevé en présence d'ostéoblastes, d'environ 20%. En présence de ces ostéoblastes, la migration des cellules surexprimant GJA1-20k reste inférieure, par rapport à leur contrôle respectif (Figure 58).

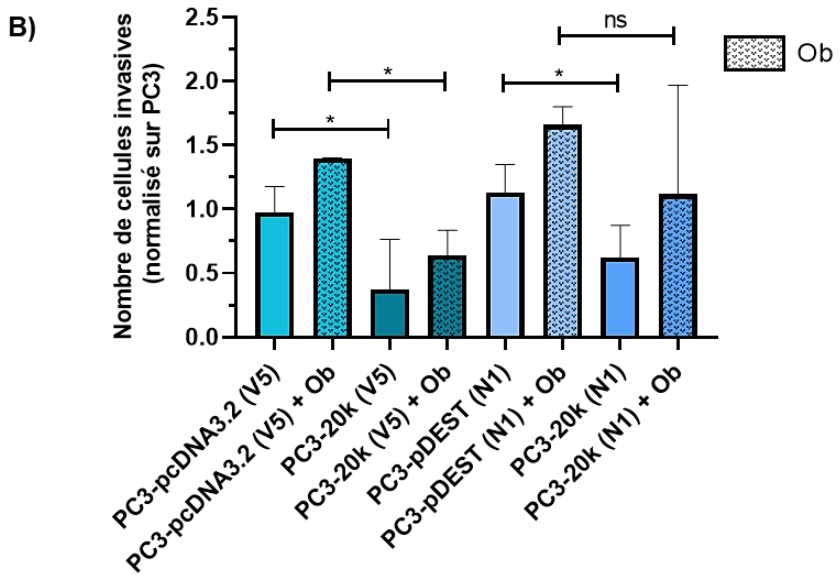


Figure 58 : Effet du microenvironnement osseux sur l'invasion des cellules prostatiques métastatiques surexprimant GJA1-20k

Histogramme représentant la quantification du nombre de cellules invasives pour chaque lignée, en présence ou en absence d'ostéoblastes (Ob). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3). *p<0,05.

Ces résultats suggèrent que GJA1-20k limite non seulement la migration intrinsèque des cellules tumorales, mais atténue également leur réponse aux signaux pro-migratoires et pro-invasives de la niche osseuse.

6. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la quiescence cellulaire

La niche ostéogénique facilite l'entrée et le maintien des cellules tumorales en phase de dormance, notamment grâce à la sécrétion de facteur impliqués dans le bone homing, et la présence d'ostéoblastes (Dai *et al.*, 2022).

Afin d'étudier le rôle de GJA1-20k dans ce processus de mise en quiescence, des expériences de détection du Ki67 par immunomarquage ont été réalisées sur les cellules PC3-20k(V5) cultivées 48 h en normoxie et en hypoxie. Ki67 est une protéine nucléaire exprimée uniquement dans les cellules en prolifération et absente en G0 (quiescence). En condition de normoxie, la surexpression de GJA1-20k dans les cellules PC3 entraine une diminution de 10% du nombre de cellules Ki67 positives. En condition d'hypoxie cet effet s'accentue avec une diminution de 30% du nombre de cellules Ki67 positives pour les PC3-20k (V5). L'hypoxie a également un effet sur les cellules contrôles avec une diminution de 20% du marquage (Figure 59).

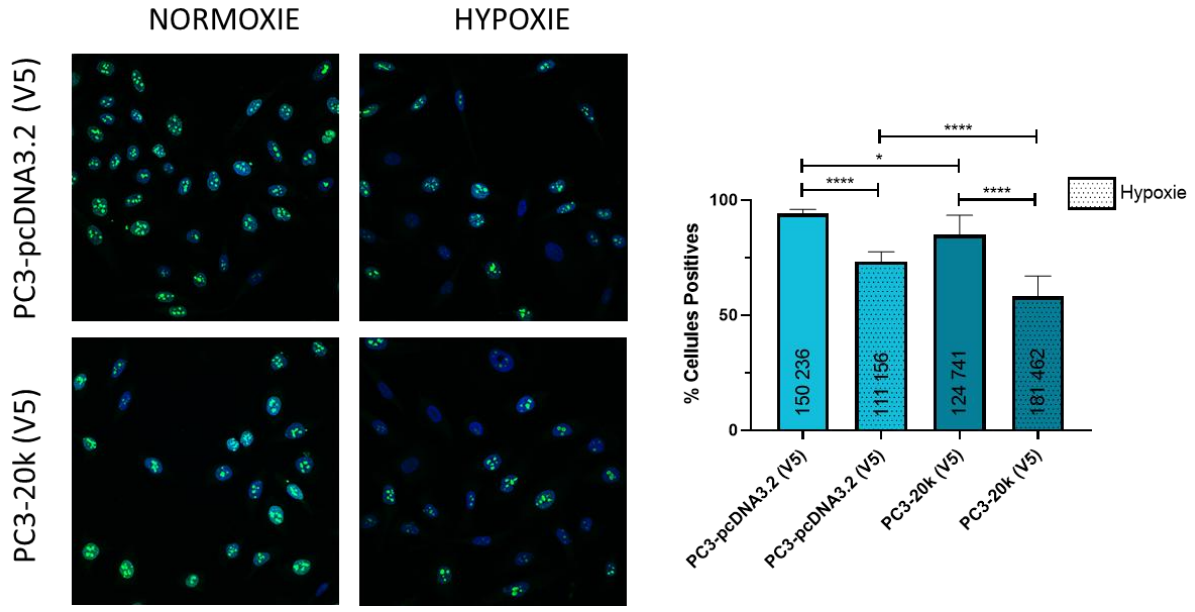


Figure 59 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur la prolifération des cellules prostatiques métastatiques

Images représentatives de cellules Ki67 positives (vertes) et négatives (bleu, noyaux contre-colorés au DAPI) et quantification correspondante dans les lignées PC3-pcDNA3.3 et PC3-20k (V5). Les expériences ont été réalisées en condition de culture en normoxie et hypoxie (barres avec pointillés) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 4). * $p<0,05$ à **** $p<0,0001$. Le nombre total de cellules comptabilisées est indiqué à l'intérieur des barres.

Ce résultat est confirmé par l'analyse de la protéine p21, dont l'expression favorise l'entrée en quiescence, notamment des cellules PC3 (Gulappa *et al.*, 2013). Après 72 h de culture, les résultats montrent clairement une augmentation de l'expression de p21 dans les cellules PC3-20k d'un facteur 2 et 2,5 en normoxie et en hypoxie respectivement, par rapport aux cellules contrôles (Figure 60).

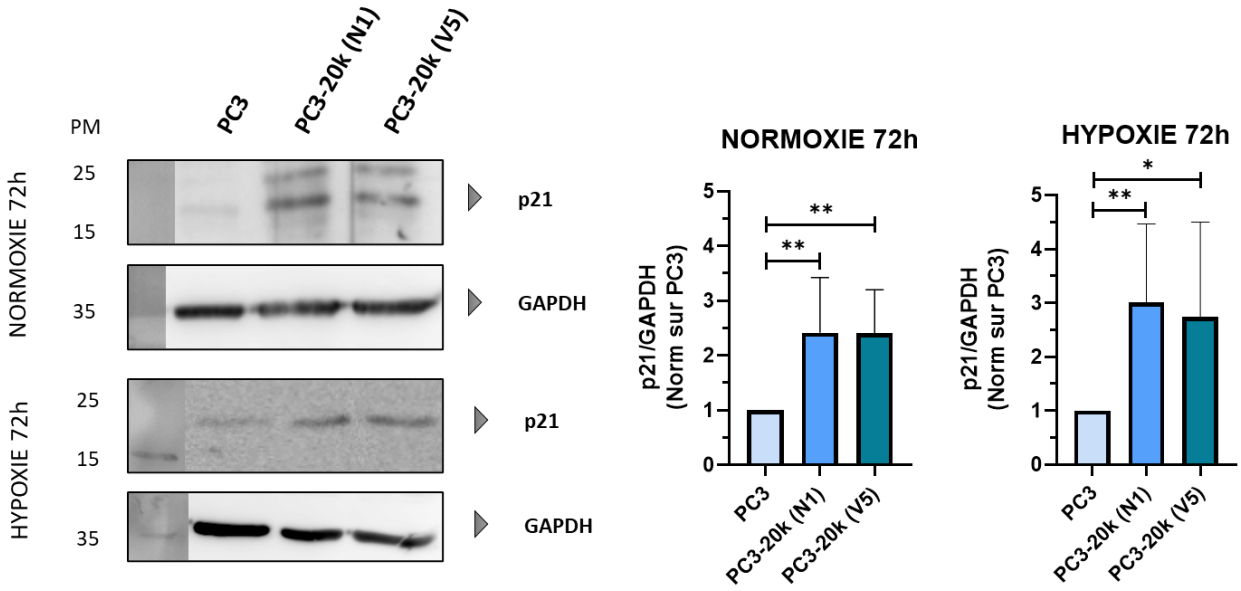


Figure 60 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur l'expression de p21 dans les cellules prostatiques métastatiques

Western blot représentatif des niveaux d'expression de p21 après 72h de culture en normoxie ou hypoxie (1% d'O_2) dans les différentes lignées PC3 avec quantifications correspondantes. La GAPDH a servi de contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 5). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

Afin de confirmer cet effet sur la quiescence, l'expression d'un récepteur tyrosine kinase appelé Axl a été étudié. En effet, ce récepteur membranaire, exprimé par les cellules cancéreuses métastatiques prostatiques au sein de la niche osseuse, interagit avec son ligand Gas6 sécrété par les ostéoblastes, et active des voies de signalisation favorable à la mise en quiescence. De manière très intéressante, la surexpression de GJA1-20k augmente l'expression d'Axl, qui se retrouve exclusivement dans la fraction membranaire après fractionnement, de 43% pour les PC3-20k (N1) et de 65% pour les cellules PC3-20k (V5) cultivée en normoxie pendant 48 h (Figure 61).

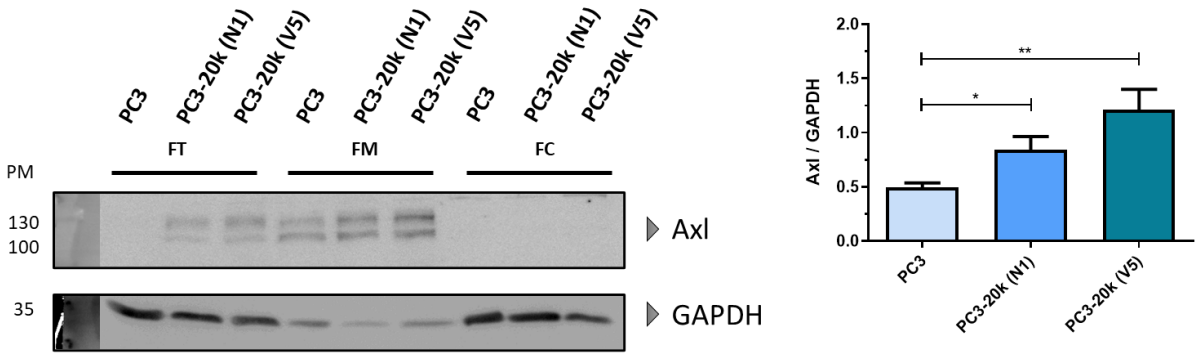


Figure 61 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur l'expression du récepteur membranaire Axl dans les cellules prostatiques métastatiques

Western blot représentatif des niveaux d'expression d'Axl dans les cellules PC3 cultivées pendant 48h en normoxie et réalisé à partir d'échantillons séparés en fraction membranaire (FM), en fraction cytoplasmique (FC) et en fraction totale (FT), et quantification correspondante. La GAPDH a servi de contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 4, triplicat). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

Enfin, l'analyse des différentes phases du cycle cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux dans les lignées PC3-pcDNA3.2 et PC3-20k (V5) (Figure 62). Les résultats indiquent que la surexpression de GJA1-20k seule n'induit pas de changement de répartition cellulaire dans les différentes phases du cycle en condition de normoxie. La proportion de cellules PC3 en phase G0 n'est pas significativement modifié. A l'inverse, la condition hypoxique induit une augmentation de 20% du nombre de cellules en phase G0 lorsque les cellules surexpriment GJA1-20k contrairement aux cellules contrôles (Figure 62D).

Ces résultats suggèrent que GJA1-20k inhibe la prolifération et induit la mise en quiescence des cellules cancéreuses prostatiques en stimulant notamment l'expression de p21 et Axl.

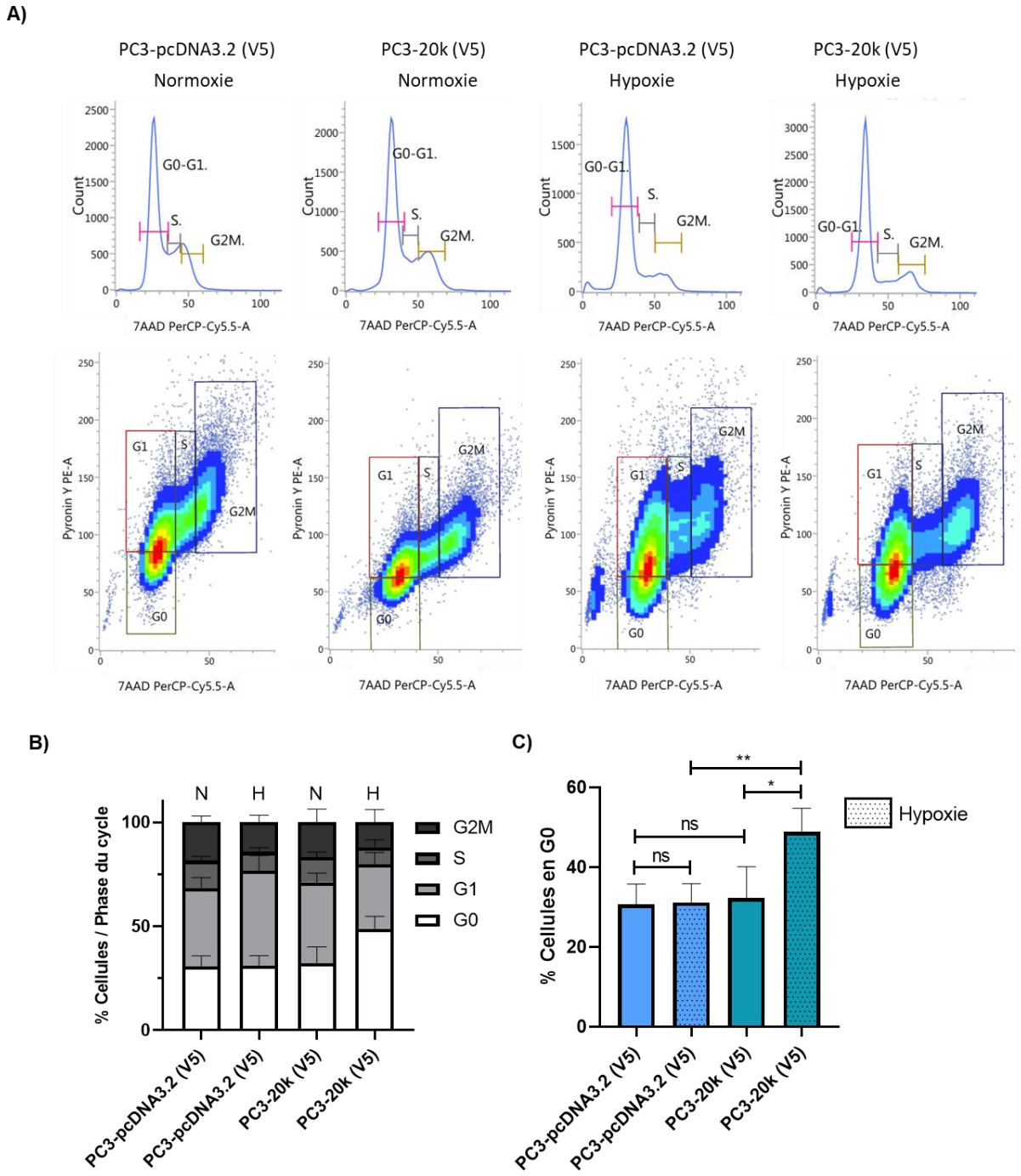


Figure 62 : Effet de la surexpression de GJA1-20k et de l'hypoxie sur la répartition des cellules prostatiques métastatiques dans le cycle cellulaire

A) Analyse par cytométrie en flux, après coloration au Hoechst (ADN) et à la pyronine Y (ARN), de l'état dans le cycle des cellules PC3-20k (V5) et des cellules contrôles cultivées en conditions normoxie et en hypoxie pendant 48 h. **B)** Répartition en pourcentage des cellules PC3-20k (V5) et des cellules contrôles selon les différentes phases du cycle cellulaire. N = normoxie et H = hypoxie **C)** Histogramme représentant le pourcentage de cellules PC3-20k (V5) et de cellules contrôles en phase G0 en conditions de culture normoxique ou hypoxique pendant 48 h. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD (N =4). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

7. Impact de du microenvironnement osseux sur la dynamique mitochondriale

La surexpression de GJA1-20k a redistribué les mitochondries en périphérie cellulaire (cf partie II-5)). Les mêmes expériences ont été reproduites, mais cette fois-ci en condition de niche ostéogénique, en comparant l'effet sur la normoxie et hypoxie en présence ou non d'ObCM sur la lignée PC3 (Figure 63).

L'hypoxie induit une diminution de 40% de l'intensité du signal de TOM20 par rapport à la normoxie. L'ObCM a induit une baisse de 30%, et la combinaison des deux de 40% (Figure 63A). La surexpression de GJA1-20k a également induit une diminution de 30% du signal. Par contre, l'hypoxie sur les lignées PC3-20k n'a pas induit de baisse d'intensité du signal par rapport à la normoxie (Figure 63B).

L'analyse de la distribution du signal de TOM20 selon le grand axe de la cellule montre une relocalisation des mitochondries d'environ 10% vers la périphérie du noyau en présence de milieu conditionné osseux et d'hypoxie, et de 15% en combinaison (Figure 63C).

La co-immunoprécipitation de TOM20 avec un anticorps ciblant la partie C-terminale de la Cx43 a montré une augmentation de cette co-immunoprécipitation en hypoxie et en présence d'ObCM, mais surtout lorsque les deux sont combinés (Figure 63D).

Ces résultats montrent que la répartition mitochondriale en périphérie est dépendante du taux de GJA1-20k présent dans la cellule. Les conditions de niche ostéogénique favorisent donc une meilleure distribution des mitochondries.

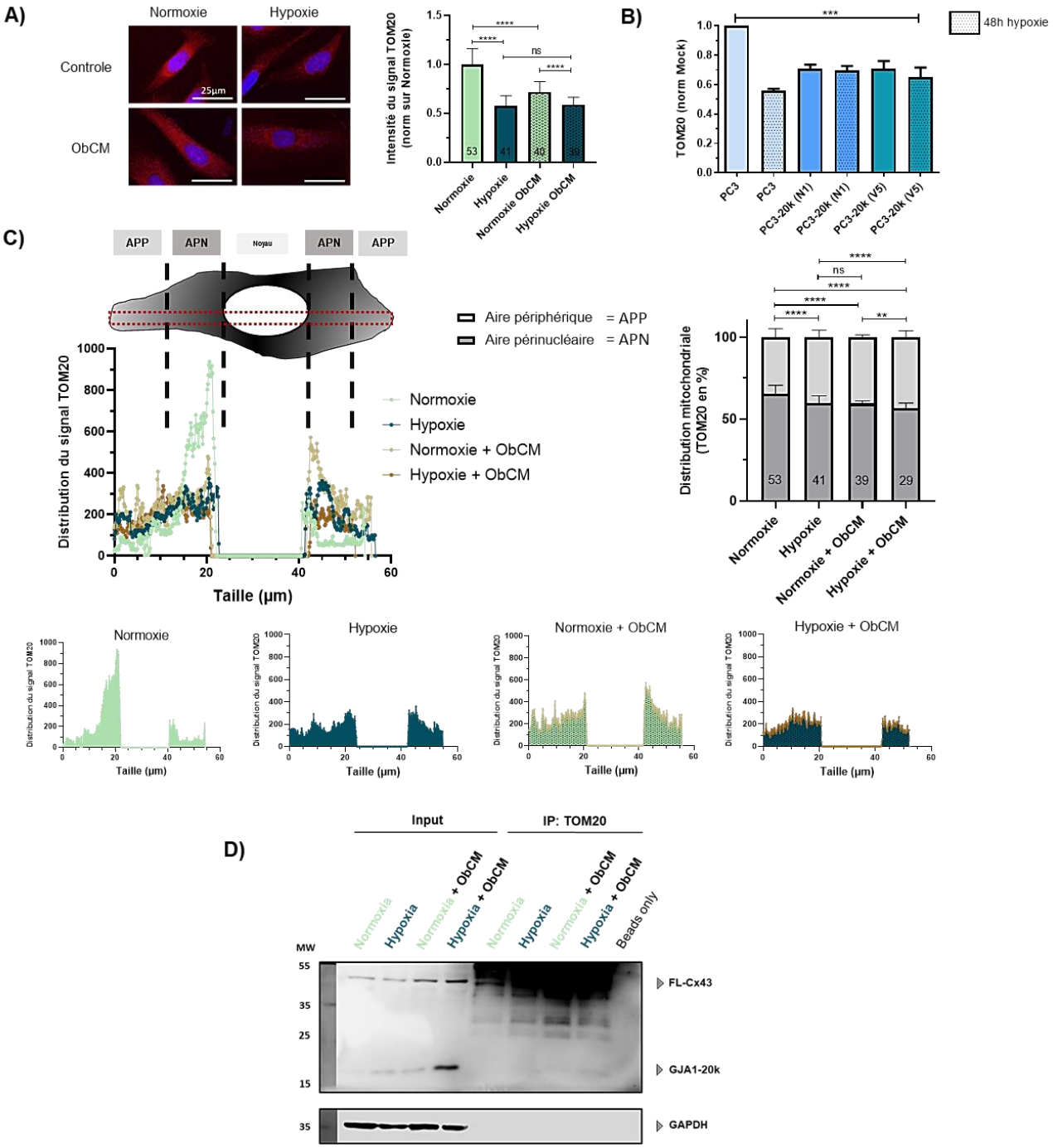


Figure 63 : Effet des conditions de la niche ostéogénique et de l'hypoxie sur la distribution mitochondriale dans les cellules prostatiques métastatiques

A) Images représentatives de l'immunomarquage du TOM20 (rouge) et des noyaux (DAPI, bleu) dans les cellules PC3 après acquisition en Z-stack, et quantification du signal sur l'ensemble la cellule après 48 h de culture en normoxie, en hypoxie, en présence ou en absence d'ObCM (échelle 25 µm). **B)** Quantification de l'expression de TOM20 dans les cellules PC3 et PC3-20k cultivées 48 h en normoxie et en hypoxie **C)** Analyse de la distribution des mitochondries en périphérie (APP) et en périnucléaire (APN), basée sur l'expression de TOM20, dans les cellules PC3 cultivées 48 h de culture en normoxie, en hypoxie, en présence ou en absence d'ObCM. **D)** Image représentative de co-immunoprécipitation entre la protéine Tom20 et la Cx43après 48h de normoxie/hypoxie, en présence ou absence d'ObCM. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD (N=3) ** p<0,05 à **** p<0,0001.

8. Impact de la surexpression de GJA1-20k sur la signature calcique

Une composante non négligeable de la niche ostéogénique correspond à la concentration calcique pouvant varier très significativement selon la localisation au sein du tissu osseux.

De précédentes observations au laboratoire sur le profil calcique des cellules LNCaP ont permis d'observer que la surexpression de Cx43 dans cette lignée augmente le nombre d'oscillations calciques spontanées par rapport à la lignée contrôle. La lignée LNCaP-Cx43 exprimant également l'isoforme à 20 kDa, nous avons souhaité analyser l'effet spécifique de GJA1-20k sur l'activité calcique intracellulaire des cellules métastatiques osseuses de la lignée PC3.

Dans ce contexte, le profil calcique des cellules PC3 surexprimant GJA1-20k ou non a été analysé à l'aide de la sonde Fluo4 (Figure 64). Dans un milieu contenant 1,8 mM de [Ca^{2+}], les résultats montrent clairement que les cellules PC3-20k présentent un nombre d'oscillations calciques plus élevé que les cellules PC3 contrôles (Figure 65).

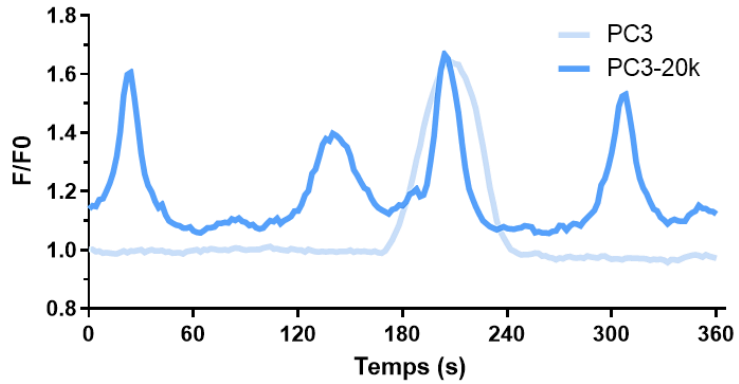


Figure 64 : Profil calcique spontané des cellules PC3 et PC3-20k

Exemple représentatif du profil calcique sur une période de 360s des cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k en présence de 1,8 mM de calcium extracellulaire. F/F0 représente la différence d'intensité du signal fluorescence au temps t (F) par rapport au temps 0 (F0). N = 5.

De manière intéressante, cette augmentation du nombre d'oscillations calciques spontanées par cellule persiste en absence de calcium extracellulaire, ce qui suggère une mobilisation accrue des réserves intracellulaires (Figure 65B). De plus, le pourcentage de cellules présentant des

oscillations est également majoré par la surexpression de GJA1-20k. Ainsi, en présence de calcium, le pourcentage de cellules oscillantes atteint 90 % et 81% pour les lignées V5 et N1 respectivement, contre 36% pour la lignée contrôle. En absence de calcium, ce pourcentage reste élevé (67% et 72% pour V5 et N1, contre 44% pour le contrôle ; Figure 65C).

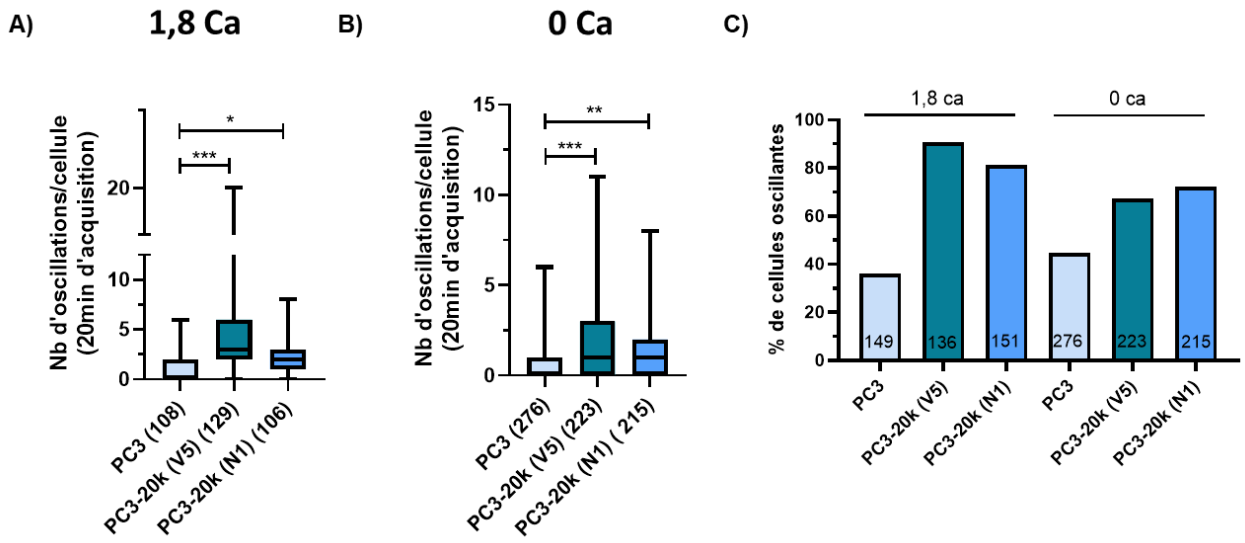


Figure 65 : Effet de la surexpression de GJA1-20k sur le profil calcique des cellules métastatiques prostatiques

A) Quantification du nombre d'oscillations par cellule sur une période de 20min d'acquisition en présence de calcium extracellulaire (N = 3). **B)** Quantification du nombre d'oscillations par cellule sur une période de 20min d'acquisition sans calcium extracellulaire (N = 5). **C)** Quantification du pourcentage de cellules présentant des oscillations calciques spontanées. Le nombre total de cellules testées est indiqué à l'intérieur des barres. * p <0,05 à *** p<0,001.

Le nombre d'oscillations est donc significativement plus élevé dans les cellules surexprimant GJA1-20k, bien qu'aucune différence notable ne soit observée concernant l'intensité du pic calcique. Afin d'identifier la source du calcium mobilisé, un inhibiteur des récepteurs à l'IP3, la Xestospongine C (XeC), a été utilisé à 7 µM. L'ajout de XeC entraîne une diminution significative du pourcentage de cellules oscillantes, avec une augmentation du nombre de cellules non oscillantes à 88% et 99% pour V5 et N1 respectivement, dans les 5 minutes suivant le traitement (Figure 66).

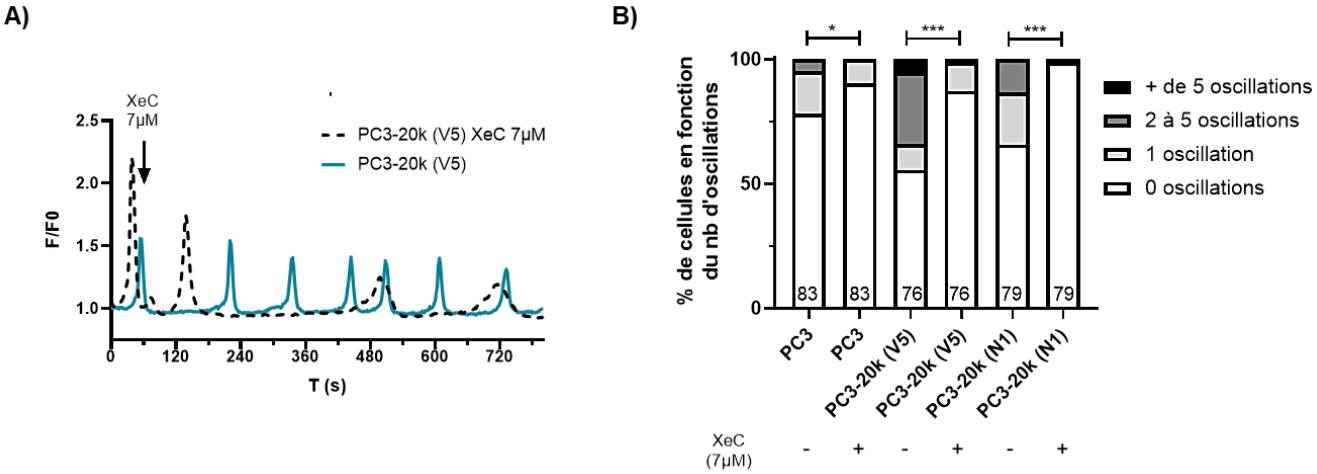


Figure 66 : L'expression de GJA1-20k modifie le profil calcique des cellules métastatiques prostatiques

A) Exemples de profil calcique des cellules PC3-20k (V5) en présence de 1,8 mM de calcium (bleu) sans ou après ajout de Xestospongine C (XeC) à 7µM après 60 s (pointillés). **B)** Répartition des cellules des différentes lignées en fonction de leur nombre d'oscillations mesurées sur une période de 5min avant (-) et après (+) ajout de XeC. (N = 3). Le nombre total de cellules testées est indiqué à l'intérieur des barres. * $p<0,05$ à *** $p<0,001$.

Ces résultats suggèrent que GJA1-20k peut moduler la réponse calcique en mobilisant les réserves intracellulaires de calcium des cellules métastatiques prostatiques.

DISCUSSION

L'objectif de ces travaux de thèse visaient à explorer les potentiels rôles de l'isoforme courte majoritaire de la connexine 43, GJA1-20k, dans le cadre du cancer prostatique métastatique osseux. Cette étude s'est construite selon trois axes principaux, en fonction des rôles peu nombreux déjà identifiés de cette isoforme notamment dans le modèle cardiaque.

Le choix de l'utilisation de la lignée PC-3 comme modèle d'étude s'est basé sur plusieurs critères : 1- Il s'agit d'une lignée cancéreuse humaine d'origine prostatique dérivée d'une métastase osseuse ; 2- Les cellules PC3 présentent un défaut d'exportation membranaire de la Cx43 ; 3- Les cellules PC3 expriment un niveau basal de GJA1-20k faible par rapport à d'autres lignées cancéreuses prostatiques telles que les cellules LNCaP (Govindarajan *et al.*, 2002; Wang, Berthoud and Beyer, 2007; Lamiche *et al.*, 2012; Boucher, 2018). Des transfections stables ont été réalisées pour surexprimer GJA1-20k, à l'aide de deux plasmides différentes appelés « N1 » et « V5 », déjà utilisées dans d'autres modèles pathologiques, afin d'étudier sa fonction (Smyth and Shaw, 2013). L'utilisation initiale du plasmide (N1) a permis d'obtenir une lignée de cellules PC3 exprimant une protéine de fusion GJA1-20k–mCherry de 48 kDa (20 kDa + 28 kDa). L'intérêt d'une telle construction est de pouvoir localiser et de suivre GJA1-20k dans la cellule par microscopie confocale. L'inconvénient est la taille de cette protéine (qui représente plus de deux fois celle de GJA1-20k) pouvant potentiellement introduire un biais expérimental, notamment un encombrement stérique susceptible d'altérer sa localisation subcellulaire ou ses interactions protéiques. De plus, ce plasmide code potentiellement pour deux autres isoformes ce qui pourrait être problématique pour l'interprétation des résultats. Pour éviter ces contraintes, une seconde lignée a été développée par transfection stable d'un autre plasmide (V5) qui code pour une protéine de fusion composée de GJA1-20k et de l'étiquette V5 (ou TagV5) ayant un poids moléculaire de 1,4 kDa (Protéine de fusion de 21,4 kDa : 20 kDa + 1,4 kDa), ce qui limite l'impact sur la structure et les fonctions de GJA1-20k. Cette étiquette permet également la détection de la protéine de fusion par immunomarquage ou des expériences d'immunoprécipitation par l'utilisation d'anticorps anti-V5. L'autre avantage de cette transfection, est qu'elle code uniquement pour GJA1-20k, les codons start des autres isoformes étant mutés. Que cela soit pour les cellules PC3-20k (N1) ou (V5), l'expression de GJA1-20k est trois fois supérieure à celle des cellules contrôles (transfectées avec le vecteur vide).

Cette double approche renforce la robustesse de nos conclusions et soutient la spécificité des phénotypes observés, d'autant plus que ces deux lignées ont un taux de GJA1-20k quasiment identique, avec une surexpression modérée/physiologique par rapport au niveau endogène.

I- GJA1-20k joue-t-elle un rôle de protéine chaperonne pour la Cx43 totale comme dans les modèles cardiaques et nerveux ?

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle de protéine chaperonne de GJA1-20k pour la Cx43, démontré pour la première fois dans des cardiomyocytes (Smyth and Shaw, 2013). Un immunomarquage spécifique de la partie N-terminale de la Cx43, où seule l'isoforme FL-Cx43 est révélée, nous a permis d'observer dans les lignées surexprimant GJA1-20k, qu'elle colocalise avec la flotilline-1, utilisée comme marqueur membranaire. Cette localisation membranaire a également été confirmée quantitativement par Western blot, en séparant la fraction membranaire de la fraction soluble. Il convient toutefois de noter que cette deuxième technique sépare les protéines cytosoliques, de toutes les membranes, y compris celles des organites où peut être retrouvée la Cx43, comme le RE, le Golgi et la membrane interne mitochondriale, ce qui peut expliquer le pourcentage élevé de Cx43 membranaire dans les lignées contrôles (60%). Il serait donc pertinent de compléter ces expériences par des expériences de biotinylation de surface qui permettrait d'étudier spécifiquement les protéines de la membrane plasmique. Cette approche avait déjà révélé, dans les cellules PC3 surexprimant Cx43, l'absence de signal membranaire détectable par Western blot (Boucher, 2018).

L'évaluation de la fonctionnalité des canaux et hémicanaux formés par la Cx43 constitue un indicateur essentiel pour sa localisation, puisque ces structures ne sont fonctionnelles qu'à la membrane plasmique. Dans nos conditions expérimentales, les capacités de communication ont été multipliées par un facteur quatre, confirmant ainsi la présence fonctionnelle de Cx43 à la membrane plasmique. De façon similaire, la présence de GJA1-20k dans les cellules endothéliales de cerveau de souris, a amélioré la fonctionnalité de la Cx43 en augmentant sa présence à la membrane plasmique (Phillips *et al.*, 2023)

Nous avons complété cette étude en surexprimant la GJA1-20k dans les cellules PC-3 qui surexpriment stablement la Cx43 (PC3-Cx43 ; PC3-Cx43-pDEST (N1) et PC3-Cx43-pcDNA3 .2 (V5)) pour donner les cellules PC3-Cx43-20k (N1) et (V5). Ces cellules PC3-Cx43 contrôles

présentent une localisation majoritairement cytoplasmique de la Cx43. La surexpression de GJA1-20k a pour effet d'augmenter l'activité hémicanal par 16 et la fonctionnalité canal par 13 par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que GJA1-20k permettrait l'adressage membranaire d'un taux de Cx43 encore plus élevé lorsque les cellules surexpriment la Cx43 (Figure 67), confirmant les résultats obtenus au cours de la thèse du Dr Jonathan Boucher.

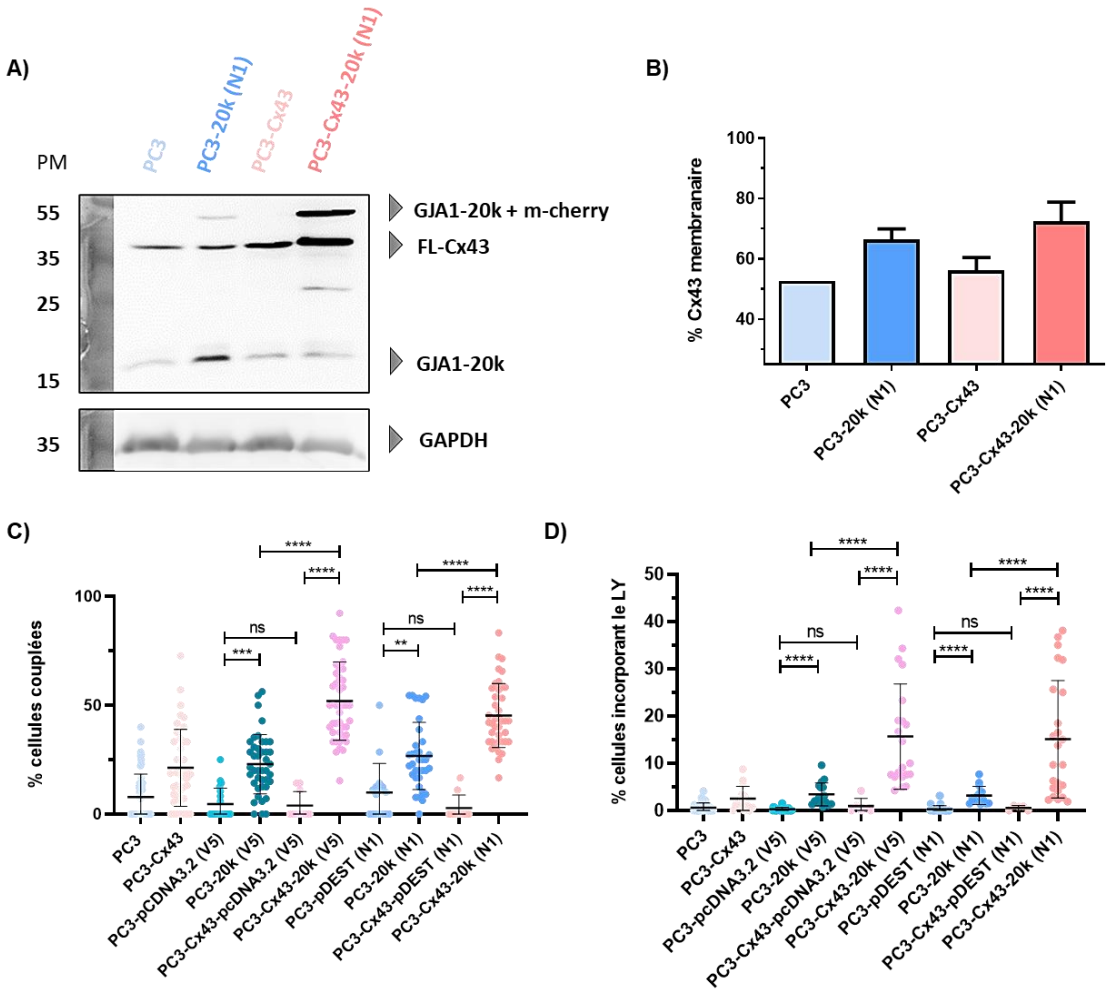


Figure 67 : La surexpression de la Cx43 et de GJA1-20k augmente la fonctionnalité des hémicanaux et canaux jonctionnels des cellules métastatiques prostatiques

A) Western blot représentatif montrant l'expression, de Cx43 (43 kDa), de GJA1-20k (20 kDa) et de la protéine de fusion GJA1-20k/m-cherry (48 kDa) dans les cellules contrôles et contrôles surexprimant la Cx43 (PC3 et PC3-Cx43) et les cellules surexprimant GJA1-20k (PC3-20k (N1) et surexprimant les deux (PC3-Cx43-20k (N1)). **B)** Analyse du pourcentage de Cx43 totale et de GJA1-20k dans la fraction membranaire (FM) (moyenne ± SD, N = 2). **C)** Quantification du pourcentage de cellules couplées évalué par le test de parachute, réalisé 7h après le dépôt des cellules donneuses (moyenne ± SD ; N = 3). **D)** Quantification du nombre de cellules ayant capté le Lucifer Yellow (LY) (moyenne ± SD ; N = 3). ** p<0,01 à **** p<0,0001.

GJA1-20k a été retrouvée présente dans les membranes et notamment celles du RE et de l'appareil de Golgi, son implication dans le transport antérograde de la Cx43 ayant été démontré dans les cardiomyocytes, les cellules HEK293T et NMuMG (Smyth and Shaw, 2013; James *et al.*, 2018). Dans ces cellules, la surexpression de GJA1-20k et l'inhibition de mTOR, a augmenté la localisation de Cx43 au niveau de la membrane plasmique associée à une amélioration du couplage cellulaire. Réciproquement, l'inhibition de l'expression de GJA1-20k par le TGF-β1, a induit une baisse de l'oligomérisation et une rétention des vésicules contenant les Cx43 près du Golgi (Smyth and Shaw, 2013; James *et al.*, 2018). Ces résultats et ceux que nous avons obtenus suggèrent que, dans les cellules cancéreuses métastatiques prostatiques, GJA1-20k joue un rôle clef dans la régulation du trafic intracellulaire et donc permettrait de réguler la fonctionnalité de la Cx43 et donc de la communication cellulaire. Il serait pertinent d'examiner plus précisément la localisation subcellulaire de GJA1-20k et son impact sur la dynamique des vésicules contenant la Cx43 dans ce contexte tumoral.

La cause de la délocalisation des connexines, telles que la Cx43, observée dans les cellules PC-3 comme dans d'autres modèles hormono-indépendants, n'est pas encore parfaitement élucidée. Elle pourrait résulter d'une expression altérée de certaines molécules d'adhérence, notamment les cadhérines ou les caténines. En particulier, l'α-caténine a été décrite comme facilitant l'adressage membranaire et l'assemblage des connexines Cx43 et Cx32 (Govindarajan *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2013). Nos travaux ont mis en évidence une altération de l'expression des cadhérines E et 11, suggérant que la modulation de leur expression par GJA1-20k pourrait constituer un mécanisme de régulation du trafic de la connexine 43, ou du moins y contribuer. Le rôle de protéine chaperonne de GJA1-20k se limiterait-il uniquement à la Cx43, ou pourrait-elle également impacter le trafic d'autres protéines membranaires, comme la Cx32, ou d'autres cadhérines ? Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que GJA1-20k a été impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et du transport vésiculaire, des processus communs à l'adressage de nombreuses protéines à la membrane plasmique (Basheer *et al.*, 2017). Il n'est donc pas exclu qu'elle puisse agir comme chaperonne pour d'autres partenaires de la Cx43, ou plus largement participer à la dynamique de trafic de complexes d'adhérence ou de jonctions intercellulaires.

Par ailleurs, GJA1-20k pourrait également moduler le temps de demi-vie de la Cx43, estimé entre 1 et 5 heures. Le TGF-β1 active la voie Erk (MAPK), connue pour réduire la stabilité membranaire de la Cx43 et favoriser sa dégradation via la phosphorylation des sérines 255, 279

et 282 situées sur sa région C-terminale (Warn-Cramer *et al.*, 1998). De plus, le TGF-β entraîne une inhibition de l'expression de GJA1-20k ainsi qu'une diminution de l'oligomérisation des Cx43 (James *et al.*, 2018). Il paraît donc plausible que l'activation concomitante des voies Erk1/2 et Smad1/2 par le TGF-β, conduisant à une baisse d'expression de GJA1-20k, réduise la stabilité membranaire de la Cx43 et favorise sa dégradation, impactant ainsi directement son temps de demi-vie.

GJA1-20k agit comme une protéine chaperonne en modulant la dynamique du cytosquelette, grâce à ses domaines de liaison à l'actine et aux microtubules. (Smyth *et al.*, 2012; Basheer *et al.*, 2017; Baum *et al.*, 2025). Ce rôle a été décrit notamment en contexte ischémique, où la désorganisation du réseau d'actine compromet le transport vésiculaire de la Cx43 et donc le couplage cardiaque dans les cardiomyocytes. GJA1-20k interagit directement avec l'actine, via un motif RPEL, afin de remodeler le réseau, ce qui entraîne la stabilisation des filaments d'actine et à la formation de points d'actine. GJA1-20k par son rôle de protéine de coiffage de l'actine (*actin capping protein*) se lie à l'extrémité libre d'un filament d'actine pour empêcher l'ajout ou la perte de monomères d'actine à cette extrémité (Cooper and Sept, 2008; Baum *et al.*, 2025). Elle module alors la dynamique des filaments d'actine (F-actine) en « coiffant » ou limitant l'extrémité de croissance des filaments d'actine. Les points d'actine où les vésicules de Cx43 se fixent, servent d' « aire de repos » pour les microtubules, tandis que les fibres de F-actine orientent les microtubules vers le bord de la cellule. Dans le cadre du cancer, le rôle d'actin capping-protein peut notamment servir au processus de prolifération, migration et d'invasion (Wei *et al.*, 2023).

Au laboratoire, des données préliminaires obtenues par immunomarquage à la phalloïdine suggèrent une réorganisation du réseau d'actine, caractérisée par des filaments plus longs et orientés vers la périphérie cellulaire. Cela pourrait avoir comme conséquence de favoriser le trafic intracellulaire de Cx43 ou de modifier la polarité cellulaire. Une quantification du ratio actine G/F par fractionnement subcellulaire suivie d'une analyse par Western blot permettrait de confirmer ces résultats et de préciser l'effet de GJA1-20k sur la dynamique du cytosquelette dans les cellules prostatiques métastatiques.

De manière plus générale, il serait intéressant d'explorer si GJA1-20k interagit avec d'autres protéines liées au cytosquelette, comme la Cx43 via son domaine C-terminal, ainsi qu'avec des protéines motrices ou adaptatrices associées aux microtubules, qui régulent le trafic

intracellulaire. Il serait également pertinent d'étudier ses interactions avec des protéines assurant le couplage entre l'actine et les microtubules, un mécanisme crucial pour le contrôle de la forme et de la polarité des cellules, ainsi que pour la division et la migration cellulaire.

Une revue récente, émet l'hypothèse qu'une interaction directe entre la GJA1-20k et la Cx43 serait possible via les domaines C-terminaux. La dimérisation de GJA1-20k permettrait d'accomplir plusieurs fonctions simultanément sans interférence. En formant des dimères, différentes populations de GJA1-20k peuvent agir comme intermédiaires pour relier plusieurs protéines, ce qui facilite la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'alignement des microtubules parallèlement à l'actine, et le transport des vésicules contenant Cx43 vers les domaines membranaires appropriés. Cette dimérisation favoriserait également le recrutement d'actine autour des mitochondries et la formation de sites de constriction, chaque population de GJA1-20k assumant des rôles distincts, ce qui explique la polyvalence fonctionnelle de cette isoforme dans la régulation du cytosquelette, du trafic intracellulaire et de la dynamique mitochondriale (Maalouf *et al.*, 2024). De plus, des expériences préliminaires de co-immunoprécipitation de Cx43 au laboratoire ont montré que, lorsque l'extrait protéique est enrichi avec des anticorps dirigés contre le domaine N-terminal et détecté avec des anticorps dirigés contre le domaine C-terminal, l'intensité du signal correspondant à GJA1-20k augmente proportionnellement à son expression dans la lignée PC-3. C'est-à-dire qu'en présence d'ObCM, comme il y a plus de GJA1-20k, on retrouve un signal plus intense. Ces résultats suggèrent une possible interaction entre GJA1-20k et la Cx43 totale.

L'ensemble de nos résultats montrent que GJA1-20k joue le rôle de protéine chaperonne pour la Cx43 dans les cellules cancéreuses prostatiques métastatiques, comme cela a été démontré dans les modèles cardiaques et nerveux.

II- GJA1-20k est-elle capable de modifier les capacités métastatiques des cellules tumorales prostatiques ?

La surexpression de GJA1-20k a impacté plusieurs processus impliqués dans la cascade métastatique, notamment la prolifération et la viabilité cellulaire, la migration et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), mais également l'invasion, la résistance à l'anoïkis et les adaptations métaboliques en lien avec la fonction mitochondriale et le métabolisme glucidique.

1) Prolifération et apoptose

La surexpression de GJA1-20k dans les cellules cancéreuses prostatiques a entrainé une diminution de leur viabilité, souvent considérée comme indicateur de la prolifération. Cette baisse a été mesurée par le test XTT qui mesure l'activité métabolique mitochondriale, et qui repose sur la réduction du sel de tétrazolium XTT en cristaux de formazan par des enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase. Toutefois, GJA1-20k étant connue pour induire une fission mitochondriale dans des modèles cardiaques (Shimura *et al.*, 2021) et moduler l'activité mitochondriale, il était nécessaire de vérifier que la baisse d'activité observée résultait bien d'une réduction du nombre de cellules prolifération et pas d'une altération du métabolisme mitochondrial. Un comptage cellulaire post-XTT a confirmé que cette diminution correspondait bien à une baisse du nombre total de cellules. Ce résultat a par la suite été validé par un test d'incorporation de la BrdU qui a confirmé une réduction significative de la prolifération des cellules PC3 surexprimant GJA1-20k.

Malgré l'absence de séquence NLS (Nuclear Localization Signal), GJA1-20k a été retrouvée dans la fraction nucléaire de cellules de gliome de rat, corrélée avec une baisse de la prolifération cellulaire (Mennecier *et al.*, 2008). Au sein des cellules de la crête neurale, GJA1-20k peut former un complexe avec BTF3 (*Basic Transcription Factor 3*), un facteur de transcription, et l'ARN polymérase II, afin de permettre la transcription de gènes impliqués dans la migration. Cela laisse supposer un effet possible de GJA1-20k sur la transcription de certains gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération comme peut l'exercer la partie CT de la Cx43. Dans le cadre du cancer de la prostate, le knock-down de BTF3 entraîne une diminution de la prolifération des cellules PC-3 et DU-145 (Zhang *et al.*, 2021). Cela suggère

que le rôle de GJA1-20k pourrait varier selon le type cellulaire, ou bien que, dans le contexte du cancer, sa liaison à ce facteur de transcription contribue à son inactivation.

GJA1-20k n'est d'ailleurs pas la seule isoforme à avoir été retrouvée dans le noyau. La présence de GJA1-11k dans le noyau limite le passage des cellules HEK293FT en phase S du cycle cellulaire, entraînant une réduction de la prolifération (Epifantseva *et al.*, 2020). Des expériences préliminaires d'immunomarquage et de fractionnement subcellulaire n'ont pas montré de localisation nucléaire de Cx43, de GJA1-20k ou de GJA1-11k dans les cellules PC-3. Ces observations indiquent que, dans les cellules cancéreuses prostatiques métastatiques, l'effet antiprolifératif de GJA1-20k ne semble pas dépendre d'une action nucléaire directe, mais plutôt de mécanisme cytoplasmique.

Une baisse du nombre de cellules peut également résulter d'une apoptose accrue, cependant, nos résultats semblent indiquer le contraire. En effet, la surexpression de GJA1-20k a protégé les cellules PC-3 de l'apoptose, comme cela a été observé de façon indirecte dans un modèle de lésion cérébrale. Dans ce modèle, des exosomes dérivés d'astrocytes, contenant GJA1-20k, ont eu un effet neuroprotecteur chez les rats, en réduisant les lésions et en diminuant l'apoptose neuronale Cela s'est traduite par une diminution de l'expression de Bax et de la caspase-3 clivée, ainsi qu'une augmentation de Bcl-2 (Feng *et al.*, 2023).

La diminution de l'apoptose pourrait notamment être liée à la formation de GJIC entre les cellules comme pour les cardiomyocytes (Basheer *et al.*, 2017). Bien que la Cx43 totale puisse participer aux processus de prolifération et d'apoptose (Yamasaki *et al.*, 1995; Cronier *et al.*, 2009), des données préliminaires sur la lignée PC3-Cx43-20k (N1) suggèrent que l'effet anti-apoptotique de GJA1-20k est indépendant du taux ou de la localisation membranaire de Cx43, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle propre de GJA1-20k dans la régulation de la prolifération et l'apoptose (figure 68). Etudier la résistance des cellules surexprimant GJA1-20k à l'apoptose en bloquant la communication par GJIC, ou en en travaillant sur cellules isolées pourrait nous apporter plus d'information sur l'importance de cette structure.

Une hypothèse susceptible d'expliquer la résistance accrue observée dans les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k repose sur leur contenu mitochondrial réduit. En effet, un nombre moindre de mitochondries pourrait limiter la libération des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, diminuant ainsi l'efficacité de la voie apoptotique intrinsèque (Márquez-

Jurado *et al.*, 2018). Ce qui expliquerait la résistance plus marquée lorsque l'apoptose est déclenchée par la staurosporine.

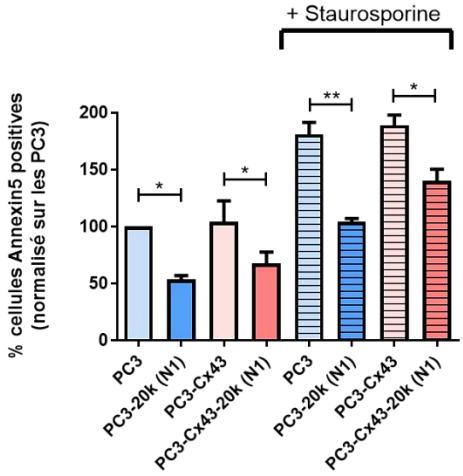


Figure 68 : La surexpression de GJA1-20k augmente la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses métastatiques quel que soit le niveau de Cx43

Pourcentage de cellules AnnexineV positives en conditions basales ou après traitement avec 0,2 µg/µL de staurosporine pendant 48 h. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules apoptotiques normalisé par rapport à l'apoptose basale des cellules PC3 (moyenne ± SD ; N = 2). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

Il serait également pertinent d'évaluer la sensibilité des cellules prostatiques métastatiques aux traitements anticancéreux couramment utilisés dans la prise en charge du cancer de la prostate, tels que le docétaxel. Cette approche permettrait de déterminer si la surexpression de GJA1-20k peut conférer une résistance accrue à la chimiothérapie, augmenter la sensibilité des cellules à ces agents cytotoxiques.

2) Migration et invasion

Suite à l'exportation membranaire de la Cx43 dans les cellules PC3 induite par la surexpression de GJA1-20k, nous avions formulé l'hypothèse que cela induirait une augmentation du potentiel migratoire des cellules cancéreuses prostatiques métastatiques, comme cela avait été décrit pour les cellules LNCaP, où la migration notamment directionnelle via la voie Rac1 était augmentée (Lamiche *et al.*, 2012; Boucher, 2018). Étonnamment, les expériences de migration collective et d'invasion ont montré des résultats opposés. Ainsi, bien que Cx43 soit présente à la membrane plasmique, les capacités migratoire et invasive des cellules PC3 ont été significativement diminuées par GJA1-20k. Afin de déterminer si cet effet

est propre à GJA1-20k ou lié à l'adressage membranaire de la Cx43, ces expériences ont été réalisées en comparant les lignées PC3 et PC3-Cx43 surexprimant GJA1-20k. Des données préliminaires suggèrent une nouvelle fois que la baisse des capacités agressives des cellules métastatiques prostatiques n'est pas due à la présence de Cx43 membranaire, puisque l'on retrouve les mêmes résultats quel que soit le niveau d'expression de la Cx43 (Figure 69A et B). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle propre de GJA1-20k dans la régulation de la plasticité cellulaire.

De plus, l'utilisation d'un inhibiteur la communication intercellulaire par jonctions GAP, la carbenoxolone (CBX), n'a aucun effet sur la migration des cellules PC3, même lorsque la Cx43 est devenu membranaire lors de la surexpression de GJA1-20k (Figure 69C).

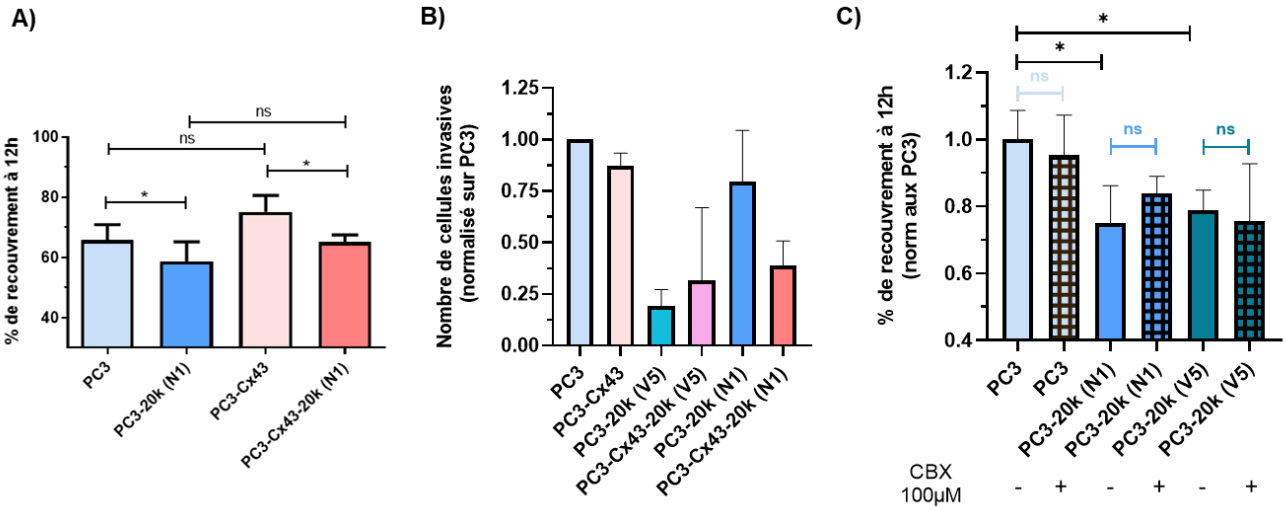


Figure 69 : La surexpression de GJA1-20k diminue la migration et l'invasion des cellules métastatiques prostatique, quel que soit le niveau d'expression de Cx43

A) Quantification du pourcentage de recouvrement à 12 h (moyenne ± SD ; N = 6, en duplicat). **B)** Histogramme correspondant à la quantification du nombre de cellules invasives pour chaque lignée, normalisé sur le nombre de cellules invasives en PC3 (N = 2). **C)** Quantification du pourcentage de recouvrement à 12 h en présence ou non de CBX à 100 µM (moyenne ± SD ; N = 3, en duplicat). * $p<0,05$.

Pour migrer, les cellules cancéreuses effectuent dans un premier temps une transition épithélio-mésenchymateuse caractérisée par la répression de marqueurs épithéliaux, comme la E-cadhérine, sous l'action de facteurs de transcription, tels que Snail, Slug, Twist1/2 et Zeb1/2, et l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine et la vimentine. Dans les cellules PC3, la surexpression de GJA1-20k induit une augmentation de l'expression de E-

cadhérine, tandis que celles de N-cadhérine et de vimentine restent stables (données non-montrées). Ces résultats sont cohérents avec la baisse de migration et d'invasion. Ce profil protéique associé à une réduction du potentiel invasif est caractéristique d'un retour à un état épithélial et potentiellement d'une transition mésenchymo-épithéliale (MET). Ce résultat contraste avec ceux montrant dans les cellules de la crête neurale, que GJA1-20k interagit avec le facteur de transcription basique-3 (BTF-3) et l'ARN polymérase II, pour activer la transcription du gène de la N-Cadhérine et favoriser alors la migration cellulaire (Kotini *et al.*, 2018). L'induction de l'EMT par le TGF-beta induit une perte de la communication par canaux intercellulaire dans les cellules NMuMG (James *et al.*, 2018). La surexpression de GJA1-20k restaure la GJIC, par contre elle n'empêche pas l'EMT, ce qui diverge avec nos résultats où la E-cadhérine se retrouve surexprimée et plus présente à la membrane plasmique.

Ces divergences pourraient refléter des mécanismes dépendants du contexte cellulaire, la fonction de GJA1-20k variant selon la nature du tissu étudié et l'état de différenciation cellulaire. Dans les cellules prostatiques métastatiques, GJA1-20k semblerait ainsi maintenir un phénotype plus épithélial, réduisant la plasticité cellulaire (EMT) nécessaire à la migration et à l'invasion. Puisque GJA1-20k ne semble pas modifier l'expression des marqueurs mésenchymateux, son action pourrait principalement passer par la régulation de l'expression ou de la stabilité de l'E-cadhérine, soit par sa surexpression directe, soit par une répression des facteurs transcriptionnels inhibiteurs de la E-cadhérine, ou alors par sa stabilisation membranaire.

De nombreux rôles ont été attribués aux cadhérines dans le contexte de la progression tumorale et notamment du cancer de la prostate et ceci en lien avec la Cx43. La queue cytoplasmique de la E-cadhérine peut se lier à la beta-caténine, un composant essentiel des complexes d'adhérence entre cellules, reliant les cadhérines au cytosquelette d'actine, et stabilisant ainsi les jonctions intercellulaires. Ces interactions beta-caténine/E-cadhérine contribue donc largement à l'intégrité et à l'organisation des tissus. Inhiber cette interaction en réduisant le niveau d'expression de beta-caténine entraîne une baisse de l'exportation de la Cx43 à la membrane dans les cellules de foie de rat (Ale-Agha *et al.*, 2009). Dans le cadre du cancer de la prostate, une faible expression de E-cadhérine et de beta-caténine est liée à un pronostic défavorable et à un stade avancé, où il est observé par ailleurs une localisation cytoplasmique de la beta-caténine (Nowicki, Sporny and Duda-Szymańska, 2012; Limani, Lež and Krušlin, 2024). Une diminution de l'expression de Cx43 et E-cadhérine est également retrouvée dans

les stades avancés du cancer du poumon à non-petite cellule (Jinn, Ichioka and Marumo, 1998). Dans le cadre du cancer du sein, la surexpression de Cx43 dans la lignée MDA-MB-231 entraîne une augmentation des niveaux protéiques de la E-cadhérine et de Zonula Occludens-1 (ZO-1), et conduit à la séquestration de beta-caténine à la membrane cellulaire, réduisant les capacités invasives des cellules. Et à l'inverse, le knock-down de Cx43 a provoqué l'augmentation de l'expression de N-cadhérine, et donc à augmenter les capacités invasives des cellules (Kazan *et al.*, 2019). En 2010, une étude a montré que la E-cadhérine facilite la croissance et l'assemblage de plaques jonctionnelles préexistantes, mais également que sa présence seule n'est pas suffisante pour initier la formation de nouveaux canaux intercellulaires fonctionnels. Cette étude montre également que la partie C-terminale est indispensable à cette initiation et que la présence de la ZO-1 et des filaments d'actine stabilisent le couplage jonctionnel dans une lignée dérivée d'un carcinome épidermoïde humain de la peau (Chakraborty *et al.*, 2010). Une corrélation d'expression et de localisation entre la E-cadhérine, la beta-caténine et la Cx43, 26 et 32, a été décrite pour la première fois en 2014 dans le cadre du cancer colorectal (KANCZUGA-KODA *et al.*, 2014). De plus, une revue en cours de parution discute du lien entre les connexines et les cadhérines, dont le complexe N-cadhérine/Cx43 qui ne se contente pas d'assurer l'adhérence entre les cellules, mais agit aussi comme un module de signalisation, capable de réguler la migration et la dynamique du cytosquelette via Rac1. Cette coopération illustre comment les jonctions adhérentes (N-cadhérine) et les jonctions communicantes (Cx43) interagissent pour coordonner adhérence, communication et motilité cellulaire (Hamid G., 2025).

La GJA1-20k possédant sur sa partie C-terminale, les mêmes sites d'interaction que la Cx43, comme celui avec la beta-caténine, il serait donc légitime d'émettre l'hypothèse que GJA1-20k pourrait intervenir potentiellement à plusieurs niveaux : (i) Sur l'expression de E-cadhérine et sa localisation via la réorganisation du cytosquelette d'actine, (ii) sur l'expression et la localisation de la beta-caténine et son éventuelle séquestration par la Cx43 membranaire. Ces hypothèses suggèrent que GJA1-20k pourrait participer à la réduction du potentiel invasif des cellules cancéreuses prostatiques métastatiques. Des expériences visant à observer et quantifier la présence et l'expression de la beta-caténine pourrait apporter de premiers éléments de réponse.

3) Anoïkis et Adhérence

Pour rejoindre la circulation sanguine, les cellules doivent être en mesure de résister à l'anoïkis, une forme de mort cellulaire déclenchée par la perte d'adhérence à la matrice extracellulaire. Lorsqu'elles sont membranaires, les connexines contribuent à l'adhérence cellulaire en interagissant avec des protéines d'adhérence telles que les cadhérines, ainsi qu'avec des protéines impliquées dans des voies de survie, notamment Akt et MAPK. À ce jour, une seule étude a exploré le rôle de la Cx43 dans l'anoïkis en contexte tumoral. Dans ce travail, des cellules cancéreuses thyroïdiennes cultivées sur polyHEMA ont formé des sphères et ont présenté une surexpression de Cx43 accompagnée d'une activation de la voie Akt. La répression de l'expression de Cx43, ou le traitement par CBX, entraîne une diminution de l'expression de phospho-Akt et provoque l'apoptose, l'une des principales voies régulant la survie cellulaire (Jensen *et al.*, 2011).

Il serait pertinent d'évaluer l'expression de la Cx43 totale ainsi que celle d'Akt et sa phosphorylation à différents temps (J0, J2, J6) afin de déterminer si la résistance observée implique la voie pro-survie Akt.

La Cx43 peut également faciliter l'adhérence des cellules tumorales circulantes sur les sites d'extravasation. Dans un modèle de cancer du sein, des cellules tumorales ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris, afin de provoquer leur adhérence dans les vaisseaux pulmonaires et d'initier la formation de micrométastases. Des analyses immunohistochimiques des zones de contact entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales pulmonaires ont révélé une surexpression de Cx43. En revanche, l'injection de cellules tumorales exprimant un mutant de Cx43 a entraîné une réduction du nombre de ces cellules s'attachant à l'endothélium pulmonaire, confirmant le rôle de Cx43 dans ce processus (M Khair Elzarrad *et al.*, 2008).

Dans nos expériences menées sur polyHEMA, GJA1-20k apparait comme jouer un rôle important dans la résistance à l'anoïkis des cellules métastatiques prostatiques. Des résultats préliminaires suggèrent toutefois que la surexpression de Cx43 pourrait également contribuer à ce phénomène. (Figure 70). L'utilisation d'un plasmide surexprimant une Cx43 délétée de sa partie CT, permettrait de s'assurer de son importance dans la survie cellulaire.

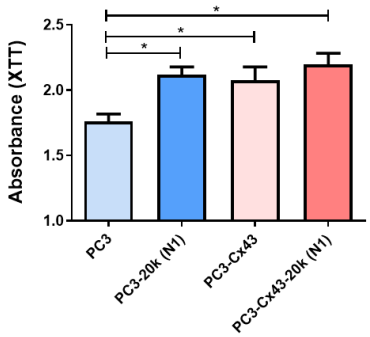


Figure 70 : La surexpression de GJA1-20k et de Cx43 augmente la résistance des cellules métastatiques prostatiques à l'anoïkis

Résultats de la viabilité cellulaire obtenus par le test XTT après 6 jours de culture en absence d'adhérence (PolyHEMA à 10 nM) de cellules PC3 exprimant différents niveaux de Cx43 et de GJA1-20k (Moyenne ± SD, N = 4 en triplicat). * $p < 0,05$

Parmi les voies favorisant la résistance à l'anoïkis, on retrouve la voie FAK (*Focal Adhesion Kinase*), qui peut activer la voie PI3K/Akt/mTOR, permettant d'inhiber l'apoptose (phosphorylation de Bad/Bax par Akt) (Ersahin, Tuncbag and Cetin-Atalay, 2015; Wilson *et al.*, 2019). On retrouve également la voie hippo, où YAP/TAZ (*Yes-associated Protein/Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) activés par la perte d'adhérence favorisent l'action des facteurs de transcription stimulant la transcription de gènes de survie. Il a été démontré que la protéine effectrice de p53, ASPP1 (également appelée PPP1R13B), active les deux principaux coactivateurs transcriptionnels de la voie Hippo, YAP et TAZ, en inhibant leur interaction avec les kinases inactivatrices LATS1 et LATS2 (*Large tumor suppressor kinase 1/2*). Directement ou indirectement, l'activation de YAP et TAZ (non-phosphorylés) entraîne une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (également appelée BCL2L11), ce qui protège les cellules contre l'anoïkis (Vigneron, Ludwig and Vousden, 2010). La régulation de YAP par le cytosquelette dépend de l'état d'adhérence de la cellule et implique des rôles différents pour l'actine et les microtubules (Zhao *et al.*, 2012). Lorsque la cellule est attachée à la MEC, les fibres d'actine, bien organisées inhibent les kinases LAST1/2 entrainant la déphosphorylation de YAP, sa translocation dans le noyau, et l'activation de gènes pro-survie et de prolifération. En revanche, lors de la perte d'adhérence, les microtubules stimulent l'activité de LAST1/2, ce qui conduit à la phosphorylation de YAP, sa rétention dans le cytoplasme et l'activation de l'anoïkis. Ainsi, l'actine favorise l'activation nucléaire de YAP en condition d'attachement, tandis que les microtubules permettent l'inactivation de YAP en condition de perte d'adhérence. Par ailleurs, YAP inactif (voie Hippo active), est un frein à l'avancé dans le cycle cellulaire (Liu *et al.*, 2017). Dans les stades avancés du cancer de la

prostate, les kinases LATS1/2 sont sous-exprimées par rapport aux stades précoces, indiquant une inactivation de la voie Hippo et, par conséquent, une activation de YAP/TAZ. *In vitro*, les lignées métastatiques comme les cellules PC-3 ou DU-145 ont présentés un taux d'anoïkis plus faible que les cellules moins agressives, ce qui reflète leur résistance accrue à la mort cellulaire (Zhao *et al.*, 2012).

Étant donné que GJA1-20k réorganise le cytosquelette d'actine (Basheer *et al.*, 2017) et les microtubules (Fu *et al.*, 2017), et qu'elle inhibe la prolifération cellulaire, il est plausible que cette isoforme interfère avec la voie Hippo, modulant ainsi la résistance à l'anoïkis, la prolifération cellulaire, et l'adhérence des cellules tumorales. Il serait donc pertinent d'étudier le niveau d'expression des protéines de la voie Hippo, ainsi que la localisation de YAP. Cette hypothèse est confortée par le fait que YAP peut également interagir avec la beta-caténine, notamment lors du phénomène de résistance à l'anoïkis (Varelas *et al.*, 2010; Rosenbluh *et al.*, 2012; Frisch, Schaller and Cieply, 2013).

GJA1-20k intervient également dans les capacités d'adhérence entre cellules. En effet, la surexpression de GJA1-20k renforce l'adhérence des cellules métastatiques prostatiques aux ostéoblastes, qui représentent l'élément d'interaction cellulaire majeur au sein de la niche osseuse. Cette augmentation d'adhérence aux ostéoblastes pourrait ainsi favoriser le ciblage et l'ancrage des cellules métastatiques au microenvironnement osseux, première étape essentielle à l'établissement de la niche métastatique. Comme décrit précédemment, le remodelage du cytosquelette pourrait être à l'origine de cet effet mais, de façon surprenante, la surexpression de GJA1-20k modifie aussi le profil d'expression de la cadhérine-11, ou cadhérine ostéoblastique. Comme pour les ostéoblastes, les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k ne possèdent qu'un seul signal à 120 kDa environ, alors que les lignées contrôles présentent un second signal à un poids moléculaire inférieur (environ 90 kDa). Dans des lignées de cancer du sein, il a été montré l'existence d'un variant issu d'un épissage alternatif permettant d'augmenter les capacités d'invasion des cellules. D'autre part, par Western blot, il a été démontré un second signal vers 85 kDa, que les auteurs pensaient initialement être le variant, mais qui finalement, serait un produit de clivage (Feltes *et al.*, 2002). Le variant pourrait participer à l'adhérence des cellules dépendantes du calcium, lorsqu'il est coexprimé avec la forme totale, mais ne peut agir seul (Kawaguchi *et al.*, 1999). Par ailleurs, ce variant est tronqué en CT, il lui manque une partie du troisième domaine transmembranaire, l'empêchant d'établir des interactions cellule-cellule (Tamura *et al.*, 2008).

Les cellules tumorales prostatiques expriment de hauts niveaux de cadhérine 11 (Chu *et al.*, 2008). De plus, lorsque la Cx43 est surexprimée dans les cellules LNCaP, ces cellules présentent davantage de cadhérine-11 membranaire et donc un potentiel plus important à former des jonctions adhérentes homotypiques avec la cadhérine-11 des ostéoblastes. D'autres observations suggèrent que la cadhérine-11 permet non seulement un lien physique entre les cellules cancéreuses prostatiques et les ostéoblastes, mais augmente également la migration et l'invasion de ces cellules, ce qui peut faciliter leur colonisation métastatique dans l'os (Huang *et al.*, 2010). Dans nos conditions expérimentales, les cellules PC3-20k expriment potentiellement plus de forme totale de la cadhérine-11, permettant une meilleure adhérence sur ostéoblastes, mais nous ne retrouvons pas de hausse de la migration et l'invasion, montrant un rôle probablement ambivalent de GJA1-20k lié à cette cadhérine. La bande observée à environ 90 kDa peut potentiellement être un produit de clivage comme suggéré dans les lignées de cancer du sein, ce qui serait cohérent avec les résultats d'adhérence sur ostéoblastes, ou être un potentiel variant. L'hypothèse la plus probable correspond au produit de clivage car ce second signal est toujours présent lorsqu'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale est utilisé (partie manquante dans le variant).

Comme discuté précédemment avec la E-cadhérine, la beta-caténine peut également s'associer à la cadhérine-11, ce qui tend à stabiliser les complexes d'adhérence. La surexpression de la cadhérine-11 dans des cellules de cancer du sein, augmente les niveaux d'expression de la beta-caténine. En parallèle, l'activité TCF (T-cell Factor) / beta-caténine est diminuée car la beta-caténine est séquestrée à la membrane, ce qui a également été décrit pour la E-cadhérine (Gottardi, Wong and Gumbiner, 2001). Lorsque la β-caténine est libre de s'accumuler dans le cytoplasme, elle peut transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles pro-prolifératifs et pro-invasifs via la voie Wnt/β-caténine, tels que MYC, CCND1/cyclin D1 et MMP7. Inversement, réduire l'expression de β-caténine dans les lignées PC-3 et MDA-MB-231 diminue également l'expression de la cadhérine-11, illustrant une régulation bidirectionnelle (Farina *et al.*, 2009).

Ces observations suggèrent que la β-caténine peut être directement ou indirectement ciblée par GJA1-20k et/ou la Cx43 membranaire. En effet, la présence de protéines membranaires comme les E-cadhérine et cadhérine-11 ou la Cx43 favorise la séquestration de la β-caténine à la membrane, limitant son activité transcriptionnelle et modulant ainsi l'adhérence et la prolifération cellulaire. Dans le cadre de la niche métastatique osseuse, cette hypothèse parait

d'autant plus intéressante que la surexpression de cadhérine-11 induit un arrêt du cycle cellulaire, potentiellement en lien avec la beta-caténine, dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Tamura *et al.*, 2008).

Des études préliminaires menées sur l'expression de la beta-caténine en condition d'adhérence et de non-adhérence, montrent une augmentation de l'expression de cette protéine, corrélée à l'augmentation de mTOR, lorsque les cellules PC3 surexpriment GJA1-20k en condition d'adhérence (Figure 71). mTOR qui peut activer la voie Akt et qui inhibe l'enzyme responsable de la dégradation de la beta-caténine, d'où la corrélation d'expression (Ma *et al.*, 2011). La GJA1-20k modulerait donc l'expression et/ou l'activité de la beta-caténine ce qui impacterait l'adressage des protéines membranaires et leur stabilisation, les capacités invasives, l'adhérence et la résistance des cellules face aux stress.

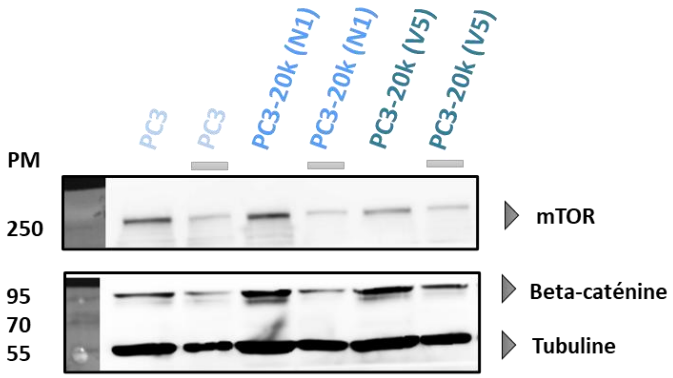


Figure 71 : Expression de la beta-caténine et de mTOR dans les cellules PC3 adhérentes et non adhérentes

Western blot montrant l'expression de la beta-caténine et de mTOR dans des cellules PC3 cultivées pendant 6 jours en conditions adhérentes et non adhérentes (polyHEMA). La tubuline est utilisée comme contrôle de charge des dépôts Les barres grises correspondent aux cellules cultivées en condition de non-adhérence (N = 1).

4) Mitochondries et métabolisme

Un des rôles clairement établis, et sans doute le plus étudié à ce jour, concerne l'implication de GJA1-20k dans la localisation et la fonction des mitochondries. La surexpression de GJA1-20k a induit un réarrangement du réseau mitochondrial, avec une localisation préférentielle des mitochondries vers la périphérie, comme en situation de stress dans des modèles cardiaques, pour lesquels une localisation des mitochondries, par marquage au TOM20, plus près de la périphérie cellulaire est observée. Il reste maintenant à savoir si,

comme pour ces modèles cardiaques, cette distribution dans les cellules cancéreuses est dépendante du réarrangement du cytosquelette par GJA1-20k (Fu *et al.*, 2017).

Nos résultats montrent que la surexpression de GJA1-20k entraine une diminution significative du nombre de mitochondries, ce qui se traduit par à une baisse de l'activité mitochondriale. Cette diminution du nombre de mitochondries peut résulter de deux processus différents : une baisse de la mitogenèse et/ou une augmentation de la mitophagie. Dans un modèle de traumatisme crânien, des vésicules dérivées d'astrocytes enrichies en GJA1-20k ont été testé comme potentiel thérapeutique, par injection dans la veine de la queue de rat. Ce traitement a amélioré la qualité des mitochondries en augmentant la mitophagie des mitochondries défectueuses, un mécanisme dépendant de PINK1 (PTEN-induced kinase 1). Un effet protecteur sur la pyroptose (mort cellulaire liée à l'inflammation) a également été observé, améliorant les capacités cognitives des rats testés (Li, Chen and Feng, 2025). En accord avec ces données, nos résultats préliminaires montrent que la surexpression de GJA1-20k dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 induit une augmentation progressive de la mitophagie évaluée par l'étude de l'expression de la protéine PINK1 (Figure 72).

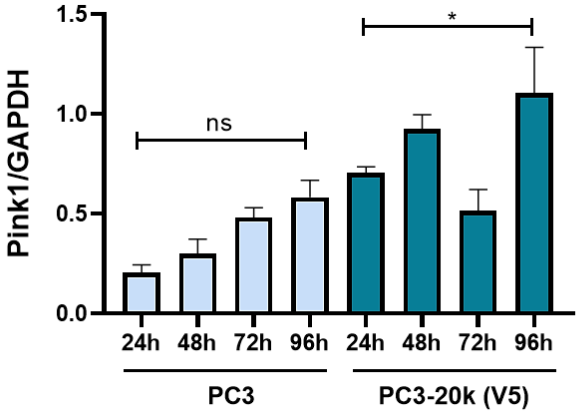


Figure 72 : La surexpression de GJA1-20k induit une augmentation progressive et significative de la mitophagie dans les cellules cancéreuses métastatiques prostatiques

Quantification obtenue par Western blot de la protéine PINK1 active, marqueur de la mitophagie, dans les cellules PC3 et PC3-20k (V5) de 24 à 96 h de culture. (Moyenne ± SD, N = 2).

Les mécanismes moléculaires menant à la mitophagie dépendante de PINK1 sont connus et impliquent la dépolarisation mitochondriale, la stabilisation de PINK1 à la surface mitochondriale et le recrutement de Parkin. Lorsque les mitochondries sont dépolarisées (suite à un stress oxydatif ou à un signal apoptotique par exemple), PINK1 s'accumule sur la

membrane externe et recrute la protéine Parkin, une E3 ubiquitine ligase cytosolique. Parkin ubiquitine des protéines mitochondriales comme VDAC1 et MFN1/2, marquant ainsi la mitochondrie pour déclencher la dégradation via les récepteurs d'autophagie (p62/SQSTM1, NDP52, optineurine). Ces récepteurs lient LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (ou MAP1LC3)) sur l'autophagosome, s'en suit une fusion avec le lysosome et la dégradation. Dans de nombreux cancers, l'activité de PINK1 se retrouve modifiée, notamment en cas de stress oxydatif ou hypoxique, afin de protéger les cellules des mitochondries endommagées, réduisant ainsi le stress oxydatif et donc augmentant la survie (Macleod, 2020). PINK1 est importée dans la mitochondrie via les complexes TOM (*Translocase of Outer Membrane*) puis TIM (*Translocase of Inner Membrane*). Une fois dans la matrice, elle est clivée par les protéases MPP (*mitochondrial processing peptidase*) et PARL (*Presenilin-associated rhomboid-like protease*), puis dégradée. En cas de détection de mitochondries endommagées, dépolarisées, le transport à travers le complexe TIM est bloqué car il dépend du potentiel de membrane. PINK1 reste alors localisée au sein de la membrane mitochondriale externe, associée au complexe TOM (OMM), et s'y accumule et s'active par autophosphorylation (Narendra and Youle, 2024).

La Cx43 est localisée dans la membrane interne des mitochondries, alors que la GJA1-20k dans la membrane mitochondriale externe (Boengler *et al.*, 2022). Il a été démontré par co-immunoprécipitation que la Cx43 peut interagir avec TOM20, ce qui faciliterait son insertion dans la membrane mitochondriale externe, puis son passage dans la membrane interne via le complexe TOM/HSP90. Ceci induit un effet cardioprotecteur, en stabilisant le potentiel de membrane, et donc limitant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et la production de ROS (Rodriguez-Sinovas *et al.*, 2006). Nos expériences de co-immunoprécipitation réalisées sur les cellules PC3 confirment que GJA1-20k et la Cx43 interagissent avec TOM20. Il reste à déterminer si cette interaction est directe ou indirecte, car nous avons également observé que GJA1-20k co-immunoprécipite avec la Cx43. Cela conduit à l'hypothèse que GJA1-20k pourrait faciliter le passage de la Cx43 vers la membrane mitochondriale interne via le complexe TOM20/HSP90, ouvrant de nouvelles perspectives sur le rôle de cette isoforme dans la régulation de la fonction mitochondriale.

L'étude de la fission mitochondriale constitue également un axe de recherche, puisque GJA1-20k a induit ce processus en condition de stress oxydatif dans différents modèles cellulaires, contribuant ainsi à réduire la production de ROS et donc à protéger les cellules de l'apoptose

(Shimura *et al.*, 2021). Une fission mitochondriale permet une élimination plus rapide des mitochondries dysfonctionnelles, les mitochondries plus petites étant plus facilement accessibles aux autophagosomes (Li *et al.*, 2025). Ce mécanisme est cohérent avec la diminution de production de ROS observée dans les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k, suggérant un rôle protecteur de cette isoforme dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale.

Les différentes étapes de la mitogenèse pourraient également être impactées par la surexpression de GJA1-20k. Il serait donc pertinent d'étudier l'expression de facteurs de transcription majeurs tels que PGC1-α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ou NRF1/NRF2 (*nuclear respiratory factors* 1/2) connus pour stimuler la transcription de gènes codant pour des protéines mitochondriales (Puigserver and Spiegelman, 2003). La majorité des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire, comme des sous-unités de la chaîne respiratoire, TIM/TOM et TFAM (*Mitochondrial Transcription Factor A*). Ces protéines, synthétisées dans le cytoplasme sont ensuite importées par les complexes TOM/TIM dans la mitochondrie. Le reste des protéines mitochondriales est produit via l'ADN mitochondrial et traduit dans la matrice. Un certain nombre d'hypothèses concernant le rôle de GJA1-20k peut être émis dans le contexte de la mitogenèse. GJA1-20k pourrait intervenir au niveau de la réplication de l'ADN mitochondrial et diminuer l'expression ou l'activation d'enzymes impliquées comme POLG (*ADN Polymérase Gamma*). Elle pourrait également agir en amont, sur l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) qui permet la détection d'un stress énergétique (augmentation du rapport AMP/ATP) et stimule PGC1-α (Puigserver and Spiegelman, 2003). L'AMPK favorise la beta-oxydation, inhibe mTORC1 (pour économiser l'énergie), et qui stimule la biogenèse mitochondriale. SIRT1 (Sirtuin 1), qui est une enzyme déacétylase NAD^+-dépendante capable d'activer PGC-1α par déacétylation, suite à l'activation de l'AMPK (Herzig and Shaw, 2018). GJA1-20k pourrait inhiber l'action ou l'expression de l'AMPK, ce qui réduirait la mitogenèse, et en parallèle stimuler la mitophagie protectrice, à l'origine du nombre réduit de mitochondries. Enfin, le fait que les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k présentent un niveau d'ATP plus élevé que les cellules contrôles pourrait renforcer cette hypothèse : une disponibilité énergétique accrue inhiberait l'activation de l'AMPK, limitant ainsi la biogenèse mitochondriale tout en maintenant un équilibre fonctionnel favorable à la survie cellulaire.

L'activité de la chaîne respiratoire est également affectée par la surexpression de GJA1-20k, car nous observons une baisse de la respiration mitochondriale qui peut s'expliquer par la réduction du nombre de mitochondries et de leur activité. Parallèlement, la glycolyse est également impactée, avec une baisse de l'activité glycolytique, et de la consommation de glucose. Ces observations traduisent un état énergétique globalement réduit, qui corrèle avec la diminution des capacités prolifératives, migratoires et invasives des cellules.

Des expériences préliminaires montrent que les cellules PC3 contrôles ne survivent pas à la privation de glucose dans le milieu, même s'il y a du glutamate, contrairement aux cellules qui surexpriment GJA1-20k (Figure 73). Inversement, les cellules PC3 prolifèrent plus rapidement que les PC3-20k en présence de glucose. Ces résultats suggèrent que GJA1-20k confère aux cellules cancéreuses prostatiques la capacité de s'affranchir de leur dépendance au glucose.

Le glucose est un substrat métabolique essentiel pour les cellules cancéreuses et son entrée dans la cellule se fait majoritairement par des transporteurs du glucose tel que GLUT1. Dans le cancer de la prostate, GLUT1 est exprimé dans les tumeurs les plus agressives et son expression est régulée par les androgènes. Une étude de résistance à la privation de glucose a permis de comparer des lignées sensibles (LNCaP) et insensibles (PC-3 ou LNCaP-R) aux androgènes. Les cellules sensibles aux androgènes ont présenté une résistance plus élevée à la mort cellulaire déclenchée par la privation de glucose que les cellules résistantes à la castration. L'élimination du glucose du milieu provoque l'augmentation de la concentration en H_2O_2, une activation du récepteur des androgènes, et une stimulation de l'activité de l'AMPK, et par ailleurs augmente la production de GLUT1 dans les cellules cancéreuses prostatiques sensibles aux androgènes. Il a également été démontré que la surexpression de GLUT1 rend les cellules cancéreuses prostatiques plus résistantes à la privation de glucose et à la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Gonzalez-Menendez *et al.*, 2018). L'AMPK est décrit comme un régulateur clef de la prolifération et la survie dans le cadre du cancer de la prostate (Park *et al.*, 2009). Ce lien est notamment décrit pour les cellules androgéno-dépendantes, pour lesquelles la fixation des androgènes sur leurs récepteurs augmentent l'activité de l'AMPK et donc de la phosphorylation oxydative (Tennakoon *et al.*, 2014).

Les cellules PC-3, insensibles aux androgènes, voient leur survie améliorée lors de la privation de glucose extracellulaire lorsque GJA1-20k est surexprimée. Cette résistance est observée en présence de SVF, qui contient du glucose, mais disparait en son absence (résultats préliminaires

non-montrés). Nos conditions de privation de glucose avec 10% de SVF correspondent donc à un milieu extracellulaire contenant environ 0,338 mM de glucose, soit une très faible concentration et non une absence totale. Ainsi, GJA1-20k pourrait favoriser la survie des cellules en augmentant l'expression de GLUT1, améliorant ainsi la captation des rares molécules de glucose disponibles. Une investigation de l'expression de GLUT1 avant et après privation de glucose serait pertinente pour tester cette hypothèse et clarifier le mécanisme par lequel GJA1-20k confère une résistance métabolique aux cellules prostatiques métastatiques.

NUAK2, une protéine appartenant à la famille des kinases AMPK-like, peut également intervenir en réponse au stress métabolique pour favoriser la survie des cellules cancéreuses dans un environnement pauvre en nutriments. Dans ces conditions, la surexpression de NUAK2 prolonge la survie cellulaire de cellules cancéreuses du foie (Suzuki *et al.*, 2003), et dans le cadre du cancer du sein, NUAK1/2 augmentent la glycolyse et la glutaminolyse via la voie mTOR/c Myc (Worral Wilfred Raj and Manoharan, 2025). Cette kinase contribue également à la formation de fibres de stress d'actine (Vallenius *et al.*, 2011). La surexpression de NUAK2 a induit une prolongation de la survie cellulaire des cellules cancéreuses du foie, les HepG2, dans des circonstances de privation de nutriments. Pour faire le lien avec les théories précédentes, NUAK2 peut agir comme un activateur YAP/TAZ en inhibant directement la phosphorylation de YAP/TAZ médiée par LATS. L'inhibition de NUAK2 réduit la croissance des cellules cancéreuses en culture et des tumeurs mammaires chez la souris. De plus, dans des échantillons de patients humains, l'expression de NUAK2 est élevée dans le cancer de la vessie agressif de haut grade et est fortement corrélée avec une signature génique YAP/TAZ. Ces résultats ont permis d'identifier une boucle de rétroaction positive dans la voie Hippo (Gill *et al.*, 2018). GJA1-20k pourrait potentiellement agir sur l'expression de NUAK2 en la réprimant, induisant l'inactivation de protéine comme YAP et ainsi induire une quiescence métabolique et cellulaire. Des données viennent étayer cette hypothèse selon laquelle l'expression de Cx43 est corrélée négativement avec celle de YAP actif. Lorsque l'action de la Cx43 est inhibée par Gap19, il est observé une plus forte translocation de YAP dans le noyau (Yu *et al.*, 2020). La phosphorylation de la Cx43 sur la S282 permet la phosphorylation de YAP et donc son inactivation, ce qui a réduit l'expression de gène protecteur contre la fibrose cardiaque (Wang *et al.*, 2025). Les deux protéines co-localisent au niveau des contacts cellulaire (Yang *et al.*, 2018). Il a par ailleurs été démontré que l'inhibition de contact induit une séquestration de YAP au niveau de la membrane plasmique au niveau des jonctions cellulaires. De plus, la surexpression de YAP a régulé l'expression des gènes d'une manière opposée à la densité cellulaire (Zhao *et al.*, 2007). Par

ailleurs, des résultats préliminaires d'immunofluorescences réalisées, montre plus les cellules PC-3 possède de Cx43, moins il y a de protéines YAP présentes dans le noyau.

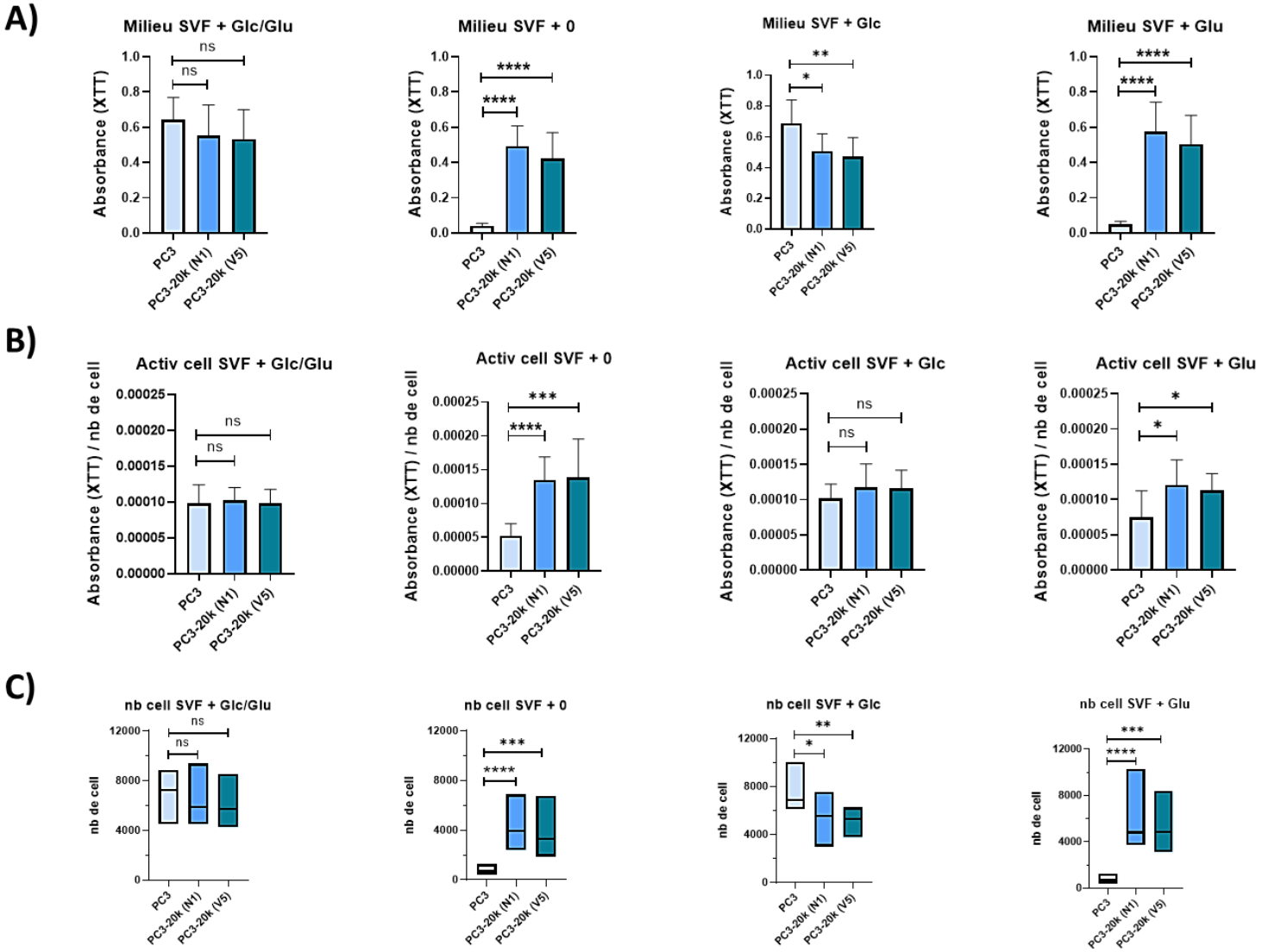


Figure 73 : La surexpression de GJA1-20k favorise la survie des cellules métastatiques prostatiques en absence de glucose

A) Histogramme pour chacune des lignées PC3 considérées représentant l'intensité d'absorbance obtenus lors de tests XTT après 48h de culture dans des milieux contenant du glucose (Glc) et/ou du glutamate (Glu) ou en leur absence (0) (moyenne ± SD ; N=5, en triplicats). **B)** Histogramme de l'activité cellulaire (Absorbance en XTT) /nb de cellules/puits représenté en C). Les cellules ont été cultivées soit en présence de glucose (Glc) et de glutamate (Glu), soit en l'absence de Glc et de Glu, soit avec l'un des deux seulement, en présence de SVF. **C)** Quantification du nombre de cellules par puits correspondant aux expériences de la figure 73A.

Ces observations suggèrent que GJA1-20k permet une meilleure survie des cellules métastatiques prostatiques en conditions de stress énergétique, que ce soit par une captation accrue de glucose via GLUT1 ou par une régulation fine de l'activité mitochondriale.

L'activation coordonnée de mécanismes tels que la fission mitochondriale, la mitophagie protectrice et la modulation des voies AMPK/PGC1-α pourrait ainsi permettre aux cellules de maintenir leur niveau d'ATP et de résister aux conditions de privation de nutriments.

Globalement, l'ensemble des résultats suggèrent que GJA1-20k pourrait induire une mise en quiescence des cellules métastatiques prostatiques.

III- GJA1-20k joue-t-elle un rôle de protéine de réponse au stress au sein de la niche osseuse en lien notamment avec l'activité mitochondriale ?

Lors de l'établissement d'un foyer métastatique au sein du tissu osseux, les cellules tumorales prostatiques doivent présenter une plasticité importante pour leur permettre de s'adapter à de nouvelles conditions microenvironnementales. Parmi les acteurs locaux jouant un rôle important figurent les facteurs solubles et l'hypoxie que nous avons reproduit dans un modèle *in vitro*.

Afin d'évaluer l'influence du microenvironnement osseux sur l'expression de GJA1-20k, nous avons exposé les cellules PC-3 au milieu conditionné ostéoblastique (ObCM). Comme cela a déjà été rapporté dans les travaux antérieurs de l'équipe, l'ObCM ne modifie pas significativement le niveau d'expression de la Cx43 totale, FL-Cx43, dans les PC-3, ni de GJA1-20k après 17h de stimulation (Boucher, 2018). En revanche, il a induit une augmentation forte et progressive de l'expression de GJA1-20k, isoforme majoritaire dans nos conditions expérimentales, s'étalant jusqu'à 96 h. Cette induction durable, montre que plus les cellules métastatiques prostatiques sont exposées à des facteurs osseux, plus elles expriment cette isoforme. Malgré cette augmentation marquée de GJA1-20k, les cellules PC3-20k demeurent moins migrantes et moins invasives que les lignées contrôles, même en présence d'ObCM, alors que la Cx43 y est désormais localisée à la membrane.

De manière importante, des résultats préliminaires montrent que la surexpression de Cx43 dans les PC3-20k ne modifient pas les effets observés sur les capacités de migration et d'invasion, (Figure 74), ce qui supposerait un rôle propre de GJA1-20k. Ces résultats indiquent que les cellules métastatiques osseuses ou fortement agressives, et hormono-indépendantes, comme les cellules PC-3, pourraient répondre différemment à la présence de Cx43 membranaire que des lignées moins agressives telles que les LNCaP. En effet, chez ces dernières, la Cx43 est

naturellement localisée à la membrane et sa surexpression, notamment après traitement à l'ObCM, augmente leur capacité migratoire directionnelle (Boucher *et al.*, 2020). Cette divergence pourrait refléter des différences intrinsèques liées au statut hormonal et au degré d'agressivité des deux lignées cellulaires utilisées, mais également au fait de la surexpression stable de GJA1-20k dans les PC3 a d'autres conséquences que la localisation membranaire de Cx43, comme cela a été démontré au cours de ce travail de thèse.

Il serait intéressant d'analyser le comportement des cellules PC3-20k en condition de migration individuelle, afin d'évaluer l'impact de la localisation membranaire de la Cx43 sur leur directionnalité comme cela a été précédemment démontré pour les cellules LNCaP (Boucher *et al.*, 2020). Afin de compléter ces résultats obtenus avec les cellules PC-3, il serait pertinent de reproduire ces expériences avec les cellules C4-2B, dérivées des cellules LNCaP et isolées de métastases osseuses. Cela permettrait de déterminer si les effets observés sont spécifiques aux cellules PC-3 ou généralisables à d'autres modèles prostatiques ostéotropes.

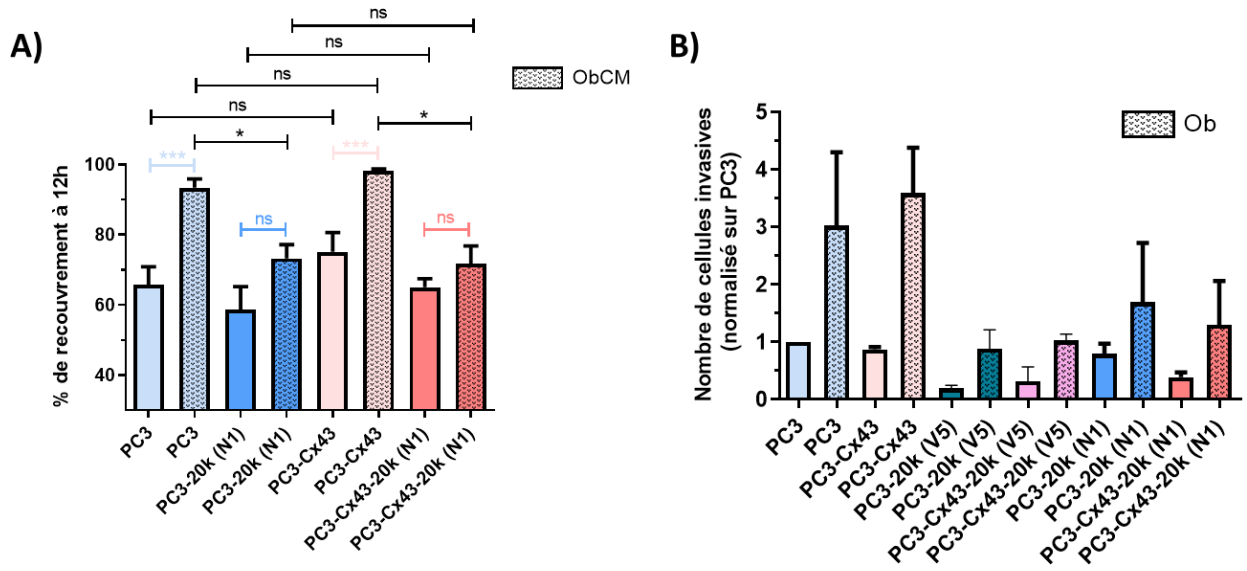


Figure 74 : La surexpression de GJA1-20k induit une baisse significative des capacités migratoires et invasives des cellules métastatiques prostatiques, quel que soit le niveau de Cx43

A) Quantification du pourcentage de recouvrement à 12 h en présence ou absence d'ObCM dans les différentes lignées PC3 (moyenne ± SD ; N = 6, en duplicat). **B)** Histogramme correspondant à la quantification du nombre de cellules invasives pour chacune des lignées considérées, normalisé sur le nombre de cellules PC3 invasives (N = 2). Les cellules ont été placées en milieu de différenciation (contrôle ; barres vides), en présence d'ostéoblastes (Ob) ou d'ObCM (barres avec pointillés). * $p<0.05$.

Le site métastatique osseux se caractérise par un environnement fortement hypoxique, en particulier au niveau de la niche ostéogénique (Thompson *et al.*, 2025). Cette condition a été reproduite dans nos expériences par une hypoxie contrôlée à 1% d'oxygène associée à l'utilisation du milieu conditionné ostéoblastique (ObCM), afin de mimer les contraintes physiologiques rencontrées par les cellules tumorales dans cette niche.

La confluence cellulaire et le volume de milieu utilisés ont été rigoureusement contrôlés, ces deux paramètres pouvant influencer le taux d'oxygène disponible dans le milieu de culture (Mazure, 2024; Tan *et al.*, 2024). Ces effets volume/densité sont particulièrement notables en condition de normoxie, pour laquelle la confluence est atteinte plus rapidement qu'en hypoxie avec les cellules PC3. Par exemple, les extraits protéiques des expériences combinant hypoxie et traitement à l'ObCM ont été préparés à 48 h, d'une part car l'effet de l'hypoxie sur l'expression de GJA1-20k était maximal à ce temps, et d'autre part car la confluence n'était encore que de 60 à 70 % en condition de normoxie.

En revanche, la confluence complète n'était atteinte qu'entre 72 et 96 h dans les expériences nécessitant des extractions protéiques plus tardives, comme en témoigne l'expression accrue de HIF1-α à 72 h dans les cellules PC3 (données non-montrées). Ces précautions expérimentales étaient essentielles pour éviter que la densité cellulaire n'altère la disponibilité en oxygène ou ne modifie indirectement la réponse des cellules à l'hypoxie et au microenvironnement osseux, et par conséquent l'expression de GJA1-20k et de la Cx43.

Le taux d'oxygène en condition de normoxie était fixé à 21% d'O_2 dans l'incubateur, malheureusement, le taux d'oxygène présent dans le milieu des cellules n'a pas été mesuré, celui-ci étant sans doute inférieur, du fait de la présence de milieu. Même si ce taux d'oxygène ne correspond pas à ce qui peut être retrouvé lorsque les cellules sortent de la circulation sanguine, zone périvasculaire avec 12,5 % d'O_2 environ, nos conditions normoxiques sont un reflet du passage des cellules d'un milieu oxygéné : la circulation sanguine, à un milieu fortement appauvri, la niche ostéogénique.

L'hypoxie régule positivement l'expression de GJA1-20k dans nos expériences, en accord avec les observations rapportées dans différents modèles cardiaques (Basheer *et al.*, 2018). Cette induction est toutefois transitoire, ce qui correspond au profil typique d'une réponse au stress cellulaire. A noter qu'un stress oxydatif généré par l'ajout d'H_2O_2 possède également une action

stimulante sur l'expression de GJA1-20k. Ainsi, dans un contexte de stress hypoxique ou oxydatif, GJA1-20k peut être considérée comme une protéine de réponse au stress, participant probablement à la survie cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques.

Le fait que le taux d'ARNm de *GJA1* n'augmente pas en condition d'hypoxie, alors qu'il est constaté une augmentation de GJA1-20k suggère que le mécanisme qui en est à l'origine, est la traduction alternative, phénomène déjà décrit pour cet ARNm (Ul-Hussain *et al.*, 2014). Comme indiqué dans l'introduction, la traduction alternative est favorisée en conditions d'hypoxie, car elle consomme peu d'énergie tout en restant dépendante d'un métabolisme actif. L'inhibition de mTOR pendant l'hypoxie entraîne l'hypo-phosphorylation de ses effecteurs 4E-BP1, p70S6K et RPS6, conduisant finalement à l'inhibition de l'initiation de la traduction cap-dépendante, en mettant fin au recrutement du complexe du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4F (eIF4F) dans la structure de la coiffe 5' (Connolly *et al.*, 2006; Ivanova, Park and Kenneth, 2019). Cette traduction dépend de la présence d'IRES sur les ARNm. Par exemple, HIF1-alpha possède un IRES utilisable en normoxie comme en hypoxie (Lang, Kappel and Goodall, 2002) De même, certains facteurs de croissance, tels que VEGF et FGF-2, favorisent l'angiogenèse et la migration (Akiri *et al.*, 1998; Créancier *et al.*, 2000), tandis que l'oncogène c-Myc régule la prolifération cellulaire en situation de stress (Bordone *et al.*, 2024). Dans le cadre du cancer du sein, l'augmentation d'expression de 4E-BP1 et eIF4G permet la traduction du VEGF (Braunstein *et al.*, 2007). L'hypoxie peut également réguler l'expression du gène *GJA1*, qui peut être une cible de HIF-1α dans les cellules de l'utérus (Wen *et al.*, 2022).

De la même manière, l'exposition prolongée des cellules PC3 au milieu conditionné osseux (ObCM) a induit une surexpression de GJA1-20k qui est restée stable au cours du temps contrairement à l'hypoxie. Cette régulation soutenue suggère un rôle de cette isoforme dans l'adaptation des cellules métastatiques prostatiques au microenvironnement osseux, où GJA1-20k pourrait agir comme un facteur d'ajustement métabolique et structurel, favorisant la survie à long terme dans la niche ostéogénique, et probablement impliquée dans la dormance cellulaire.

L'ObCM induit l'expression de GJA1-20k mais le ou les mécanismes d'action impliqués restent à élucider. Afin d'identifier des candidats potentiels, nous nous sommes appuyés sur l'analyse protéomique des milieux conditionnés réalisée lors des travaux de thèse du Dr Jonathan Boucher. Celle-ci a évidemment révélé la présence de nombreuses protéines dont la périostine,

une protéine matricielle. Il a ensuite été montré que la périostine d'une part stimulait l'expression de Cx43 et entrainait sa localisation dans les lamellipodes et d'autre part induisait un effet promigratoire sur les cellules LNCaP surexprimant la Cx43. Dans d'autres études, il a aussi été montré un rôle important de la chimiokine CXCL12, présente également dans l'ObCM, dans le développement de métastases du cancer de la prostate en stimulant la migration dépendante de Rac1 via son récepteur CXCR4 (Dirat *et al.*, 2015). Il serait intéressant de stimuler les cellules PC3 avec ces deux molécules afin de vérifier si elles permettraient la surexpression de l'isoforme courte. Des résultats préliminaires montrent que la périostine est capable d'induire l'expression de GJA1-20k dans les cellules PC3 et LNCaP, mais pas dans les cellules C4-2B, après 17h de traitement (Figure 75). Fait intéressant, l'expression de l'isoforme est corrélée à la surexpression de E-cadhérine dans les PC3, mais pas les LNCaP, qui sont plus migrantes en présence de PST. La lignée C4-2B ne semble pas être impactée, ni même exprimer intrinsèquement de GJA1-20k.

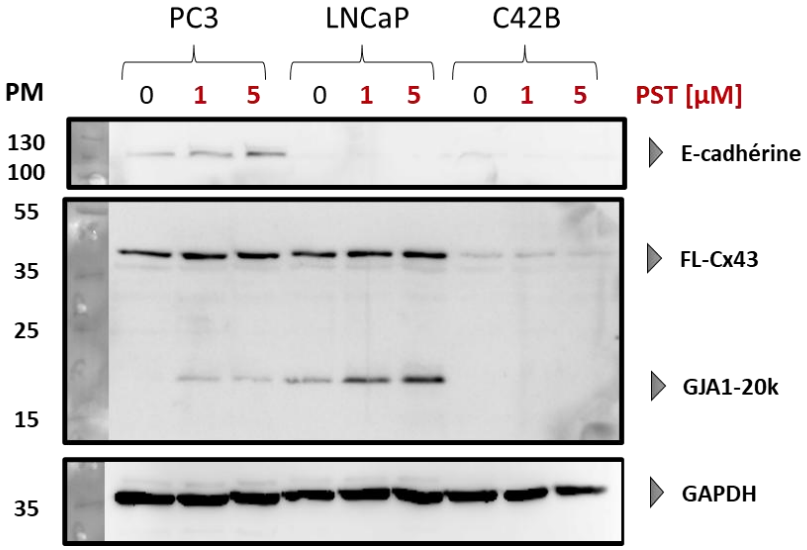


Figure 75 : La périostine stimule l'expression de GJA1-20k dans les cellules tumorales prostatiques des lignées cellulaire PC-3 et LNCaP

Western blot de l'expression de Cx43 totale (FL-Cx43), de GJA1-20k et de la E-cadhérine dans les lignées prostatiques PC3, LNCap et C4-2B en fonction d'un traitement à la périostine à différentes concentrations (0 à 5 µM). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt protéique (N = 1).

Le milieu conditionné osseux augmente l'expression de GJA1-20k dans les PC3 et LNCaP. Des données préliminaires indiquent que l'hypoxie régule également positivement GJA1-20k dans la lignée LNCaP et MDA-MB-231, avec un profil similaire de l'expression de GJA1-20k.

D'après ces résultats, le ou les mécanismes permettant d'induire l'expression de GJA1-20k dans les cellules PC-3 en hypoxie ou après un traitement à la périostine semblent aussi être présents et fonctionnels dans les cellules LNCaP mais pas dans les cellules C4-2B. Il serait intéressant d'élucider les différences entre ces deux dernières lignées. L'analyse transcriptomique comparée de ces deux lignées ne révèle pas de différence notable dans l'expression des protéines classiquement associées à la traduction alternative IRES-dépendante, notamment les ITAFs (IRES Trans-Acting Factors) comme PTB1 ou HnRNPs, ce qui suggère que la différence observée résulte probablement de mécanismes régulateurs en amont. Il serait également intéressant de tester ces conditions expérimentales sur d'autres lignées cancéreuses, notamment celles présentant un ostéotropisme (Liu *et al.*, 2004).

Les taux d'ARNm de *GJA1* augmentent en présence d'ObCM contrairement à l'hypoxie par rapport à la normoxie. Ce qui indiquerait ici, que l'augmentation d'expression de GJA1-20k est due à une hausse de la transcription, et non à une traduction alternative.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression de GJA1-20k, notamment la voie mTOR ou la voie Mnk1/2. Il a été démontré que l'inhibition de ces voies induisent l'expression de GJA1-20k dans les cardiomyocytes murins (Smyth and Shaw, 2013) et dans des cellules cancéreuses humaines (salat-canela 2014). Ainsi, l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine augmente l'expression de GJA1-20k dans les cellules cancéreuses de l'utérus HeLa (Salat-Canela *et al.*, 2014).

Nous avons donc testé cet inhibiteur sur les lignées cancéreuses prostatiques et observé l'effet sur l'expression de GJA1-20k. Après 17h de traitement, la rapamycine a augmenté l'expression de GJA1-20k dans les cellules LNCaP ainsi que celle de la Cx43 totale, comme cela a déjà été décrit au laboratoire (Boucher, 2018). Pour le modèle PC3 et C4-2B, des résultats préliminaires indiquent qu'un traitement à la rapamycine ne génère aucune modification de l'expression de GJA1-20k (Figure 76) et que cette voie ne semble donc pas majoritaire.

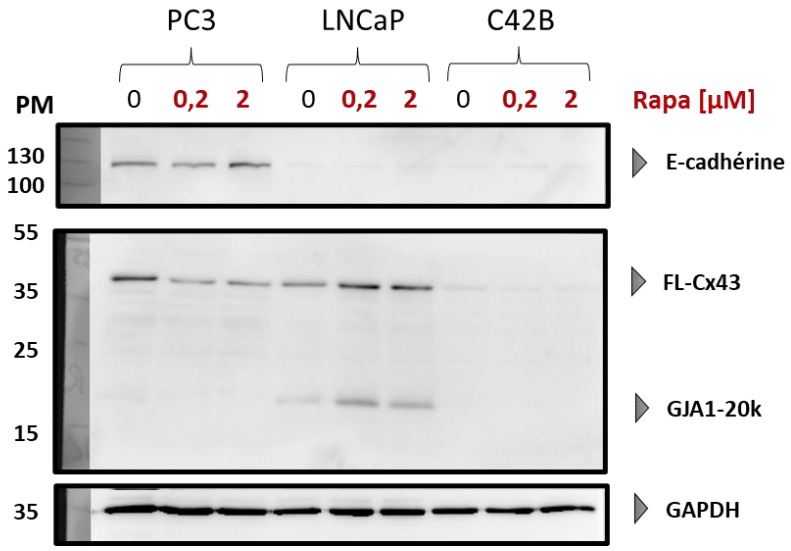


Figure 76 : Implication de la voie mTOR dans le contrôle d'expression de GJA1-20k dans différentes lignées cancéreuses prostatiques

Western blot montrant l'expression de Cx43 totale (FL-Cx43), de GJA1-20k et de la E-cadhérine dans les lignées prostatiques PC3, LNCaP et C4-2B après un traitement à la rapamycine (rapa) à différentes concentrations (0,2 et 2 µM). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt protéique (N = 1).

L'implication de la voie Mnk1/2 a ensuite été testée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, CGP 57338. Son utilisation sur des cellules cancéreuses mammaires a eu pour conséquence une augmentation de l'expression de GJA1-20k corrélée à une inhibition de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, cible de mnk1/2 (Salat-Canela *et al.*, 2014). Les ARNm avec des 5'UTR longs, sont très sensibles à la phosphorylation d'eIF4E par Mnk1/2. La phosphorylation d'eIF4E modifie sa capacité à initier la traduction de certains ARNm, qui favorise alors la traduction cap-dépendante. Inhiber Mnk1/2 permet de diminuer la phosphorylation de eIF4E, favorisant la libération des ribosomes et des facteurs d'initiation pour traduire le transcrit GJA1 de façon interne, ce qui augmente l'expression de GJA1-20k.

L'utilisation de cet inhibiteur sur les trois lignées cancéreuses prostatiques montre, comme attendu, une inhibition de la phosphorylation d'eIF4E sans effet sur la quantité totale de la protéine. Cependant, contrairement aux résultats publiés avec les cellules cancéreuses mammaires, l'inhibition de Mnk1/2 à cette concentration d'inhibiteur utilisée n'a pas induit l'expression de GJA1-20k dans les cellules PC-3, LNCaP et C4-2B cultivées dans différentes conditions expérimentales (Figure 77). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'inhibition de

Mnk1/2 ne serait pas impliquée pour stimuler la surexpression de l'isoforme en hypoxie ou en présence d'ObCM.

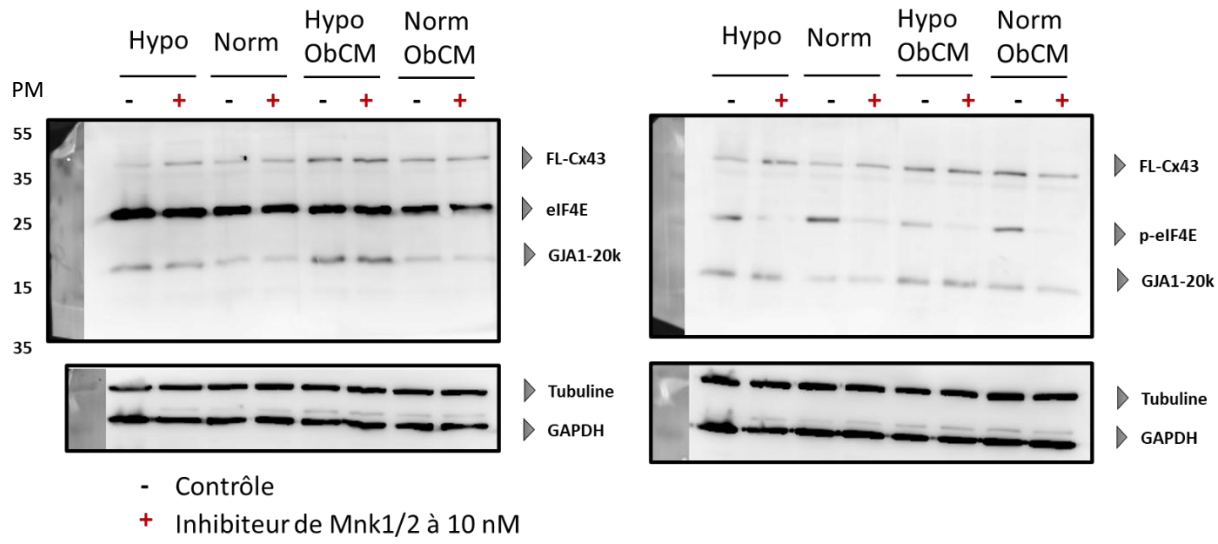


Figure 77 : La voie Mnk1/2 ne modifie pas l'expression de GJA1-20k dans les cellules PC-3

Western blot (N =1) pour analyser l'expression de Cx43, de GJA1-20k, et de E-cadhérine après un traitement des cellules PC-3 au tomivosertib (HY-100022, MCE) à 10 nM, un inhibiteur de Mnk1/2. Hypo = Hypoxie, Norm = Normoxie. La GAPDH et la Tubuline ont été utilisées comme contrôle de dépôt.

De manière intéressante, l'ObCM, et également l'hypoxie, ont induit également dans les cellules PC3 une redistribution du réseau mitochondrial comparable à celle observée dans les cellules PC3 surexprimant GJA1-20k. Finalement, la combinaison des deux conditions, hypoxie et ObCM, mimant la niche ostéogénique amplifie cette redistribution mitochondriale.

Nos expériences de co-immunoprécipitation ont par ailleurs montré que GJA1-20k peut interagir avec TOM20, renforçant l'hypothèse selon laquelle cette isoforme interagit directement ou indirectement avec les mitochondries dans le cadre du cancer de la prostate.

Étant donné que l'on observe également une diminution du nombre de mitochondries dans ces conditions par rapport à la normoxie, il est plausible que GJA1-20k favorise l'expression et/ou la stabilité de PINK1 au niveau de la membrane mitochondriale externe, ainsi que celle de TOM20. Cette régulation pourrait ainsi stimuler la mitophagie, ce qui expliquerait la réduction du nombre de mitochondries observée, par la baisse de TOM20. Concernant la redistribution

du réseau mitochondrial, dans un environnement considéré comme « stressant » en raison de l'hypoxie, GJA1-20k pourrait contribuer à une réorganisation dynamique du réseau mitochondrial via le cytosquelette, comme cela a été décrit dans les modèles cardiaques.

Des éléments pouvant étayer cette hypothèse apparaissent dans une revue, traitant de l'impact de la fission dans la mise en quiescence des cellules souches hématopoïétiques (CSH) au sein de la niche osseuse. Il est ainsi suggéré que pour maintenir l'auto-renouvellement, les CSH entrent en quiescence en jouant sur la dynamique mitochondriale fusion/fission favorisant le maintien de mitochondries en « pointillés/punctate » (petites, fragmentées), à faible activité métabolique et en consommation de glucose réduite (Luis, Lawson and Kranc, 2020).

Il n'existe pas de consensus quant à savoir si la fission ou la fusion mitochondriale est le principal mécanisme induisant la quiescence des cellules cancéreuses, certaines études attribuant ce rôle à la fission, d'autres à la fusion. Toutefois, la présence de petites mitochondries fragmentées, associée à une diminution de leur nombre et de leur activité, favorise l'entrée en quiescence. Ce phénomène semble dépendre du type de cancer, du stade évolutif et de la proportion de cellules souches cancéreuses (Boulton and Caino, 2022; Xing *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2024). Il est tout de même suggéré que les cellules cancéreuses possèdent des mitochondries fragmentées par fission, ce qui permet une meilleure dynamique cellulaire avec augmentation de la migration/invasion/motilité, une distribution des mitochondries plutôt périphérique, et une diminution de l'OXPHOS.

L'hypoxie induit une réduction du transport antérograde des mitochondries, les regroupant près du noyau, ce qui augmente la production de ROS, permettant une action plus rapide de HIF1-α (Agarwal and Ganesh, 2020). Une autre étude montre que l'accumulation de mitochondries près du noyau augmente la production de ROS, et que le blocage de cette accumulation de mitochondries par déstabilisation des microtubules a entrainé l'inverse (baisse de production de ROS) (Al-Mehdi *et al.*, 2012). Cette déstabilisation n'a pas modifié la localisation de HIF-1α, mais a amélioré sa liaison aux prometteurs de gènes cibles. GJA1-20k permet de réduire la production de ROS et permet une redistribution du réseau vers la périphérie dans les cellules PC3, on peut donc supposer qu'elle limiterait l'activité de HIF-1α, et donc les conséquences de l'hypoxie pour les cellules cancéreuses métastatiques prostatiques. Il serait pertinent d'étudier la localisation de HIF-1α au sein des cellules surexprimant l'isoforme ou cultivées en présence d'ObCM.

Le calcium présent dans le tissu osseux aux abords des cellules tumorales est également considéré comme un élément important du microenvironnement. Au sein de la niche ostéogénique, sa concentration est importante et peut conditionner l'activité des cellules tumorales et osseuses. L'ion calcique (Ca^{2+}) agit comme un signal important pour les cellules osseuses car il stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes via des récepteurs sensibles au calcium (CaSR, Calcium-Sensing Receptor), et influence la mobilité et l'homing des cellules cancéreuses. Physiologiquement, le calcium participe à la minéralisation de la matrice extracellulaire. La régulation du calcium dans les cellules cancéreuses est d'ailleurs très finement régulée puisqu'il s'agit d'un second messager ubiquitaire pouvant participer à de multiples processus (Stewart, Yapa and Monteith, 2015; Bong and Monteith, 2018).

Lors d'études précédentes au laboratoire, des expériences à l'aide d'une sonde fluorescente avaient montré que la surexpression de la Cx43 dans les LNCaP était capable d'augmenter le nombre d'oscillations calciques spontanées. Sachant que cette lignée cellulaire présentait également une légère augmentation d'expression de GJA1-20k, l'hypothèse d'un effet lié à l'isoforme courte pouvait être émise. Lors de la présente étude sur la lignée PC3, les résultats obtenus montrent que GJA1-20k permet aussi une augmentation du nombre de cellules oscillantes mobilisant le calcium ainsi que du nombre d'oscillations par cellule. La persistance de cette mobilisation calcique dans un milieu sans calcium extérieur indique que l'origine du calcium libre est principalement intracellulaire, provenant par exemple soit du réticulum endoplasmique grâce au stockage via les pompes SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase*), ou soit des mitochondries via l'uniporter mitochondrial de calcium (MCU). Plus rarement, l'ion calcique peut provenir du noyau en lien avec l'activation de facteurs de transcription dépendants du Ca^{2+}, comme NFAT (N*uclear Factor of Activated T-cells*) ou encore du lysosome, de l'endosome, du peroxysome et de l'appareil de Golgi (Baker, Edwards and Rickard, 2013). Au vu de l'importance du signal observé et de sa signature calcique, l'hypothèse la plus probable parait être celle du calcium libéré depuis le RE et notamment grâce aux récepteurs à l'IP3 (IP3R). Les résultats reposant sur l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, la Xestospongine C, ainsi que des analyses préliminaires par Western blot semblent confirmer cette hypothèse et l'implication préférentielle des récepteurs à l'IP3 de type 2 (IP3R2) (Figure 78).

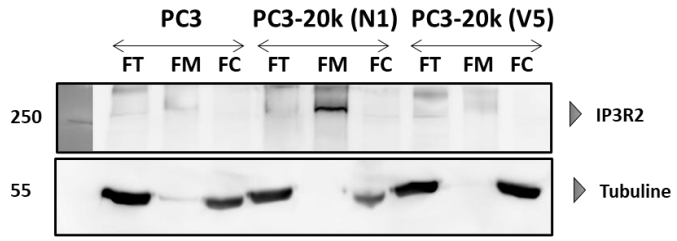


Figure 78 : La surexpression de GJA1-20k dans les cellules métastatiques prostatiques induit une augmentation d'expression de l'IP3R2

Western blot de l'expression du récepteur à l'IP3 de type 2 dans les fractions protéiques totales (FT), membranaire (FM) et cytosolique (FC) dans les cellules PC3 surexprimant ou non GJA1-20k, après 48h de culture. La Tubuline a été utilisée comme contrôle de dépôt protéique (N = 2).

Afin de déterminer si ces oscillations étaient dépendantes de la Cx43 ou de sa localisation membranaire, les mêmes expériences en présence ou absence de calcium extérieur ont été réalisées. Les données préliminaires tendent à montrer que les effets observés sont propres à GJA1-20k, et non à la localisation membranaire de la Cx43 ou la surexpression de la Cx43 (données non-montrées).

GJA1-20k pourrait ainsi influencer la mobilisation des ressources calciques intracellulaires, entraînant une organisation spatiale et fonctionnelle différente du calcium en sa présence. Reste à déterminer dans quel but cette modulation s'opère, et si elle contribue aux effets métaboliques et mitochondriaux observés dans nos travaux.

L'impact de GJA1-20k sur les capacités métaboliques et mitochondriales pourrait ainsi être lié à cet effet mobilisateur des ressources calciques intracellulaires et/ou de stimulation de la dynamique calcique.

Puisque GJA1-20k altère l'activité et la distribution mitochondriale, il serait pertinent par exemple d'examiner l'expression et la fonctionnalité du complexe MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). Le calcium mitochondrial active plusieurs enzymes clés du cycle de Krebs, notamment la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase, stimulant ainsi la production d'ATP. En captant le Ca^{2+} libéré par le réticulum endoplasmique (via les récepteurs IP3R ou RyR), la mitochondrie agit comme un tampon calcique, régulant la fréquence des oscillations cytosoliques de Ca^{2+} et prévenant une surcharge calcique délétère. Cependant, une accumulation excessive de calcium mitochondrial peut activer la voie apoptotique.

Dans les cellules cancéreuses, l'expression du MCU apparaît contextuelle et dépendante du type tumoral et de l'environnement métabolique : elle peut être augmentée pour soutenir la croissance et la survie, ou au contraire diminuée pour éviter une mort cellulaire liée à la surcharge calcique. Le MCU influence directement le métabolisme tumoral (effet Warburg *versus* respiration oxydative), la migration et l'invasion (via la production de ROS et la signalisation dépendante du Ca^{2+} mitochondrial), ainsi que la réponse au stress oxydatif (D'Angelo and Rizzuto, 2023).

Dans différents modèles métastatiques du sein, il a été montré que la surexpression du MCU augmente la concentration de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale, favorisant la motilité et l'invasion tumorale via une voie de signalisation mitochondrie-noyau dépendante des ROS et de HIF-1α. À l'inverse, la répression du MCU réduit les niveaux de ROS cytosoliques et diminue l'activité transcriptionnelle de HIF-1α (Tosatto *et al.*, 2016).

Enfin, une revue récente rapporte que plusieurs gènes impliqués dans la signalisation calcique sont altérés dans le cancer de la prostate, incluant des amplifications ou mutations du gène codant le MCU, pouvant modifier sa fonctionnalité. Dans ce contexte, il serait particulièrement intéressant d'examiner si GJA1-20k interfère avec cette régulation calcique mitochondriale, en modulant par exemple le couplage RE-mitochondrie ou la capacité de captation du Ca^{2+}, et si cela contribue à la réduction de la production de ROS et à la limitation de l'activité de HIF-1α observées précédemment (L. Wang *et al.*, 2018).

L'objectif général de ces travaux a consisté en l'observation du phénotype résultant de la surexpression de l'isoforme GJA1-20k, et d'en comprendre l'impact dans un contexte de métastase osseuse. Il serait intéressant de voir si ces résultats sont reproductibles dans d'autres lignées de PCa comme les LNCaP, qui n'ont pas métastasé dans les os, afin d'observer si les effets sont spécifiques aux métastases osseuses, ou si cela est retrouvé dans la lignée C4-2B par exemple. De plus, il serait pertinent de tester ces effets dans une lignée non tumorale, telle que RWPE, représentant des cellules épithéliales prostatiques humaines normales, ou encore dans d'autres types de cancers, comme le cancer du sein, en utilisant par exemple la lignée MDA-MB-231.

Les expériences menées jusqu'à maintenant ont été réalisée en culture bidimensionnelle (2D), surtout pour ce qui concerne l'étude du microenvironnement osseux. Afin de développer un

modèle tridimensionnel (3D) de niche osseuse, des expériences de mise au point sont actuellement en cours pour fabriquer de petits d'objets concentriques par bio-impression en utilisant une matrice composée de Gel-MA enrichie à 1% d'hydroxyapatite (Figure 79).

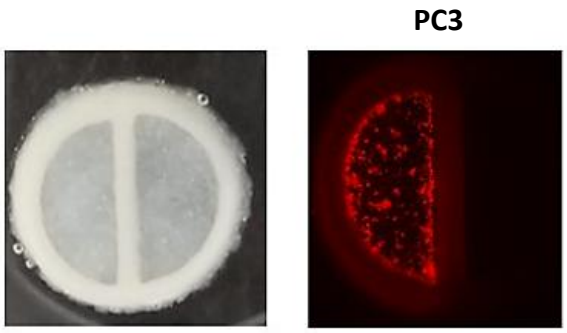


Figure 79 : Bio-impression 3D

Exemple d'objet réalisé par bio-impression 3D en Gel-MA+1% d'hydroxyapatite. L'adhérence des cellules PC3, marquées au Vybrant DiL, a été évaluée sur cette matrice minéralisée après 48 de culture.

Afin de se rapprocher davantage des conditions physiologiques, une perspective intéressante serait d'évaluer ces mécanismes *in vivo*, par injection de cellules tumorales soit par voie intraveineuse ou intracardiaque, soit directement au niveau osseux. Cela permettrait de déterminer si les cellules surexprimant GJA1-20k colonisent préférentiellement le tissu osseux, se développent plus rapidement ou au contraire entrent en quiescence. Idéalement, il serait également pertinent d'étudier des extraits de tumeurs de patients, afin de déterminer, par Western blot si l'expression de cette isoforme varie selon le stade du cancer. En effet, l'approche par immunocytochimie est impossible du fait que tout anticorps reconnaissant GJA1-20k reconnaît également la Cx43 totale.

CONCLUSION

Les avancées récentes concernant les rôles attribués à l'isoforme courte de la connexine 43, GJA1-20k, dans différents modèles physio-pathologiques, notamment cardiaques et cérébraux, combinées à son expression dans des lignées cancéreuses prostatiques (PC-3 et LNCaP), ont soulevé la question de sa contribution potentielle aux processus tumoraux.

De nombreuses fonctions communes aux modèles cardiaques et cérébraux ont pu être mises en évidence dans la lignée cancéreuse métastatique prostatique PC-3 :

- **Rôle de protéine chaperonne** : La surexpression de GJA1-20k a permis l'adressage membranaire de la Cx43 totale améliorant sa fonctionnalité canalaire
- **Rôle de protéine de réponse au stress** : L'exposition des cellules PC-3 à des conditions hypoxiques ou oxydatives a induit la surexpression de GJA1-20k
- **Rôle de régulateur de la fonction mitochondriale** : La surexpression de GJA1-20k a réduit l'activité mitochondriale et a induit une redistribution périphérique des mitochondries

La surexpression de GJA1-20k a également entraîné plusieurs effets sur les cellules PC-3 :

- Une diminution des capacités prolifératives
- Une diminution du processus d'EMT, avec une surexpression de E-cadhérine
- Une diminution des capacités migratoires et invasives
- Une diminution de la masse mitochondriale
- Une diminution de la dépendance au glucose
- Une augmentation de la résistance à l'apoptose
- Une augmentation de la résistance à l'anoïkis

La suite de cette étude a porté sur l'analyse du rôle GJA1-20k dans un modèle mimant la niche métastatique osseuse, site de mise en quiescence puis en dormance des cellules cancéreuses métastatiques prostatiques. Pour simuler le microenvironnement osseux, du milieu conditionné préparé à partir d'ostéoblastes a été utilisé. La niche ostéogénique étant également caractérisée par une faible concentration en oxygène, le facteur hypoxie a été ajouté afin de mimer cette condition. Nos résultats montrent :

- Une augmentation de l'expression de GJA1-20k en hypoxie
- Une augmentation de l'expression de GJA1-20k en présence du milieu conditionné osseux
- Une augmentation de l'adhérence aux ostéoblastes corrélée à une modification de l'expression de la cadhérine-11
- Que l'hypoxie favorise la mise en quiescence des cellules surexprimant GJA1-20k
- Que des conditions mimant la niche ostéogénique comme l'hypoxie et/ou un milieu conditionné osseux, induisent une redistribution périphérique des mitochondries
- Que la surexpression de GJA1-20k augmente les capacités de mobilisation calcique

La surexpression de GJA1-20k, en favorisant l'adressage membranaire de la Cx43, laissait initialement penser que les cellules PC-3 verraient leurs capacités agressives potentialisées, en particulier en présence du milieu conditionné osseux, comme c'est le cas pour les cellules LNCaP. Or, nos observations vont à l'encontre de cette hypothèse. L'ensemble des résultats suggère au contraire que l'expression de GJA1-20k confère aux cellules métastatiques prostatiques un profil de quiescence métabolique, facilitant leur mise en quiescence au sein de la niche métastatique osseuse.

Les données préliminaires suggèrent que les effets anti-migratoires et anti-invasifs, ainsi que sur la résistance à l'anoïkis et à l'apoptose, sont spécifiques à GJA1-20k et ne résultent pas simplement de la présence membranaire de Cx43. En effet, ces modulations ne sont pas observées lorsque les cellules surexpriment également la Cx43. Il reste néanmoins à déterminer si ces effets sont une conséquence directe du ralentissement du cycle cellulaire, ou au contraire, s'ils en sont la cause. L'identification des voies de signalisation impliquées constitue une perspective essentielle.

L'interactome de GJA120k reste également à étudier, notamment le lien avec l'actine et les microtubules, puisque ces structures protéiques sont déjà impliquées dans les modèles cardiaques et cérébraux. En théorie, les protéines interagissant avec la Cx43 via son domaine C-terminal pourraient également se lier à GJA1-20k. Il conviendrait par ailleurs de préciser si son rôle de protéine chaperonne se limite à la Cx43, ou si d'autres protéines sont concernées, et de déterminer sa localisation subcellulaire exacte ainsi que ses partenaires d'interaction.

Enfin, les mécanismes par lesquels l'hypoxie stimule l'expression de GJA1-20k restent à élucider. Les données suggèrent une régulation par traduction alternative, distincte de l'augmentation observée sous l'influence du microenvironnement osseux, dont le mécanisme

reste à définir. Parmi les pistes envisagées figure la périostine, capable d'induire l'expression de GJA1-20k dans les cellules LNCaP.

Ainsi, nos résultats mettent en évidence, pour la première fois, les rôles spécifiques de GJA1-20k dans le contexte du cancer de la prostate métastatique. Des études complémentaires sur d'autres types de cancers permettront de déterminer si ces fonctions sont généralisables. Il convient de garder à l'esprit que, comme pour les connexines, cette isoforme pourrait également exercer des effets ambivalents selon le type cellulaire, le stade évolutif de la tumeur ou son statut hormonal.

Un résumé graphique des principaux résultats de ces travaux de thèse et hypothèses/perspectives est disponible en figure 80.

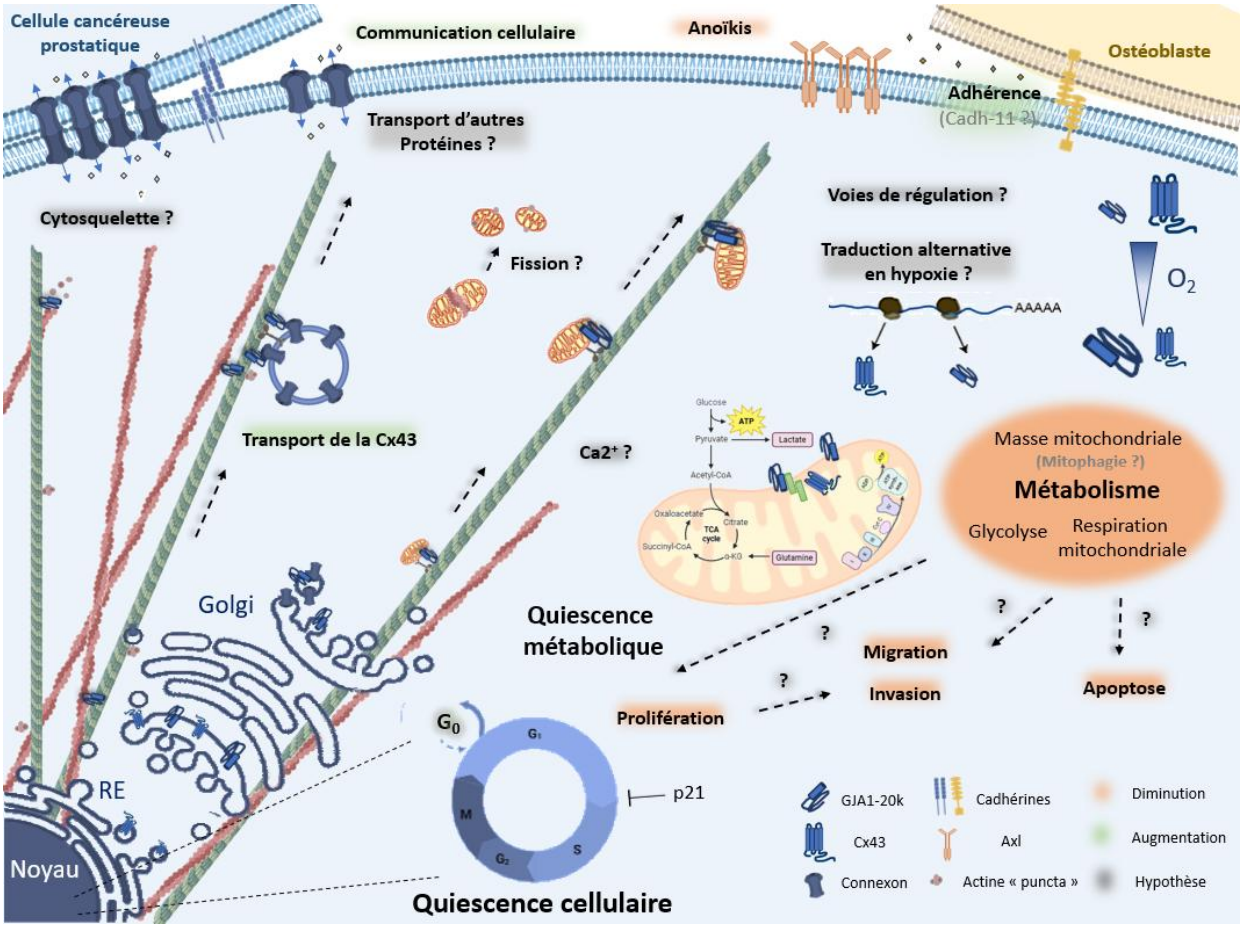


Figure 80 : Synthèse sur les rôles de GJA1-20k dans le cadre du cancer métastatique prostatique et principales perspectives

ANNEXE

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a été utilisée pour la rédaction d'un article scientifique soumis à FEBS Journal, joint en annexe :

- **Article :** ***The bone metastatic niche enhances GJA1-20k Expression and Mitochondrial Remodeling in Metastatic Prostate Cancer Cells***

The bone metastatic niche enhances GJA1-20k Expression and Mitochondrial Remodeling in Metastatic Prostate Cancer Cells

Sarah FOURNIER[1], Nicolas DELANNOYE[1], Isabelle COURTIN[1], Thomas HARNOIS[1], Anne CANTEREAU[2], Jonathan CLARHAUT[3,4], Clarisse VANDEBROUCK[5], Arnaud MONVOISIN[1]* and Laurent CRONIER[1]*

[1]Laboratory Channels and Connexins in Cancer and Cell Stemness (4CS) – UR 22751 – University of Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France;

[2]UAR CNRS 2038 BioSanté, ImageUP, University of Poitiers, Poitiers, France;

[3]Pharmacology of Antimicrobial Agents and antibioResistance (PHAR2) – INSERM U1070 – University of Poitiers; 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France;

[4]Pharmacokinetics-Toxicology Laboratory, University Hospital Center of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France;

[5]PReTI Laboratory – UR 24184 – 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France.

*: co-last authors

Correspondence: Laurent Cronier, Laboratory Channels and Connexins in Cancer and Cell Stemness (4CS) – UR 22751 – University of Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 09, 86073 Poitiers, France. Email: Laurent.Cronier@univ-poitiers.fr; Phone: +33-5-49-45-37-52

For Review Only

Running title: GJA1-20k and the bone metastatic microenvironment

Abbreviations: PCa, Prostate Cancer; SRE, skeletal-related events; Cx43, connexin43; FL-Cx43, Full Length Cx43; ObCM, osteoblastic-conditioned medium; CT, Carboxyl-Terminal; EMT, Epithelial-to-Mesenchymal Transition; IRES, internal ribosome entry sites; PC-3, human cell line from bone metastasis; LNCaP, human prostatic cell line from lymph node; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, fetal bovine serum; OB, osteoblastic cells; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween solution; HRP, horseradish peroxidase; BSA, bovine serum albumin; RT, room temperature; ROS, reactive oxygen species; Co-IP, Co-immunoprecipitation; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction; SD, standard deviation; ANOVA, one-way analysis of variance.

ABSTRACT

Bone metastases are a major cause of morbidity in advanced prostate cancer (PCa), where tumor cells adapt to a hypoxic and osteoblast-rich microenvironment. Here, we investigated how endosteal niche conditions regulate GJA1-20k expression and mitochondrial dynamics in metastatic PCa cells. We demonstrate that osteoblastic-conditioned medium (ObCM) and hypoxia synergistically upregulate GJA1-20k, without altering full-length Cx43 or GJA1 mRNA levels, indicating a post-transcriptional regulation. This result correlates with a redistribution of mitochondria from perinuclear to peripheral regions. Interestingly, by co-immunoprecipitation experiments, we show that GJA1-20k interacts with mitochondria. Finally, stable overexpression of GJA1-20k in PCa cells was sufficient to reproduce this mitochondrial remodeling. These findings identify GJA1-20k as a stress-adaptive effector that links translational reprogramming to metabolic plasticity within the bone metastatic niche, highlighting new therapeutic opportunities to target PCa dormancy and progression.

Key words: prostate cancer; GJA1-20k; metastasis; hypoxia; bone microenvironment; mitochondria

For Review Only

INTRODUCTION

Worldwide, prostate cancer (PCa) is the second most commonly diagnosed cancer in men and ranks fifth among cancer-related causes of death globally, highlighting its significant public health impact [1]. PCa is notably characterized by a high occurrence of bone metastases which are associated with severe skeletal-related events (SRE) resulting from disruptions in both bone formation (osteogenesis) and bone resorption (osteolysis). Unlike many other cancers, PCa uniquely exhibits a risk of metastasis even after initial treatment of the primary tumor and a prolonged disease-free interval. This is largely due to tumor dormancy, during which disseminated cancer cells remain in a quiescent state before potentially reactivating. Studies estimate that around 40% of prostate cancer patients experience metastatic relapse following such dormancy [2].

Within the bone marrow, disseminated PCa cells can colonize two distinct microenvironments, the perivascular niche and the osteogenic niche [3]. The osteogenic niche composed mainly of osteoblastic lineage bone cells and matrix components, acts as the main site for secondary metastases [4]. Soluble factors secreted by these bone cells, along with interactions involving osteoclasts, endothelial cells and immune cells, influence the dormancy and reactivation of metastatic tumor cells. Additionally, this osteogenic niche is defined by low

oxygen levels, around 1% O_2, which modulate gene expression, metabolic adaptation and stress response in PCa cells [5].

Bone metastasis formation and development is a complex, multifactorial process involving diverse molecular and cellular actors. Among them, connexin43 (Cx43), a structural protein of gap junctions, has been increasingly recognized for its involvement in prostate cancer (PCa) metastasis and progression, through both channel-dependent or channel-independent functions. *In vivo*, Cx43 displays a specific expression signature in bone metastases compared to other metastatic sites and connexins, with levels varying in patients throughout PCa progression [6].

The impact of Cx43 in the development of prostate is complex since it may exert tumor-suppressive effects in initial stages of PCa and also promote migration and invasion of low aggressive PCa cell model (LNCaP cells), thereby facilitating metastatic potential in advanced stages [6]. We previously found that Cx43 expression in prostate cancer cells is modulated by the bone microenvironment, as shown in LNCaP cells exposed to osteoblastic-conditioned medium (ObCM), which enhances its membrane localization and promigratory function. During PCa progression, especially in androgen-insensitive cells like PC-3 derived from bone metastases, Cx43 trafficking to the plasma membrane is impaired [7], resulting in cytoplasmic retention [8]. This mislocalization disrupts responsiveness to bone-derived soluble factors, as ObCM fails to induce migration even in Cx43-overexpressing PC-3 cells [6]. Immunohistochemical analysis of bone metastases further confirms cytoplasmic accumulation of Cx43 in advanced PCa, suggesting that subcellular localization, not just expression level, governs its functional impact within the metastatic niche [6].

Recently, a short isoform of Cx43, arising from alternative translation and corresponding to the end part of the fourth transmembrane domain and the entire carboxyl-terminal (CT) domain of Cx43, has been identified and termed GJA1-20k [9].

GJA1-20k acts as an actin-capping protein, stabilizing actin filaments and facilitating microtubule-directed trafficking of full-length Cx43 to the plasma membrane, essential for gap junction assembly [10,11]. Additionally, GJA1-20k localizes to the outer mitochondrial membrane, where it promotes a protective form of mitochondrial fission that maintains ATP production and reduces oxidative stress, supporting cellular adaptation under metabolic stress [12,13].

GJA1-20k has been detected in various cell types, including cancer cells such as PCa cells [14]. In the cardiac model, GJA1-20k is recognized as an endogenous stress response protein that is upregulated under ischemic or ischemia/reperfusion conditions, where it

For Review Only

supports cardioprotection by maintaining intercellular coupling between myocytes and attenuating cardiac hypertrophy [10,12,15]. Similarly, overexpression of GJA1-20k in astrocytes promotes neuronal viability and recovery after traumatic brain injury in rat [16].

In the cancer field, although GJA1-20k expression has been observed in several cell lines, its functional role remains largely unexplored [14,17]. James et al. (2018) [18] demonstrated in a mouse mammary gland epithelial cell line (NmuMG cells) that GJA1-20k expression decreases relative to full-length Cx43 during TGFβ1-induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). This transition is accompanied by increased trafficking of full-length Cx43 to the plasma membrane as previously observed in cardiac cells. In prostate cancer cells, we previously showed that GJA1-20k is endogenously expressed in LNCaP cells and is significantly upregulated under ObCM [6] or exposure to rapamycin, a specific inhibitor of mTOR [19].

Since GJA1-20k is known to act as a stress-response protein that modulates mitochondrial dynamics in cardiac and neural tissues, and considering the hypoxic and metabolically challenging environment of the osteogenic bone niche, the present study sought to determine how hypoxia and ObCM affect GJA1-20k expression in the bone metastatic prostate cancer cell model PC-3. Building on recent findings showing that GJA1-20k plays a role in mitochondrial fission, subcellular redistribution, and overall cellular adaptation to stress, mechanisms crucial for metastatic plasticity and dormancy, this study also investigates how these niche conditions and GJA1-20k overexpression impact mitochondrial distribution in metastatic PCa cells. In this study, we first demonstrate that GJA1-20k is upregulated by ObCM and hypoxia. We further show that GJA1-20k interacts with mitochondria and is sufficient to drive their peripheral redistribution in metastatic PCa cells, highlighting its role in stress-adaptive remodeling. Our results provide new insights into how the bone microenvironment regulates PCa cell adaptation through GJA1-20k, potentially informing novel therapeutic strategies targeting metastatic progression and dormancy.

For Review Only

RESULTS

GJA1-20k is selectively upregulated by osteoblast-conditioned medium and hypoxia

To investigate how specific conditions of the bone niche influence GJA1-20k expression in metastatic prostate cancer cells, we first examined the effect of osteoblast-conditioned medium (ObCM) on PC-3 cells. As shown in Figure 1, GJA1-20k expression progressively increased over time, with a marked upregulation by 5-fold from 24 to 96 h of

culture in the presence of ObCM. In contrast, cells maintained in control medium did not exhibit significant changes in GJA1-20k levels. Notably, full-length Cx43 (FL-Cx43) levels remained relatively stable throughout the time course, with only a slight significant increase at 48 h. These data indicate that ObCM selectively induces GJA1-20k expression in PC-3 cells, independently of FL-Cx43, suggesting a niche-specific regulatory mechanism.

To assess the impact of hypoxia, a defining feature of the osteogenic bone niche, on GJA1-20k expression, PC-3 cells were cultured under low oxygen conditions (1% O_2) for 48 and 72 hours. Hypoxia induction was confirmed by HIF1-alpha increased expression (See supplementary Figure S1). As shown in Figure 2A, hypoxia induced notable cell morphological changes after 48 h, characterized by cell elongation consistent with a cellular stress response. Western blot analysis revealed a two-fold increase in GJA1-20k expression after 48h (Figure 2B) which was not maintained after 72 or 96 h of hypoxia (Figure 2C), indicating a transient induction. Reoxygenation for 24 h following hypoxic exposure reversed this effect (Figure 2B), restoring GJA1-20k expression to baseline, while no upregulation was observed under normoxic conditions (Figure 2B, C). Importantly, full-length Cx43 remained unchanged at the same time points suggesting a specific regulation of the GJA1-20k expression. Transcript analysis confirmed that GJA1 mRNA level was unaffected by hypoxia (Figure 2D), supporting a post-transcriptional mechanism involved in the specific increase of GJA1-20k expression. Altogether, these results demonstrate that GJA1-20k is transiently upregulated in response to hypoxic stress in metastatic PCa cells.

To more closely replicate the conditions of the osteogenic bone niche, PC-3 cells were simultaneously exposed to ObCM and hypoxia. As shown in Figure 3A–B, this dual stimulation induced a synergistic increase in GJA1-20k expression levels after 48 h. Quantitative analysis revealed a 5-fold increase under hypoxia alone and a 16-fold increase with ObCM, whereas the combined treatment resulted in a 32-fold elevation in GJA1-20k expression. In contrast, full-length Cx43 levels remained unchanged across all conditions, indicating that the observed effect is specific to the GJA1-20k isoform. Thus, these data reveal that GJA1-20k becomes the predominant isoform (82%) in the endosteal niche conditions compared to perivascular niche conditions (26%) (Figure 3C).

GJA1-20k interacts with mitochondria and its overexpression leads to reorganization of the mitochondrial network

Metabolic adaptation is a critical determinant of cancer cells survival and metastatic progression. In cardiac and brain models, GJA1-20k has been shown to regulate mitochondrial

For Review Only

number and subcellular distribution through its interaction with the outer mitochondrial membrane. Given the upregulation of GJA1-20k under hypoxia and ObCM, we hypothesized that this isoform may contribute to mitochondrial remodeling in metastatic PCa cells.

To test this hypothesis, we first investigated the mitochondrial distribution in PC-3 cells exposed to hypoxia and/or ObCM conditions using TOM20 immunostaining (Figure 4). Under normoxic conditions and in control culture media, TOM20 signal was predominantly localized to the perinuclear region, consistent with baseline mitochondrial organization [20]. In contrast, stress conditions, hypoxia and ObCM treatment, induced a clear reduction in overall TOM20 fluorescence intensity (Figure 4A), accompanied by a pronounced redistribution of mitochondria toward the cell periphery (Figure 4B). Quantitative analysis confirmed a significant increase in peripheral mitochondrial localization relative to the perinuclear zone. Interestingly, co-immunoprecipitation assays revealed that GJA1-20k co-precipitated with TOM20 in PC-3 cells, confirming a physical interaction between the two proteins (Figure 4C). Notably, this interaction was markedly enhanced following exposure to hypoxia and ObCM, conditions that also induced GJA1-20k upregulation and peripheral mitochondrial redistribution.

To determine whether GJA1-20k overexpression is sufficient to drive the mitochondrial redistribution, PC-3 cells were stably transfected with a GJA1-20k expression construct inducing a 3.4-fold increase (Figure 5A). Similarly to hypoxic and ObCM conditions, a clear lowering in overall TOM20 fluorescence intensity was observed (Figure 5B). In control cells, TOM20 signal remained concentrated in the perinuclear region. In contrast, GJA1-20k-overexpressing cells exhibited a marked shift in mitochondrial localization toward the cell periphery, closely mimicking the pattern observed under hypoxic and ObCM conditions (Figure 5C). Quantitative analysis confirmed a significant increase in peripheral mitochondrial distribution in GJA1-20k-transfected cells compared to controls. These findings demonstrate that GJA1-20k alone is sufficient to induce mitochondrial repositioning in metastatic PCa cells, supporting its role as a mediator of stress-adaptive remodeling within the bone microenvironment.

For Review Only

DISCUSSION

Most patients with late-stage prostate cancer display metastasis at distant sites, predominantly in the bone, which are correlated with shorter survival. The bone microenvironment offers a uniquely supportive niche for prostate cancer cells, providing both

structural shelter and a rich supply of growth factors that promote survival, dormancy, and eventual reactivation [21]. However, to persist in this niche, PCa cells have to adapt microenvironmental stressors such as hypoxia and paracrine signaling from osteoblasts. Understanding the molecular mechanisms that govern this stress adaptation is critical to uncovering how PCa cells survive and re-emerge. In this context, GJA1-20k, a truncated isoform of connexin43, appears to be a promising candidate since GJA1-20k is known to be upregulated during ischemia/reperfusion in the heart and during brain injury, leading us to investigate its role in PCa cells exposed to bone metastatic niche conditions.

We therefore tested the effect of osteoblastic-conditioned media (ObCM) on PCa cells. We found that ObCM upregulates GJA1-20k expression in PC-3 cells, consistent with our previous findings in LNCaP cells [6], indicating that osteoblast-derived factors modulate the non-canonical translation in metastatic PCa cells. Osteoblasts are known to regulate gene expression and protein synthesis via paracrine signaling in PCa cells, promoting diverse phenotypes including proliferation, invasion or quiescence [22–24]. However, to our knowledge, there are currently no studies demonstrating that osteoblast-secreted factors or extracellular vesicles can directly induce IRES-mediated translation. Previous works have shown that inhibition of the PI3K/AKT/mTOR, Mnk1/2 or EGFR pathways increases endogenous GJA1-20k expression in both primary and cancer cells [9,25]. This raises the possibility that osteoblast-derived factors may suppress these signaling pathways in PCa cells, thereby promoting GJA1-20k expression. Notably, direct interaction between PCa cells and osteoblasts induces expression of TANK binding kinase 1 (TBK1), a non-canonical IκB kinase (IKK) family member, which inhibits mTOR signaling, contributing to cellular dormancy [26]. Elucidating the molecular basis of GJA1-20k regulation in this context may reveal how osteoblasts regulate non-canonical translation and drive metastatic adaptation within the osteogenic niche.

For Review Only

This regulation is likely not restricted to the interaction between bone cells and the metastatic PCa cells. The hypoxic conditions, a hallmark of the bone microenvironment represents an additional stress signal that may act in concert with secreted factors to activate cap-independent translation pathways. Consistent with this idea, we observed that GJA1-20k is transiently induced under hypoxic conditions in metastatic PCa cells, independently of GJA1 transcript levels.

This finding strongly suggests that hypoxia, like ObCM, activates IRES-mediated mechanism in these cells leading to GJA1-20k overexpression. This is consistent with previous reports describing GJA1-20k upregulation during ischemic or hypoxic stress in non-malignant

tissues [27] . Other studies have shown that hypoxia is a stress condition known to block cap-dependent translation through suppression of the eIF4F complex, while simultaneously promoting cap-independent initiation via IRES [28] in order to initiate the translation of specific mRNAs that encode proteins involved in angiogenesis (e.g. VEGF-A), metabolic adaptation (e.g. HIF-1 alpha) and survival (e.g. c-Myc) in order to protect the cells [28–31].

As a consequence of ObCM treatment, we observed a previously unreported redistribution of mitochondrial toward the cell periphery into the PCa cells. This remodeling may be driven by cytoskeletal reorganization, as osteoblast-secreted factors are known to activate Rho GTPases, as Rac1 [6], or actin dynamics in prostate cancer cells which are critical for metastasis [32,33].

In parallel, hypoxia is also known to trigger profound changes in mitochondrial dynamics in cancer cells, including fragmentation and redistribution, as part of a metabolic shift toward glycolysis and localized ATP supply [34,35]. Peripheral positioning of mitochondria has been linked to increased cell motility and invasion, as it supports focal adhesion turnover and actin remodeling at the leading edge [36,37]. Our observation that hypoxia induces peripheral mitochondrial redistribution in PC-3 cells aligns with these reports and suggests that this adaptation may facilitate migration within the bone microenvironment. One of the other outcomes of hypoxia is the generation of reactive oxygen species (ROS) and the GJA1-20k-dependent redistribution could then represent a mechanism providing protection as observed in the heart after ischemia-reperfusion injury [12]. The concomitant increase in GJA1-20k–TOM20 interaction under hypoxia combined with ObCM treatment raises the possibility that GJA1-20k acts as a structural or regulatory factor in this process, similar to its role in stress-induced mitochondrial fission in cardiomyocytes [38]. In prostate cancer, mitochondrial DRP1-mediated fission is necessary to maintain the plasticity and self-renewal of cancer stem cells (CSCs) since its inhibition led to the loss of their tumorigenic potential [39]. GJA1-20K could then participate in a compensatory mechanism that preserves asymmetric division and stemness of CSCs if this canonical DRP1-dependent pathway is impaired. Under bone stress conditions, it would also be interesting to evaluate in PCa cells the effect of GJA1-20k on mitochondrial metabolism as well as on the shape of mitochondria known to change in order to adapt to hypoxia-reoxygenation cycle [40] .

Beyond its effect on mitochondria, GJA1-20k also functions as a capping protein that promotes actin filament formation [11,38]. Stabilization of actin filaments by GJA1-20k contributes to microtubule orientation toward cellular junctions, a crucial step for proper Cx43 delivery to the plasma membrane as demonstrated *in vitro* and *in vivo* [9,10,41]. As previously

For Review Only

demonstrated [8,42], the adhesion capacity of PCa cells to osteoblasts increases in the presence of membranous Cx43, and this effect may be enhanced by GJA1-20k overexpression, particularly under stress conditions. Moreover, once full-length Cx43 is exported to the membrane, gap junction-mediated communication facilitates calcium transfer from osteogenic cells to cancer cells, enhancing metastatic potential [4]. Finally, GJA1-20k may drive intercellular mitochondrial transfer within the bone niche by regulating the extension of microtubules and actin into tunneling nanotubes (TNTs), binding mitochondria to microtubules, and facilitating Cx43 trafficking to the membrane which is known to TNTs formation [43].

CONCLUSION

Our study identifies GJA1-20k, a truncated isoform of Cx43 produced through IRES-mediated translation, as a novel regulator of mitochondrial distribution in metastatic PCa cells under bone stress conditions. This highlights the role of stress-responsive, non-canonical translation in helping cancer cells adapt to the bone metastatic microenvironment [44]. By demonstrating the involvement of GJA1-20k to mitochondrial remodeling, our work suggests that cap-independent translation supports the production of stress-responsive proteins and contributes to metabolic adaptation in prostate cancer cells exposed to bone-like conditions. These insights complement previous reports highlighting the importance of hypoxia-driven translational reprogramming in prostate cancer progression and therapy resistance [45], and point to GJA1-20k as a potential target for disrupting the adaptive strategies that enable metastatic persistence. Further research into how GJA1-20k is regulated and how it functions in this context could help clarify its role in cancer cell dormancy and reactivation, and may lead to new strategies to limit disease progression in patients with bone metastases.

For Review Only

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

The human prostate cancer PC-3 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC RRID:CVCL_0035) and authenticated by short tandem repeat profiling (Microsynth). Stable overexpression of GJA1-20k in PC-3 cells was achieved using a plasmid previously generated by Smyth and Shaw (2013), and obtained from Addgene. Briefly, PC-3 cells were transfected with pcDNA3.2-GJA1-20K-V5 plasmid (Plasmid #49859 - referred to as PC3-GJA1-20k) using FuGene HD transfection reagent following the manufacturer's

instructions (Promega). Corresponding control cell line was generated by transfecting PC-3 cells with the respective empty vector and will be referred to as PC3 mock. 48 h after transfection, cells were subjected to selection with 1 mg/mL G418 (Geneticin; Sigma-Aldrich) for two weeks. Stably transfected clones were maintained under continuous selection in medium with 1 mg/mL G418. All clones of PC-3 cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, ThermoFisher Scientific) supplemented with 200 mM GlutaMAX™, 0.1 g/L sodium pyruvate, 4.5 g/L D-glucose and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

Primary murine osteoblastic cells (OB) were isolated from calvaria of 3-5 days-old mice by sequential digestions with trypsin and collagenase, as described previously (Lamiche et al., 2012). OB cells were expanded to confluency at 37°C in phenol red-free DMEM supplemented with 20% FBS, and then seeded and maintained for 5 days in differentiating medium (phenol red-free DMEM, 10% FBS and 10 mM sodium β-glycerophosphate (Sigma)). After 5 days, the osteoblastic-conditioned medium (ObCM) was collected, centrifuged sequentially at 300 × g and then at 14,000 × g for 10 min and stored at -20°C until use.
When indicated, PC-3 cells were cultured in hypoxic condition (1% O_2) using a hypoxyLab chamber (Oxford Optronix) and/or in the presence of ObCM.

For Review Only

Western Blot Analysis

Western blotting was performed as previously described by Boucher et al. (2020). Briefly, total protein extracts were obtained by lysing cells in ice-cold RIPA buffer supplemented with proteases inhibitors. Cell lysates were centrifuged at 12,500 x g for 10 min at 4°C to remove debris and protein concentrations were determined using the DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). Equal amounts of proteins were mixed with 5X Laemmli sample buffer, resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore). Membranes were blocked for 1 h at room temperature (RT) in TBS-T (Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20) containing 5% (w/v) non-fat dry milk, and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (see table 1) diluted in blocking buffer. After washing with TBS-T, membranes were incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, 1:10,000). Immunodetection was performed using Luminata Forte chemiluminescent substrate (Merck) and signals were captured using the LAS-3000 imaging system (Fujifilm). Relative band intensities were quantified by densitometric analysis using ImageJ software (version 1.52).

Immunocytofluorescence

PC-3 cells were cultured at low density on sterile glass coverslips for different times and then fixed in ice-cold methanol/acetone (1:1) for 10 min. After blocking with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 1% Triton X-100 at RT for 1 h, PC-3 cells were incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (see table 1) diluted 1:250 in blocking buffer. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. After washing with PBS, PC-3 cells were incubated with Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibodies (1:1000 in blocking buffer) for 2 h at RT. Coverslips were mounted with vectashield-DAPI fluorescent mounting medium (Vector Laboratories) to counterstain nuclei. Fluorescence imaging was performed using an Olympus FV3000 confocal microscope. 1024x1024 pixels images were acquired with 1.5 NA:x100 objective lens. 3D optical sectioning of 0.3 µm were driven with step Z-axis motor.

Analyze of mitochondrial distribution

We developed a Fiji macro to analyze Z-stack projections of TOM20 immunostaining images. The macro performs maximum intensity projection, segments nuclei using automatic thresholding, and allows manual definition of line ROIs for intensity profile analysis. This streamlined workflow facilitates quantitative assessment of mitochondrial markers in Z stacks. The macro script is available in the supplementary Figure S2.

Co-immunoprecipitation (CoIP)

Co-immunoprecipitation (CoIP) experiments were performed using 1 mg of total protein extracted as described in section 3.2. Cell lysates were diluted in 500 µL of CoIP buffer (50 mM Tris HCl pH7.4, 5 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl and 0.05% (v/v) NP-40) and samples were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody and 50 µL of glycerol (10%). The following day, to precipitate the immunocomplexes, an incubation with 30 µL of protein A-Sepharose beads was conducted for 2 h at 4°C with gentle agitation. Immunocomplexes were collected by centrifugation and eluted by boiling in Laemmli buffer. The resulting samples were analyzed using Western blotting. Appropriate controls, including immunoprecipitation with isotype control antibodies or beads alone, were performed and have confirmed the specificity.

RT-qPCR

Total RNA extraction, reverse transcription and RT-qPCR were performed as previously detailed (Clarhaut et al., 2009). Gene expression was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a reference gene and relative expression levels were calculated using the comparative ΔΔCt method. Specific primers were synthesized by

For Review Only

Eurogentec: Cx43-forward, 5′-GCT-GGT-GGT-GTC-CTT-GGT-GTC-3′; Cx43-reverse, 5′-CAG-GAG-GAG-ACA-TAG-GCG-AGA-GG-3′; GAPDH-forward, 5'-TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA- GC-3'; GAPDH-reverse, 5′-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GAG-3′.

Statistical analyses

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism software (version 8.0, GraphPad Software, USA). Data are presented as mean ± the standard deviation (SD) from at least three independent experiments. Unpaired *t*-tests were used to compare two experimental groups. For comparisons involving three or more groups, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test was applied. Statistical significance was accepted at p-values < 0.05 (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

For Review Only

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (comités des Deux-Sèvres et de Charente) and from the University of Poitiers. S. Fournier is the recipient of a doctoral fellowship from the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche". This work benefited from the expertise and facilities of ImageUP, the microscopy platform of the University of Poitiers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, LC: conceptualization; SF, ND, IC, TH, JC, CV, AM, LC: investigation; ND, IC, JC, TH, AC, CV: methodology; SF, AM, LC: writing original draft; AM, LC: validation and supervision; SF, ND, IC, JC, CV, AM, LC : review & editing. All authors have read and approved the final version of the manuscript submitted for publication.

REFERENCES

1 Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I & Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **74**, 229–263.

2 Kurbegovic S, Berg KD, Thomsen FB, Gruschy L, Iversen P, Brasso K & Røder MA (2017) The risk of biochemical recurrence for intermediate-risk prostate cancer after radical prostatectomy. *Scand J Urol* **51**, 450–456.

3 Chen F, Han Y & Kang Y (2021) Bone marrow niches in the regulation of bone metastasis. *Br J Cancer* **124**, 1912–1920.

4 Wang H, Yu C, Gao X, Welte T, Muscarella AM, Tian L, Zhao H, Zhao Z, Du S, Tao J, Lee B, Westbrook TF, Wong STC, Jin X, Rosen JM, Osborne CK & Zhang XH-F (2015) The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells. *Cancer Cell* **27**, 193–210.

5 Thompson GB, Barnhouse VR, Bierman SK & Harley BAC (2025) Influence of Hypoxia on a Biomaterial Model of the Bone Marrow Perivascular Niche. *Adv Healthc Mater* **14**, e2500858.

6 Boucher J, Balandre A-C, Debant M, Vix J, Harnois T, Bourmeyster N, Péraudeau E, Chépied A, Clarhaut J, Debiais F, Monvoisin A & Cronier L (2020) Cx43 Present at the Leading Edge Membrane Governs Promigratory Effects of Osteoblast-Conditioned Medium on Human Prostate Cancer Cells in the Context of Bone Metastasis. *Cancers* **12**, 3013.

7 Govindarajan R, Zhao S, Song X-H, Guo R-J, Wheelock M, Johnson KR & Mehta PP (2002) Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cel lines and its mitigation by alpha-catenin. *J Biol Chem* **277**, 50087–50097.

8 Lamiche C, Clarhaut J, Strale P-O, Crespin S, Pedretti N, Bernard F-X, Naus CC, Chen VC, Foster LJ, Defamie N, Mesnil M, Debiais F & Cronier L (2012) The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **29**, 111–122.

9 Smyth JW & Shaw RM (2013) Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep* **5**, 611–618.

10 Basheer WA, Xiao S, Epifantseva I, Fu Y, Kleber AG, Hong T & Shaw RM (2017) GJA1-20k Arranges Actin to Guide Cx43 Delivery to Cardiac Intercalated Discs. *Circ Res* **121**, 1069–1080.

11 Baum R, Nguyen VD, Maalouf M, Shimura D, Waghalter M, Srapyan S, Jin Q, Kuzmanovich L, Gaffney AT, Bell BR, Xiao S, Palatinus JA, Kléber AG, Grintsevich EE, Hong T & Shaw RM (2024) A truncated isoform of Connexin43 caps actin to organize forward delivery of full-length Connexin43. *J Cell Biol* **224**, e202402112.

12 Basheer WA, Fu Y, Shimura D, Xiao S, Agvanian S, Hernandez DM, Hitzeman TC, Hong T & Shaw RM (2018) Stress response protein GJA1-20k promotes mitochondrial biogenesis, metabolic quiescence, and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *JCI Insight* **3**, e121900.

13 Baum R, Palatinus JA, Waghalter M, Shimura D, Jin Q, Kuzmanovich L, Xiao S, Kléber AG, Grintsevich EE, Hong T & Shaw RM (2022) *GJA1-20k, an internally translated isoform of Connexin 43, is an actin capping protein* Cell Biology.

For Peer Review Only

14 Fournier S, Clarhaut J, Cronier L & Monvoisin A (2025) GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression. *Cells* **14**, 180.

15 Fu Y, Tao L, Peng F, Zheng N, Lin Q, Cai S & Wang Q (2021) GJA1-20k attenuates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by regulating gap junction formation and mitochondrial function. *Acta Pharmacol Sin* **42**, 536–549.

16 Ren D, Zheng P, Feng J, Gong Y, Wang Y, Duan J, Zhao L, Deng J, Chen H, Zou S, Hong T & Chen W (2020) Overexpression of Astrocytes-Specific GJA1-20k Enhances the Viability and Recovery of the Neurons in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *ACS Chem Neurosci* **11**, 1643–1650.

17 Maalouf M, Gaffney AT, Bell BR & Shaw RM (2024) Exploring the Potent Roles of an Internally Translated Truncated Connexin-43 Isoform. *Biology* **13**, 1046.

18 James CC, Zeitz MJ, Calhoun PJ, Lamouille S & Smyth JW (2018) Altered translation initiation of Gja1 limits gap junction formation during epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **29**, 797–808.

19 Boucher J (2018) Involvement of connexin 43 in prostate cancer progression to bone. .

20 Tamarindo GH, Ribeiro CF, Silva ADT, Castro A, Caruso ÍP, Souza FP, Taboga SR, Loda M & Góes RM (2024) The polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic affects mitochondrial function in prostate cancer cells. *Cancer Metab* **12**, 24.

21 Chi-Cheng M, Ao-Rong O-Y, Zi-Xian C, Shan-Chao Z & Ming-Kun C (2025) Targeting the triad: phenotypic plasticity, tumor microenvironment and bone microenvironment in prostate cancer bone-metastatic events. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1880**, 189388.

22 Lu Y, Xiao G, Galson DL, Nishio Y, Mizokami A, Keller ET, Yao Z & Zhang J (2007) PTHrP-induced MCP-1 production by human bone marrow endothelial cells and osteoblasts promotes osteoclast differentiation and prostate cancer cell proliferation and invasion in vitro. *International Journal of Cancer* **121**, 724–733.

23 Li G, Fan M, Zheng Z, Zhang Y, Zhang Z, Huang Z, Luo W, Zhao W, Lai X, Chen H, Zeng F & Deng F (2022) Osteoblastic protein kinase D1 contributes to the prostate cancer cells dormancy via GAS6-circadian clock signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1869**, 119296.

24 Liu Y, Chen S, Guo K, Ma S, Wang X, Liu Q, Yan R, Huang Y, Li T, He S & Hui J (2024) Osteoblast-derived exosomal miR-140-3p targets ACER2 and increases the progression of prostate cancer via the AKT/mTOR pathway-mediated inhibition of autophagy. *The FASEB Journal* **38**, e70206.

25 Salat-Canela C, Sesé M, Peula C, Ramón y Cajal S & Aasen T (2014) Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell Commun Signal* **12**, 31.

26 Kim JK, Jung Y, Wang J, Joseph J, Mishra A, Hill EE, Krebsbach PH, Pienta KJ, Shiozawa Y & Taichman RS (2013) TBK1 Regulates Prostate Cancer Dormancy through mTOR Inhibition. *Neoplasia* **15**, 1064–1074.

27 Ul-Hussain M, Olk S, Schoenebeck B, Wasielewski B, Meier C, Prochnow N, May C, Galozzi S, Marcus K, Zoidl G & Dermietzel R (2014) Internal Ribosomal Entry Site (IRES)

For Review Only

Activity Generates Endogenous Carboxyl-terminal Domains of Cx43 and Is Responsive to Hypoxic Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 20979–20990.

28 Seton-Rogers S (2008) Switching to cap-independence. *Nat Rev Cancer* **8**, 6–7.

29 Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovoni JS, Lacazette E, Prats A-C, Touriol C & Prats H (2007) Translational Induction of VEGF Internal Ribosome Entry Site Elements During the Early Response to Ischemic Stress. *Circulation Research* **100**, 305–308.

30 Shi Y, Sun F, Cheng Y, Holmes B, Dhakal B, Gera JF, Janz S & Lichtenstein A (2022) Critical Role for Cap-Independent c-MYC Translation in Progression of Multiple Myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics* **21**, 502–510.

31 Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O & Levi BZ (1998) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* **17**, 227–236.

32 Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, Kim JK, Patel LR, Ying C, Ziegler AM, Pienta MJ, Song J, Wang J, Loberg RD, Krebsbach PH, Pienta KJ & Taichman RS (2011) Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* **121**, 1298–1312.

33 Karlsson T, Sundar R, Widmark A, Landström M & Persson E (2018) Osteoblast-derived factors promote metastatic potential in human prostate cancer cells, in part via non-canonical transforming growth factor β (TGFβ) signaling. *Prostate* **78**, 446–456.

34 Mohamed OAA, Tesen HS, Hany M, Sherif A, Abdelwahab MM & Elnaggar MH (2023) The role of hypoxia on prostate cancer progression and metastasis. *Mol Biol Rep* **50**, 3873–3884.

35 Bensaad K & Harris AL (2014) Hypoxia and metabolism in cancer. *Adv Exp Med Biol* **772**, 1–39.

36 Caino MC, Ghosh JC, Chae YC, Vaira V, Rivadeneira DB, Faversani A, Rampini P, Kossenkov AV, Aird KM, Zhang R, Webster MR, Weeraratna AT, Bosari S, Languino LR & Altieri DC (2015) PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 8638–8643.

37 Caino MC, Seo JH, Aguinaldo A, Wait E, Bryant KG, Kossenkov AV, Hayden JE, Vaira V, Morotti A, Ferrero S, Bosari S, Gabrilovich DI, Languino LR, Cohen AR & Altieri DC (2016) A neuronal network of mitochondrial dynamics regulates metastasis. *Nat Commun* **7**, 13730.

38 Shimura D, Nuebel E, Baum R, Valdez SE, Xiao S, Warren JS, Palatinus JA, Hong T, Rutter J & Shaw RM (2021) Protective mitochondrial fission induced by stress-responsive protein GJA1-20k. *eLife* **10**, e69207.

39 Civenni G, Bosotti R, Timpanaro A, Vàzquez R, Merulla J, Pandit S, Rossi S, Albino D, Allegrini S, Mitra A, Mapelli SN, Vierling L, Giurdanella M, Marchetti M, Paganoni A, Rinaldi A, Losa M, Mira-Catò E, D'Antuono R, Morone D, Rezai K, D'Ambrosio G, Ouafik L, Mackenzie S, Riveiro ME, Cvitkovic E, Carbone GM & Catapano CV (2019) Epigenetic Control of Mitochondrial Fission Enables Self-Renewal of Stem-like Tumor Cells in Human Prostate Cancer. *Cell Metabolism* **30**, 303-318.e6.

For Review Only

40 Liu X & Hajnóczky G (2011) Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia–reoxygenation stress. *Cell Death Differ* **18**, 1561–1572.

41 Palatinus JA, Valdez S, Taylor L, Whisenant C, Selzman CH, Drakos SG, Ranjan R, Hong T, Saffitz JE & Shaw RM (2023) GJA1-20k Rescues Cx43 Localization and Arrhythmias in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation Research* **132**, 744–746.

42 Li Z, Zhou Z & Donahue HJ (2008) Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* **25**, 265–272.

43 Ren D, Zheng P, Zou S, Gong Y, Wang Y, Duan J, Deng J, Chen H, Feng J, Zhong C & Chen W (2022) GJA1-20K Enhances Mitochondria Transfer from Astrocytes to Neurons via Cx43-TnTs After Traumatic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol* **42**, 1887–1895.

44 Mahé M, Rios-Fuller T, Katsara O & Schneider RJ (2024) Non-canonical mRNA translation initiation in cell stress and cancer. *NAR Cancer* **6**, zcae026.

45 Walters B & Thompson SR (2016) Cap-Independent Translational Control of Carcinogenesis. *Front Oncol* **6**.

For Review Only

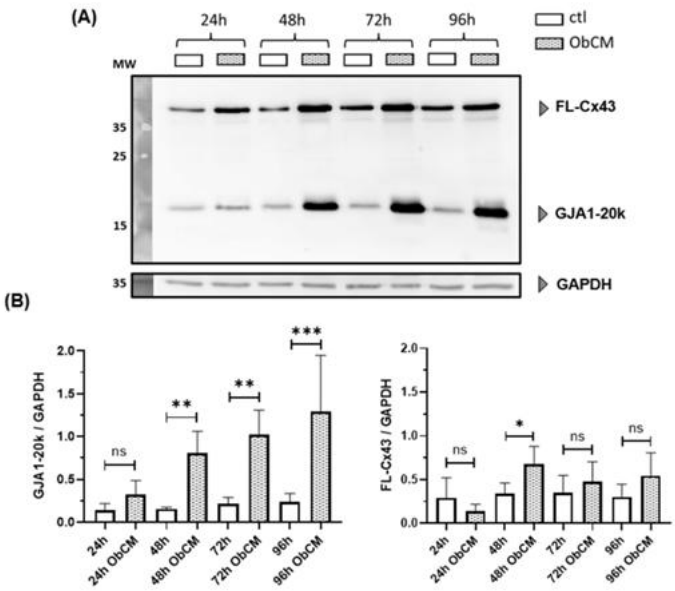


Figure 1. GJA1-20k is upregulated in response to osteoblastic-conditioned medium in metastatic prostate cancer cells.

(A) Representative immunoblot and (B) densitometric quantification of GJA1-20k and full-length Cx43 (FL-Cx43) expressions in PC-3 cells cultured for 1 to 4 days in control medium (ctl) or osteoblastic-conditioned medium (ObCM) (N = 3). GAPDH was used as loading control. * $p < 0.05$ to *** $p<0.001$.

Review only

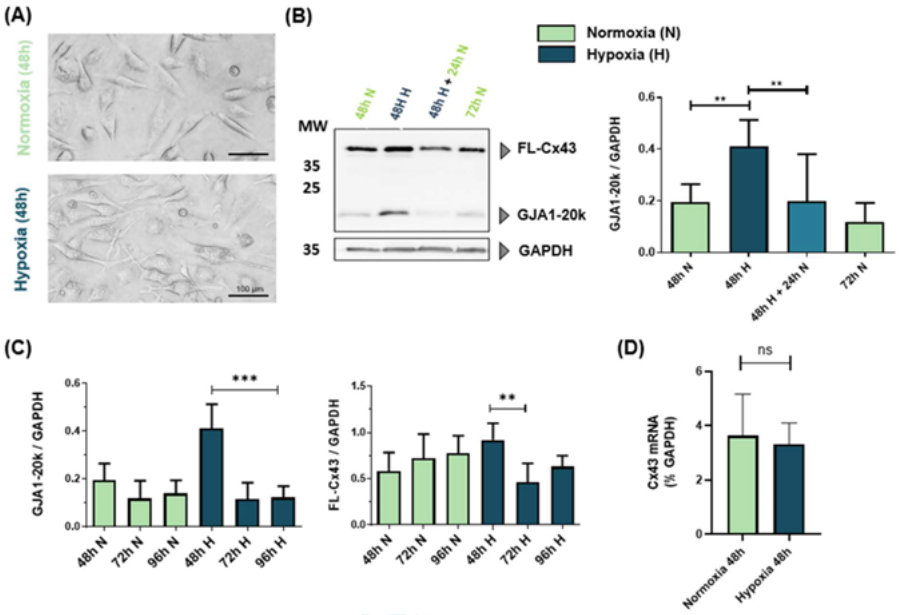


Figure 2. GJA1-20k is upregulated in response to hypoxia in metastatic prostate cancer cells.

(A) Phase-contrast micrographs of PC-3 cells cultured for 2 days under normoxic or hypoxic conditions (1% O_2). Scale bar: 100 µm. **(B)** Representative immunoblot and densitometric quantification of GJA1-20k expression in PC-3 cells after 2–3 days of culture under normoxia (N) or hypoxia (H) (N = 3). **(C)** Relative quantification of full-length Cx43 (FL-Cx43) and GJA1-20k protein levels in PC-3 cells (N = 3) over time under normoxic or hypoxic conditions. **(D)** GJA1 mRNA expression level quantified by RT-qPCR in PC-3 cells after 48 hours of culture under normoxia or hypoxia (N = 3). GAPDH was used as loading control or reference gene. ** $p < 0.01$ to *** $p<0.001$.

For review only

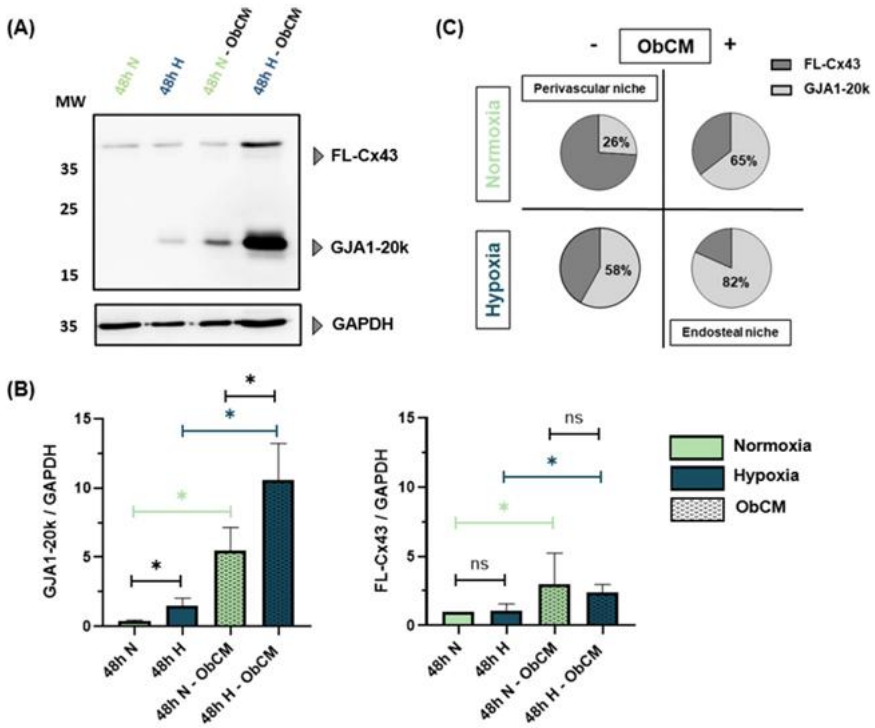


Figure 3. GJA1-20k is highly upregulated in response to bone microenvironment in metastatic prostate cancer cells.

(A) Representative immunoblot and **(B)** densitometric quantification of GJA1-20k and full-length Cx43 (FL-Cx43) in PC-3 cells cultured for 2 days under normoxic (N) or hypoxic (H; 1% O_2) conditions, with or without exposure to osteoblastic-conditioned medium (ObCM) (N = 3). GAPDH was used as loading control. **(C)** Relative distribution (%) of FL-Cx43 and GJA1-20k protein levels under Normoxia, Hypoxia with or without ObCM conditions (based on immunoblots). Percentages indicate the proportion of GJA1-20k.* $p < 0.05$.

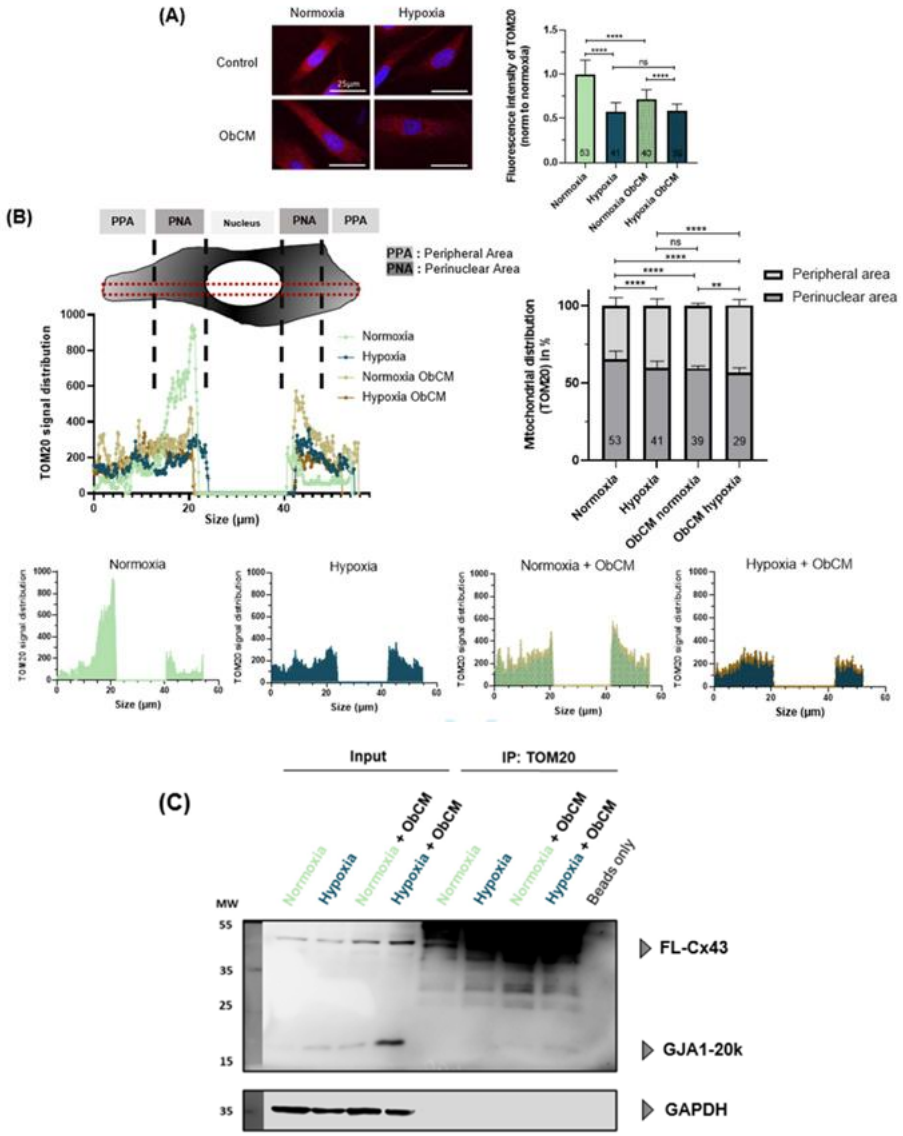


Figure 4. Mitochondrial network rearrangement in metastatic prostate cancer cells cultured in bone stress conditions.

(A) Representative images of mitochondrial network and quantification of mitochondria in PC-3 cells (TOM20 immunostaining) cultured for 2 days under hypoxia and/or ObCM conditions (blue = nucleus, red = TOM20), Scale bar = 25 µm. ***(B)*** Quantification of mitochondrial distribution in peripheral versus perinuclear regions under normoxia or hypoxia with or without ObCM, based on TOM20 immunostaining. ***(C)*** Coimmunoprecipitation (Co-IP) assays showing

interactions between TOM20 and GJA1-20k or FL-Cx43 in PC-3 cells exposed to normoxia or hypoxia with or without ObCM (N=5). GAPDH was used for input control. Numbers inside the bars indicate the total number of analyzed cells. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

For Review Only

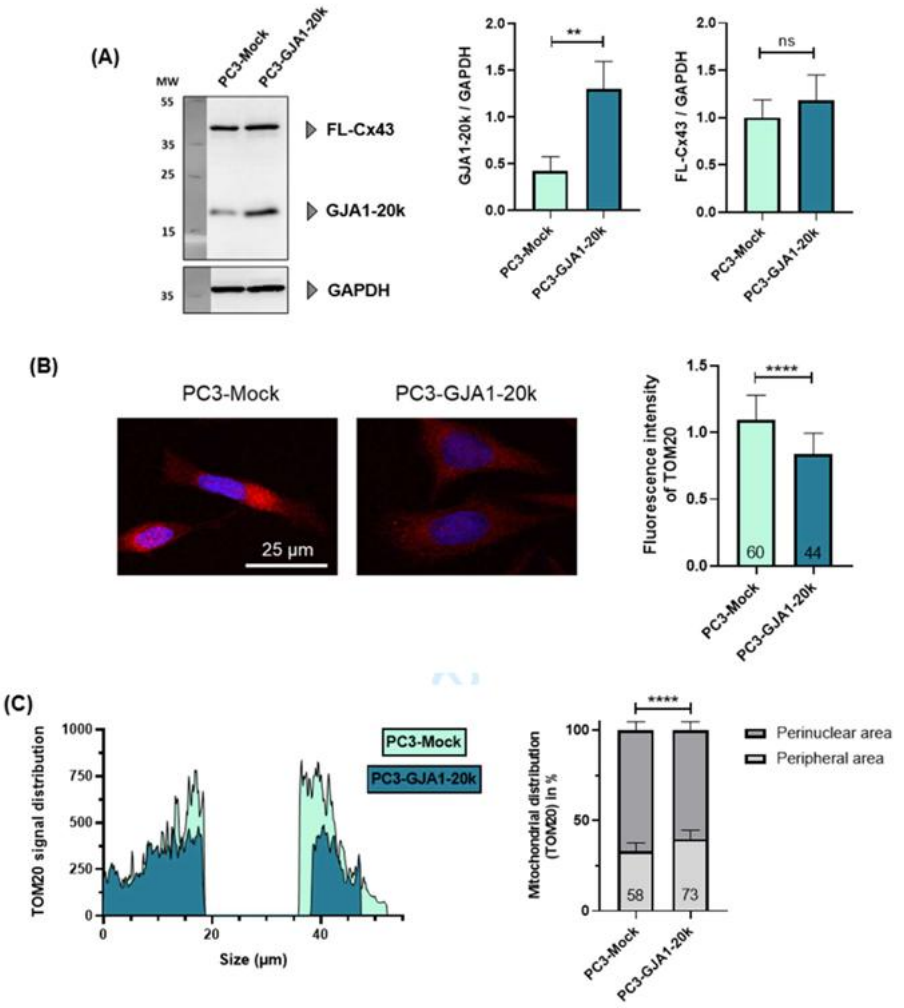


Figure 5. GJA1-20k Overexpression Drives Mitochondrial Network Remodeling in Metastatic Prostate Cancer Cells.

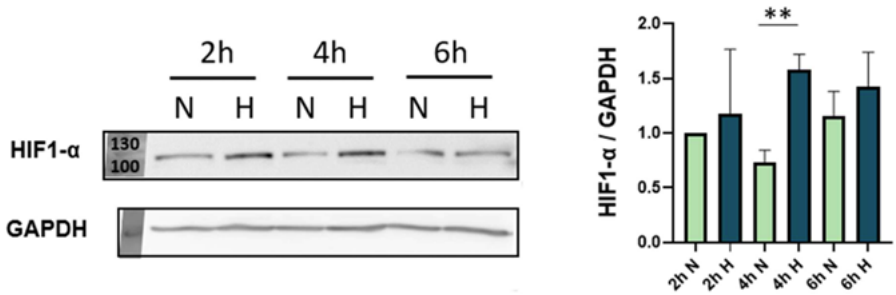
(A) Representative immunoblot and densitometric quantification of GJA1-20k and FL-Cx43 expressions in GJA1-20k-overexpressing PC-3 cells (PC3-GJA1-20k) compared to control cells (PC-3-mock). GAPDH was used as loading control (N=3). **(B)** Representative images of mitochondrial network and quantification of mitochondria using TOM20 immunostaining in PC3-GJA1-20k and PC3-mock cells. **(C)** Analysis of mitochondrial distribution in peripheral and perinuclear regions in PC3-GJA1-20k and PC3-mock cells using TOM20 immunostaining. Scale bar = 25 µm (N=3). Numbers inside the bars indicate the total number of analyzed cells. * $p < 0.05$ to **** $p < 0.0001$..

Target	Source	Dilution	Application	Reference	Supplier
Connexin43 C-terminal	Mouse	1/1000, 5% BSA	Western blotting	#610062	BD Transduction Laboratories
GAPDH	Mouse	1/10 000, 5% milk	Western blotting	#5G4	Hytest
TOM20	Mouse Ig2a	1/250 1 µg/500 µL cell lysate	Immunostaining Co-IP	sc-17764	Santa cruz
DAPI	---	1/1000	Nuclear staining	32670	Sigma
HIF1-alpha	Mouse	1/1000	Western blotting	ab2185	Abcam
GAM-HRP	Goat	1/5000, 5% milk	Western blotting	A0168	Sigma
GAM-488, Alexa Fluor	Goat	1/250	Immunostaining	A11029	Invitrogen

Table 1. List of antibodies used in the study

iew Only

Supplementary Figures



S1. Hypoxia-mediated upregulation of HIF1-alpha expression in metastatic PCa cells.

Representative immunoblot and densitometric quantification of HIF1-alpha expression in PC-3 cells exposed, for 2 to 6h, to hypoxic condition (H) compared to normoxia (N). GAPDH was used as loading control (N=2). ** $p < 0.01$.

For Review Only

```
//Work on Z stack with .oir file and select composite
//Double-click on Line and choose thickness

roiManager("reset");
run("Clear Results");
close("\\Others");

run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
imgtitle=getTitle();
run("Split Channels");

//Nuclei image selection
selectWindow("C1-"+imgtitle);
setAutoThreshold("Li dark");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity show=Masks exclude include add");

selectWindow("C2-"+imgtitle);
setBackgroundColor(0, 0, 0);

for (i = 0; i < roiManager("count"); i++) {
roiManager("select", i);
run("Clear", "slice");
}

// Line definition
roiManager("reset");
selectWindow("C2-"+imgtitle);
setTool("line");

waitForUser("1-Draw a line\n2-Press 'T' to add\n3-Press 'Ok' to finalize");

for (i = 0; i < roiManager("count"); i++) {
selectWindow("C2-"+imgtitle);
roiManager("select", i);
run("Plot Profile");
}
```

Only

***S2.* Fiji macro for quantitative analysis of immunostaining Z-Stack images**

Macro script developed in collaboration with Dr. Anne Cantereau, to analyze Z-Stack immunostaining

BIBLIOGRAPHIE

Aasen, T. (2015) 'Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation', *Cell and Tissue Research*, 360(3), pp. 685–699. Available at: https://doi.org/10.1007/s00441-014-2078-3.

Ableser, M.J. *et al.* (2014) 'Connexin43 Reduces Melanoma Growth within a Keratinocyte Microenvironment and during Tumorigenesis in Vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), pp. 1592–1603. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507228.

Agarwal, S. and Ganesh, S. (2020) 'Perinuclear mitochondrial clustering, increased ROS levels, and HIF1 are required for the activation of HSF1 by heat stress', *Journal of Cell Science*, 133(13), p. jcs245589. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.245589.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007) 'Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy', *Nature Reviews. Cancer*, 7(11), pp. 834–846. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc2256.

Akiri, G. *et al.* (1998) 'Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription', *Oncogene*, 17(2), pp. 227–236. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202019.

Ale-Agha, N. *et al.* (2009) 'HuR regulates gap junctional intercellular communication by controlling beta-catenin levels and adherens junction integrity', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(5), pp. 1567–1576. Available at: https://doi.org/10.1002/hep.23146.

Alexander, D.B. and Goldberg, G.S. (2003) 'Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels', *Current Medicinal Chemistry*, 10(19), pp. 2045–2058. Available at: https://doi.org/10.2174/0929867033456927.

Al-Mehdi, A.-B. *et al.* (2012) 'Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription', *Science Signaling*, 5(231), p. ra47. Available at: https://doi.org/10.1126/scisignal.2002712.

Altieri, D.C. (2017) 'Mitochondria on the move: emerging paradigms of organelle trafficking in tumour plasticity and metastasis', *British Journal of Cancer*, 117(3), pp. 301–305. Available at: https://doi.org/10.1038/bjc.2017.201.

Ambrosi, C. *et al.* (2016) 'Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1', *PloS One*, 11(6), p. e0157073. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157073.

Antigny, F. *et al.* (2009) 'Dysfunction of mitochondria Ca2+ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells', *Mitochondrion*, 9(4), pp. 232–241. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.02.003.

Archer, M., Dogra, N. and Kyprianou, N. (2020) 'Inflammation as a Driver of Prostate Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance', *Cancers*, 12(10), p. 2984. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers12102984.

Avanzo, J.L. (2004) 'Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43', *Carcinogenesis*, 25(10), pp. 1973–1982. Available at: https://doi.org/10.1093/carcin/bgh193.

Axelsen, L.N. *et al.* (2013) 'Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification', *Frontiers in Pharmacology*, 4, p. 130. Available at: https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00130.

Ayad, W.A. *et al.* (2006) 'Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(24), pp. 16727–16739. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M600136200.

Baker, K.D., Edwards, T.M. and Rickard, N.S. (2013) 'The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(7), pp. 1211–1239. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.011.

Bao, B. *et al.* (2011) 'Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly', *The FASEB Journal*, 25(1), pp. 255–264. Available at: https://doi.org/10.1096/fj.10-155291.

Bargiello, T.A. *et al.* (2018) 'Gating of Connexin Channels by transjunctional-voltage: Conformations and models of open and closed states', *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(1), pp. 22–39. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.028.

Barron, D.A. and Rowley, D.R. (2012) 'The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression', *Endocrine-related cancer*, 19(6), pp. R187–R204. Available at: https://doi.org/10.1530/ERC-12-0085.

Basheer, W. and Shaw, R. (2016) 'The "tail" of Connexin43: An unexpected journey from alternative translation to trafficking', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(7), pp. 1848–1856. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.015.

Basheer, W.A. *et al.* (2017) 'GJA1-20k Arranges Actin to Guide Cx43 Delivery to Cardiac Intercalated Discs', *Circulation Research*, 121(9), pp. 1069–1080. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311955.

Basheer, W.A. *et al.* (2018) 'Stress response protein GJA1-20k promotes mitochondrial biogenesis, metabolic quiescence, and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury', *JCI insight*, 3(20), pp. e121900, 121900. Available at: https://doi.org/10.1172/jci.insight.121900.

Bates, D.C. *et al.* (2007) 'Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus', *Glia*, 55(15), pp. 1554–1564. Available at: https://doi.org/10.1002/glia.20569.

Batra, N., Kar, R. and Jiang, J.X. (2012) 'Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818(8), pp. 1909–1918. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.018.

Baum, R. *et al.* (2022) *GJA1-20k, an internally translated isoform of Connexin 43, is an actin capping protein*. preprint. Cell Biology. Available at: https://doi.org/10.1101/2022.01.05.475034.

Baum, R. *et al.* (2025) 'A truncated isoform of Connexin43 caps actin to organize forward delivery of full-length Connexin43', *The Journal of Cell Biology*, 224(3), p. e202402112. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.202402112.

Bayraktar, E., Lopez-Pigozzi, D. and Bortolozzi, M. (2024) 'Calcium Regulation of Connexin Hemichannels', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), p. 6594. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms25126594.

Bedeschi, M. *et al.* (2023) 'Cancer-Associated Fibroblast: Role in Prostate Cancer Progression to Metastatic Disease and Therapeutic Resistance', *Cells*, 12(5), p. 802. Available at: https://doi.org/10.3390/cells12050802.

Behrens, J. *et al.* (2010) 'The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner', *European Journal of Cell Biology*, 89(11), pp. 828–838. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.003.

Benko, G. *et al.* (2011) 'Prognostic value of connexin43 expression in patients with clinically localized prostate cancer', *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 14(1), pp. 90–95. Available at: https://doi.org/10.1038/pcan.2010.51.

Bergoffen, J. *et al.* (1993) 'Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease', *Science (New York, N.Y.)*, 262(5142), pp. 2039–2042.

Beyer, E.C. and Berthoud, V.M. (2018) 'Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins', *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(1), pp. 5–8. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.016.

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', *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 1), pp. 2621–2629. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2621.

Bhattacharjee, S. *et al.* (2019) 'Multi-Features Classification of Prostate Carcinoma Observed in Histological Sections: Analysis of Wavelet-Based Texture and Colour Features', *Cancers*, 11(12), p. 1937. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers11121937.

Boengler, K. *et al.* (2022) 'Connexin 43 in Mitochondria: What Do We Really Know About Its Function?', *Frontiers in Physiology*, 13, p. 928934. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2022.928934.

Bong, A.H.L. and Monteith, G.R. (2018) 'Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(11 Pt B), pp. 1786–1794. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.015.

Bordone, R. *et al.* (2024) 'MYC upstream region orchestrates resistance to PI3K inhibitors in cancer cells through FOXO3a-mediated autophagic adaptation', *Oncogene*, 43(46), pp. 3349–3365. Available at: https://doi.org/10.1038/s41388-024-03170-6.

Bostwick, D.G. and Brawer, M.K. (1987) 'Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer', *Cancer*, 59(4), pp. 788–794. Available at: https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870215)59:4%253C788::aid-cncr2820590421%253E3.0.co;2-i.

Boucher, J. *et al.* (2018) 'Connexins, important players in the dissemination of prostate cancer cells', *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(1), pp. 202–215. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.020.

Boucher, J. (2018) 'Involvement of connexin 43 in prostate cancer progression to bone'.

Boucher, J. *et al.* (2020) 'Cx43 Present at the Leading Edge Membrane Governs Promigratory Effects of Osteoblast-Conditioned Medium on Human Prostate Cancer Cells in the Context of Bone Metastasis', *Cancers*, 12(10), p. E3013. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers12103013.

Boulton, D.P. and Caino, M.C. (2022) 'Mitochondrial Fission and Fusion in Tumor Progression to Metastasis', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, p. 849962. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2022.849962.

Braunstein, S. *et al.* (2007) 'A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer', *Molecular Cell*, 28(3), pp. 501–512. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.019.

Bray, F. *et al.* (2024) 'Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), pp. 229–263. Available at: https://doi.org/10.3322/caac.21834.

Busby, M., Hallett, M. and Plante, I. (2018) 'The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), p. 693. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms19030693.

Butkevich, E. *et al.* (2004) 'Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton', *Current biology: CB*, 14(8), pp. 650–658. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.063.

Cackowski, F.C. and Heath, E.I. (2022) 'Prostate cancer dormancy and recurrence', *Cancer Letters*, 524, pp. 103–108. Available at: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.09.037.

Caino, M.C. *et al.* (2016) 'A neuronal network of mitochondrial dynamics regulates metastasis', *Nature Communications*, 7, p. 13730. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms13730.

Caino, M.C. and Altieri, D.C. (2015) 'Cancer cells exploit adaptive mitochondrial dynamics to increase tumor cell invasion', *Cell Cycle*, 14(20), pp. 3242–3247. Available at: https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1084448.

Carbonnelle, D. *et al.* (2013) 'The Melanoma Antigens MELOE-1 and MELOE-2 Are Translated from a Bona Fide Polycistronic mRNA Containing Functional IRES Sequences', *PLoS ONE*. Edited by A.T. Slominski, 8(9), p. e75233. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075233.

Chakraborty, S. *et al.* (2010) 'E-cadherin Differentially Regulates the Assembly of Connexin43 and Connexin32 into Gap Junctions in Human Squamous Carcinoma Cells*', *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), pp. 10761–10776. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053348.

Chatterjee, B. *et al.* (2005) 'Developmental regulation and expression of the zebrafish connexin43 gene', *Developmental Dynamics*, 233(3), pp. 890–906. Available at: https://doi.org/10.1002/dvdy.20426.

Chen, F., Han, Y. and Kang, Y. (2021) 'Bone marrow niches in the regulation of bone metastasis', *British Journal of Cancer*, 124(12), pp. 1912–1920. Available at: https://doi.org/10.1038/s41416-021-01329-6.

Chen, Saisai *et al.* (2023) 'YY1 complex in M2 macrophage promotes prostate cancer progression by upregulating IL-6', *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 11(4), p. e006020. Available at: https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006020.

Chen, W. *et al.* (2020) 'Astrocytes-derived exosomes induce neuronal recovery after traumatic brain injury via delivering gap junction alpha 1-20 k', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(3), pp. 412–423. Available at: https://doi.org/10.1002/term.3002.

Chepied, A. *et al.* (2020) 'Involvement of the Gap Junction Protein, Connexin43, in the Formation and Function of Invadopodia in the Human U251 Glioblastoma Cell Line', *Cells*, 9(1). Available at: https://doi.org/10.3390/cells9010117.

Chu, K. *et al.* (2008) 'Cadherin-11 Promotes the Metastasis of Prostate Cancer Cells to Bone', *Molecular cancer research : MCR*, 6(8), pp. 1259–1267. Available at: https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0077.

Cina, C. *et al.* (2009) 'Involvement of the Cytoplasmic C-Terminal Domain of Connexin43 in Neuronal Migration', *The Journal of Neuroscience*, 29(7), pp. 2009–2021. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5025-08.2009.

Clarhaut, J. *et al.* (2009) 'ZEB-1, a Repressor of the Semaphorin 3F Tumor Suppressor Gene in Lung Cancer Cells', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(2), pp. 157–166. Available at: https://doi.org/10.1593/neo.81074.

Connolly, E. *et al.* (2006) 'Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells', *Molecular and Cellular Biology*, 26(10), pp. 3955–3965. Available at: https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3955-3965.2006.

Cooper, J.A. and Sept, D. (2008) 'New Insights into Mechanism and Regulation of Actin Capping Protein', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 183–206. Available at: https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00604-7.

Cotrina, M.L. *et al.* (1998) 'Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp. 15735–15740. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15735.

Créancier, L. *et al.* (2000) 'Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation', *The Journal of Cell Biology*, 150(1), pp. 275–281. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.150.1.275.

Crespin, S. *et al.* (2010) 'The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(3), pp. 589–597. Available at: https://doi.org/10.1002/jcb.22554.

Cronier, L. *et al.* (2009) 'Gap junctions and cancer: new functions for an old story', *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2), pp. 323–338. Available at: https://doi.org/10.1089/ars.2008.2153.

Cussenot, O. and Cancel-Tassin, G. (2004) '[Genetic susceptibility to prostate cancer]', *Medecine Sciences: M/S*, 20(5), pp. 562–568. Available at: https://doi.org/10.1051/medsci/2004205562.

Cutruzzolà, F. *et al.* (2017) 'Glucose Metabolism in the Progression of Prostate Cancer', *Frontiers in Physiology*, 8. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00097.

Czyż, J., Szpak, K. and Madeja, Z. (2012) 'The role of connexins in prostate cancer promotion and progression', *Nature Reviews. Urology*, 9(5), pp. 274–282. Available at: https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.14.

Dai, R. *et al.* (2022) 'Osteoblasts and osteoclasts: an important switch of tumour cell dormancy during bone metastasis', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 41, p. 316. Available at: https://doi.org/10.1186/s13046-022-02520-0.

D'Amico, A.V. *et al.* (1998) 'Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer', *JAMA*, 280(11), pp. 969–974. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.280.11.969.

Dang, X., Doble, B.W. and Kardami, E. (2003) 'The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 242(1–2), pp. 35–38.

D'Angelo, D. and Rizzuto, R. (2023) 'The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases', *Biomolecules*, 13(9), p. 1304. Available at: https://doi.org/10.3390/biom13091304.

David Roodman, G. and Silbermann, R. (2015) 'Mechanisms of osteolytic and osteoblastic skeletal lesions', *BoneKEy Reports*, 4, p. 753. Available at: https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.122.

De Palma, M., Biziato, D. and Petrova, T.V. (2017) 'Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis', *Nature Reviews. Cancer*, 17(8), pp. 457–474. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51.

Debes, J.D. and Tindall, D.J. (2002) 'The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer', *Cancer Letters*, 187(1–2), pp. 1–7. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00413-5.

Deep, G. *et al.* (2020) 'Exosomes secreted by prostate cancer cells under hypoxia promote matrix metalloproteinases activity at pre-metastatic niches', *Molecular Carcinogenesis*, 59(3), pp. 323–332. Available at: https://doi.org/10.1002/mc.23157.

Desai, S.P. *et al.* (2013) 'Mitochondrial Localization and the Persistent Migration of Epithelial Cancer cells', *Biophysical Journal*, 104(9), pp. 2077–2088. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.03.025.

Desquiret-Dumas, V. *et al.* (2017) 'The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 32(3), pp. 607–614. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/dew341.

DeVries, S.H. and Schwartz, E.A. (1992) 'Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina', *The Journal of Physiology*, 445, pp. 201–230. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp018920.

Diao, X.-W. *et al.* (no date) 'SDF-1/CXCR4 axis promotes prostate cancer cell invasion and bone metastasis through p38',.

Dirat, B. *et al.* (2015) 'Inhibition of the GTPase Rac1 mediates the antimigratory effects of metformin in prostate cancer cells', *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(2), pp. 586–596. Available at: https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0102.

Dong, S. *et al.* (2022) 'ROS/PI3K/Akt and Wnt/β-catenin signalings activate HIF-1α-induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer', *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 41(1), p. 15. Available at: https://doi.org/10.1186/s13046-021-02229-6.

Eastman, S.D. *et al.* (2006) 'Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes', *Genomics*, 87(2), pp. 265–274. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.10.005.

Elzarrad, M. Khair *et al.* (2008) 'Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium', *BMC Medicine*, 6(1), p. 20. Available at: https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-20.

Elzarrad, M Khair *et al.* (2008) 'Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium', *BMC Medicine*, 6, p. 20. Available at: https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-20.

Epifantseva, I. *et al.* (2020) 'An Alternatively Translated Connexin 43 Isoform, GJA1-11k, Localizes to the Nucleus and Can Inhibit Cell Cycle Progression', *Biomolecules*, 10(3), p. 473. Available at: https://doi.org/10.3390/biom10030473.

Ersahin, T., Tuncbag, N. and Cetin-Atalay, R. (2015) 'The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway', *Molecular bioSystems*, 11(7), pp. 1946–1954. Available at: https://doi.org/10.1039/c5mb00101c.

Evans, W.H. and Martin, P.E.M. (2002) 'Gap junctions: structure and function (Review)', *Molecular Membrane Biology*, 19(2), pp. 121–136. Available at: https://doi.org/10.1080/09687680210139839.

Fanning, A.S. and Anderson, J.M. (2009) 'Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, pp. 113–120. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.

Farina, A.K. *et al.* (2009) 'Post-transcriptional regulation of cadherin-11 expression by GSK-3 and beta-catenin in prostate and breast cancer cells', *PloS One*, 4(3), p. e4797. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004797.

Feltes, C.M. *et al.* (2002) 'An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion', *Cancer Research*, 62(22), pp. 6688–6697.

Feng, J. *et al.* (2023) 'Astrocyte-derived exosome-transported GJA1-20k attenuates traumatic brain injury in rats', *Chinese Medical Journal*, 136(7), pp. 880–882. Available at: https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002320.

Fishman, G.I. *et al.* (1991) 'The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures', *Genomics*, 10(1), pp. 250–256. Available at: https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90507-b.

da Fonseca, I.I.M. *et al.* (2024) 'Inhibitory Effects of Alpha-Connexin Carboxyl-Terminal Peptide on Canine Mammary Epithelial Cells: A Study on Benign and Malignant Phenotypes', *Cancers*, 16(4), p. 820. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers16040820.

Fontana, F., Anselmi, M. and Limonta, P. (2023) 'Unraveling the Peculiar Features of Mitochondrial Metabolism and Dynamics in Prostate Cancer', *Cancers*, 15(4), p. 1192. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers15041192.

Fournier, S. *et al.* (2025) 'GJA1-20k, a Short Isoform of Connexin43, from Its Discovery to Its Potential Implication in Cancer Progression', *Cells*, 14(3), p. 180. Available at: https://doi.org/10.3390/cells14030180.

Francis, R. *et al.* (2011) 'Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics', *PloS One*, 6(10), p. e26379. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026379.

Frisch, S.M., Schaller, M. and Cieply, B. (2013) 'Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis', *Journal of Cell Science*, 126(1), pp. 21–29. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.120907.

Fu, Y. *et al.* (2017) 'Cx43 Isoform GJA1-20k Promotes Microtubule Dependent Mitochondrial Transport', *Frontiers in Physiology*, 8, p. 905. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00905.

Fu, Y. *et al.* (2021) 'GJA1-20k attenuates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by regulating gap junction formation and mitochondrial function', *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(4), pp. 536–549. Available at: https://doi.org/10.1038/s41401-020-0459-6.

Furshpan, E.J. and Potter, D.D. (1959) 'Transmission at the giant motor synapses of the crayfish', *The Journal of Physiology*, 145(2), pp. 289–325. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006143.

Gandaglia, G. *et al.* (2014) 'Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis', *The Prostate*, 74(2), pp. 210–216. Available at: https://doi.org/10.1002/pros.22742.

Gangoso, E. *et al.* (2014) 'A cell-penetrating peptide based on the interaction between c-Src and connexin43 reverses glioma stem cell phenotype', *Cell Death & Disease*, 5(1), p. e1023. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2013.560.

Giaume, C. *et al.* (2013) 'Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles', *Frontiers in Pharmacology*, 4, p. 88. Available at: https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088.

Gielen, P.R. *et al.* (2013) 'Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway', *Neuropharmacology*, 75, pp. 539–548. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.002.

Giepmans, B.N. and Moolenaar, W.H. (1998) 'The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein', *Current biology: CB*, 8(16), pp. 931–934. Available at: https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00375-2.

Giepmans, Ben N. G. *et al.* (2001) 'Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules', *Current Biology*, 11(17), pp. 1364–1368. Available at: https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00424-9.

Giepmans, Ben N.G. *et al.* (2001) 'Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules', *Current Biology*, 11(17), pp. 1364–1368. Available at: https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00424-9.

Giepmans, B.N.G., Verlaan, I. and Moolenaar, W.H. (2001) 'Connexin-43 Interactions with ZO-1 and α- and β-tubulin', *Cell Communication & Adhesion*, 8(4–6), pp. 219–223. Available at: https://doi.org/10.3109/15419060109080727.

Gill, M.K. *et al.* (2018) 'A feed forward loop enforces YAP/TAZ signaling during tumorigenesis', *Nature Communications*, 9, p. 3510. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-018-05939-2.

Gleason, D.F. (1966) 'Classification of prostatic carcinomas', *Cancer Chemotherapy Reports*, 50(3), pp. 125–128.

Golan, K. *et al.* (2020) 'Bone marrow regeneration requires mitochondrial transfer from donor Cx43-expressing hematopoietic progenitors to stroma', *Blood*, 136(23), pp. 2607–2619. Available at: https://doi.org/10.1182/blood.2020005399.

Goldberg, G.S., Moreno, A.P. and Lampe, P.D. (2002) 'Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), pp. 36725–36730. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M109797200.

Goldberg, G.S., Valiunas, V. and Brink, P.R. (2004) 'Selective permeability of gap junction channels', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1662(1–2), pp. 96–101. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.022.

Gonzalez-Menendez, P. *et al.* (2018) 'GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress', *Redox Biology*, 17, pp. 112–127. Available at: https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.017.

Goodenough, D.A. (1974) 'Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin', *The Journal of Cell Biology*, 61(2), pp. 557–563. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.61.2.557.

Gottardi, C.J., Wong, E. and Gumbiner, B.M. (2001) 'E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner', *The Journal of Cell Biology*, 153(5), pp. 1049–1060. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1049.

Govindarajan, R. *et al.* (2002) 'Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha-catenin', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), pp. 50087–50097. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M202652200.

Grasset, E.M., Barillé-Nion, S. and Juin, P.P. (2024) 'Stress in the metastatic journey - the role of cell communication and clustering in breast cancer progression and treatment resistance', *Disease Models & Mechanisms*, 17(3), p. dmm050542. Available at: https://doi.org/10.1242/dmm.050542.

Grek, C.L. *et al.* (2015) 'Targeting connexin 43 with α–connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast

cancer: clinical implication for ACT1', *BMC Cancer*, 15(1), p. 296. Available at: https://doi.org/10.1186/s12885-015-1229-6.

Grek, C.L. *et al.* (2018) 'Novel approach to temozolomide resistance in malignant glioma: connexin43-directed therapeutics', *Current Opinion in Pharmacology*, 41, pp. 79–88. Available at: https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.002.

Guan, G. *et al.* (2015) 'The HIF-1α/CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells', *Cancer Letters*, 357(1), pp. 254–264. Available at: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.034.

Guise, T.A. (2002) 'The vicious cycle of bone metastases', *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2(6), pp. 570–572.

Gulappa, T. *et al.* (2013) 'Molecular interplay between cdk4 and p21 dictates G0/G1 cell cycle arrest in prostate cancer cells', *Cancer Letters*, 337(2), pp. 177–183. Available at: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.014.

Guo, C.C. and Czerniak, B. (2023) 'Updates of Prostate Cancer from the 2022 World Health Organization Classification of the Urinary and Male Genital Tumors', *Journal of clinical and translational pathology*, 3(1), pp. 26–34. Available at: https://doi.org/10.14218/jctp.2022.00029.

Guo, Y. *et al.* (1999) 'Inhibition of gap junction communication in alveolar epithelial cells by 18alpha-glycyrrhetinic acid', *The American Journal of Physiology*, 276(6), pp. L1018-1026. Available at: https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.6.L1018.

Hamid G., M. (2025) 'Connexin43 and Cadherin in Cancer'. Available at: https://doi.org/10.5281/zenodo.15667816.

Han, X.-J. *et al.* (2015) 'Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells', *International Journal of Oncology*, 46(2), pp. 691–700. Available at: https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2781.

Hansen, M. *et al.* (2022) 'Racial Disparities in Prostate Cancer: Evaluation of Diet, Lifestyle, Family History, and Screening Patterns', *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 31(5), pp. 982–990. Available at: https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1064.

Hatakeyama, T. *et al.* (2013) 'Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70', *Scientific Reports*, 3, p. 2719. Available at: https://doi.org/10.1038/srep02719.

He, D. and Li, H. (2020) 'Bifunctional Cx43 Mimic Peptide Grafted Hyaluronic Acid Hydrogels Inhibited Tumor Recurrence and Stimulated Wound Healing for Postsurgical Tumor Treatment', *Advanced Functional Materials*, 30(51), p. 2004709. Available at: https://doi.org/10.1002/adfm.202004709.

Hervé, J.-C. *et al.* (2012) 'Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(8), pp. 1844–1865. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.009.

Herzig, S. and Shaw, R.J. (2018) 'AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2), pp. 121–135. Available at: https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95.

Hino, H. *et al.* (2015) 'Interaction of Cx43 with Hsc70 regulates G1/S transition through CDK inhibitor p27', *Scientific Reports*, 5, p. 15365. Available at: https://doi.org/10.1038/srep15365.

Höber, R. (1936) 'The permeability of red blood corpuscles to organic anions', *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 7(3), pp. 367–391. Available at: https://doi.org/10.1002/jcp.1030070306.

Horner, A. *et al.* (1996) 'Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF-alpha receptor in rapidly forming human bone', *Bone*, 19(4), pp. 353–362. Available at: https://doi.org/10.1016/s8756-3282(96)00217-7.

Huang, C.-F. *et al.* (2010) 'Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts', *Cancer Research*, 70(11), pp. 4580–4589. Available at: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3016.

Hudder, A. and Werner, R. (2000) 'Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), pp. 34586–34591. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M005199200.

Hudder, Alice and Werner, R. (2000) 'Analysis of a Charcot-Marie-Tooth Disease Mutation Reveals an Essential Internal Ribosome Entry Site Element in the Connexin-32 Gene', *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), pp. 34586–34591. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M005199200.

Ibrahim, T. *et al.* (2010) 'Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer', *Cancer*, 116(6), pp. 1406–1418. Available at: https://doi.org/10.1002/cncr.24896.

Ippolito, L. *et al.* (2019) 'Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer', *Oncogene*, 38(27), pp. 5339–5355. Available at: https://doi.org/10.1038/s41388-019-0805-7.

Irwin, R.M. *et al.* (2024) 'Connexin 43 regulates intercellular mitochondrial transfer from human mesenchymal stromal cells to chondrocytes', *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), p. 359. Available at: https://doi.org/10.1186/s13287-024-03932-9.

Ishikawa, T. *et al.* (2009) 'Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma', *Oncology Reports*, 21(3), pp. 707–712.

Ivanova, I.G., Park, C.V. and Kenneth, N.S. (2019) 'Translating the Hypoxic Response—The Role of HIF Protein Translation in the Cellular Response to Low Oxygen', *Cells*, 8(2), p. 114. Available at: https://doi.org/10.3390/cells8020114.

James, C.C. *et al.* (2018) 'Altered translation initiation of Gja1 limits gap junction formation during epithelial-mesenchymal transition', *Molecular Biology of the Cell*, 29(7), pp. 797–808. Available at: https://doi.org/10.1091/mbc.E17-06-0406.

Jang, S.K. *et al.* (1990) 'Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site', *Enzyme*, 44(1–4), pp. 292–309. Available at: https://doi.org/10.1159/000468766.

Jaraíz-Rodríguez, M. *et al.* (2020) 'Connexin43 peptide, TAT-Cx43266–283, selectively targets glioma cells, impairs malignant growth, and enhances survival in mouse models in vivo', *Neuro-Oncology*, 22(4), pp. 493–504. Available at: https://doi.org/10.1093/neuonc/noz243.

Jensen, K. *et al.* (2011) 'Inhibition of gap junction transfer sensitizes thyroid cancer cells to anoikis', *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), pp. 613–626. Available at: https://doi.org/10.1530/ERC-10-0289.

Jinn, Y., Ichioka, M. and Marumo, F. (1998) 'Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer', *Cancer Letters*, 127(1–2), pp. 161–169. Available at: https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00032-9.

Johnstone, S.R., Kroncke, B.M., *et al.* (2012) 'MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation', *Circulation Research*, 111(2), pp. 201–211. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.272302.

Johnstone, S.R., Billaud, M., *et al.* (2012) 'Posttranslational modifications in connexins and pannexins', *The Journal of Membrane Biology*, 245(5–6), pp. 319–332. Available at: https://doi.org/10.1007/s00232-012-9453-3.

Joshi-Mukherjee, R. *et al.* (2007) 'Evidence for the presence of a free C-terminal fragment of cx43 in cultured cells', *Cell Communication & Adhesion*, 14(2–3), pp. 75–84. Available at: https://doi.org/10.1080/15419060701402320.

Kalluri, R. (2016) 'The biology and function of fibroblasts in cancer', *Nature Reviews. Cancer*, 16(9), pp. 582–598. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73.

Kamadjou, C. *et al.* (2022) 'Prostate Cancer: Risk Factors and Outcome Indicators', *Surgical Science*, 13(8), pp. 381–400. Available at: https://doi.org/10.4236/ss.2022.138047.

KANCZUGA-KODA, L. *et al.* (2014) 'E-cadherin and β-catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer', *Oncology Letters*, 7(6), pp. 1863–1870. Available at: https://doi.org/10.3892/ol.2014.1970.

Karginov, T.A. *et al.* (2017) 'Mammalian Polycistronic mRNAs and Disease', *Trends in Genetics*, 33(2), pp. 129–142. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.11.007.

Kawaguchi, J. *et al.* (1999) 'Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(5), pp. 764–775. Available at: https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.5.764.

Kazan, J.M. *et al.* (2019) 'Cx43 Expression Correlates with Breast Cancer Metastasis in MDA-MB-231 Cells In Vitro, In a Mouse Xenograft Model and in Human Breast Cancer Tissues', *Cancers*, 11(4), p. 460. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers11040460.

Keller, E.T. and Brown, J. (2004) 'Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity', *Journal of Cellular Biochemistry*, 91(4), pp. 718–729. Available at: https://doi.org/10.1002/jcb.10662.

Kelsell, D.P. *et al.* (1997) 'Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness', *Nature*, 387(6628), pp. 80–83. Available at: https://doi.org/10.1038/387080a0.

Khan, H.M. and Cheng, H.H. (2022) 'Germline genetics of prostate cancer', *The Prostate*, 82 Suppl 1(Suppl 1), pp. S3–S12. Available at: https://doi.org/10.1002/pros.24340.

Kim, C.-H. *et al.* (2021) 'Artificial Intelligence Techniques for Prostate Cancer Detection through Dual-Channel Tissue Feature Engineering', *Cancers*, 13(7), p. 1524. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers13071524.

Kirchhoff, T. *et al.* (2004) 'BRCA mutations and risk of prostate cancer in Ashkenazi Jews', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(9), pp. 2918–2921. Available at: https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0604.

Knudsen, B.S. and Vasioukhin, V. (2010) 'Mechanisms of prostate cancer initiation and progression', *Advances in Cancer Research*, 109, pp. 1–50. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380890-5.00001-6.

Kobayashi, A. *et al.* (2011) 'Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(13), pp. 2641–2655. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20110840.

Kotini, M. *et al.* (2018) 'Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo', *Nature Communications*, 9(1), p. 3846. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-018-06368-x.

Koval, M., Molina, S.A. and Burt, J.M. (2014) 'Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues', *FEBS letters*, 588(8), pp. 1193–1204. Available at: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.025.

Kretschmer, A. *et al.* (2019) 'Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer', *Scientific Reports*, 9(1), p. 7826. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-019-44346-5.

Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1986) 'Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein', *The Journal of Cell Biology*, 103(3), pp. 767–776. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.767.

Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1996) 'The gap junction communication channel', *Cell*, 84(3), pp. 381–388. Available at: https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81282-9.

Lacey, D.L. *et al.* (2012) 'Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(5), pp. 401–419. Available at: https://doi.org/10.1038/nrd3705.

Lahlou, H. *et al.* (2005) 'Restoration of Functional Gap Junctions through Internal Ribosome Entry Site-Dependent Synthesis of Endogenous Connexins in Density-Inhibited Cancer Cells', *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), pp. 4034–4045. Available at: https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4034-4045.2005.

Laird, D.W. (2005) 'Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1711(2), pp. 172–182. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.009.

Laird, D.W., Puranam, K.L. and Revel, J.P. (1991) 'Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes', *Biochemical Journal*, 273(1), pp. 67–72. Available at: https://doi.org/10.1042/bj2730067.

Lamiche, C. *et al.* (2012) 'The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells', *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(2), pp. 111–122. Available at: https://doi.org/10.1007/s10585-011-9434-4.

Lampe, P.D. and Lau, A.F. (2004) 'The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7), pp. 1171–1186. Available at: https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00264-4.

Lang, K.J.D., Kappel, A. and Goodall, G.J. (2002) 'Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia', *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), pp. 1792–1801. Available at: https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0017.

Lau, A.F. (2005) 'c-Src: bridging the gap between phosphorylation- and acidification-induced gap junction channel closure', *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005(291), p. pe33. Available at: https://doi.org/10.1126/stke.2912005pe33.

Leithe, E., Mesnil, M. and Aasen, T. (2018) 'The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales', *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(1), pp. 48–64. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.008.

Li, H. *et al.* (2016) 'Regulation of Connexin43 Function and Expression by Tyrosine Kinase 2*', *Journal of Biological Chemistry*, 291(30), pp. 15867–15880. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727008.

Li, W. *et al.* (2025) 'Molecular mechanisms of mitochondrial quality control', *Translational Neurodegeneration*, 14(1), p. 45. Available at: https://doi.org/10.1186/s40035-025-00505-5.

Li, X. (2019) 'Gap junction protein connexin43 and tunneling nanotubes in human trabecular meshwork cells', *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 11(5), pp. 212–219.

Li, Y., Chen, W. and Feng, J. (2025) 'Astrocyte-derived Exosomal GJA1-20 k Targets Pink1-mediated Mitophagy to Attenuate Traumatic Brain Injury', *Translational Stroke Research* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s12975-025-01374-w.

Li, Z., Zhou, Z. and Donahue, H.J. (2008) 'Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential', *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(3), pp. 265–272. Available at: https://doi.org/10.1007/s10585-007-9140-4.

Limani, R., Lež, C. and Krušlin, B. (2024) 'Exploring the Relationship between E-Cadherin and β-Catenin Cell Adhesion Proteins and Periacinar Retraction Clefting in Prostatic Adenocarcinoma', *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 14(5), p. 511. Available at: https://doi.org/10.3390/diagnostics14050511.

Lin, J.H.-C. *et al.* (2002) 'Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells', *The Journal of Neuroscience*, 22(11), pp. 4302–4311. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04302.2002.

Lin, Q. *et al.* (2016) 'Astrocytes protect glioma cells from chemotherapy and upregulate survival genes via gap junctional communication', *Molecular Medicine Reports*, 13(2), pp. 1329–1335. Available at: https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4680.

Lin, R. *et al.* (2001) 'v-Src-mediated phosphorylation of connexin43 on tyrosine disrupts gap junctional communication in mammalian cells', *Cell Communication & Adhesion*, 8(4–6), pp. 265–269. Available at: https://doi.org/10.3109/15419060109080735.

Liu, A.Y. *et al.* (2004) 'Lineage relationship between LNCaP and LNCaP-derived prostate cancer cell lines', *The Prostate*, 60(2), pp. 98–108. Available at: https://doi.org/10.1002/pros.20031.

Liu, S. *et al.* (1993) 'A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length', *Biophysical Journal*, 64(5), pp. 1422–1433. Available at: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81508-X.

Liu, Z. *et al.* (2017) 'A potential role for the Hippo pathway protein, YAP, in controlling proliferation, cell cycle progression, and autophagy in BCPAP and KI thyroid papillary carcinoma cells', *American Journal of Translational Research*, 9(7), pp. 3212–3223.

Loewenstein, W.R. *et al.* (1965) 'Intercellular Communication: Renal, Urinary Bladder, Sensory, and Salivary Gland Cells', *Science (New York, N.Y.)*, 149(3681), pp. 295–298. Available at: https://doi.org/10.1126/science.149.3681.295.

Loewenstein, W.R. (1981) 'Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel', *Physiological Reviews*, 61(4), pp. 829–913. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.829.

Loewenstein, W.R. and Kanno, Y. (1966) 'Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells', *Nature*, 209(5029), pp. 1248–1249.

Lopez, W. *et al.* (2016) 'Mechanism of gating by calcium in connexin hemichannels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49), pp. E7986–E7995. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1609378113.

Lucaciu, S.A. *et al.* (2023) 'Diversity in connexin biology', *Journal of Biological Chemistry*, 299(11), p. 105263. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105263.

Luis, T.C., Lawson, H. and Kranc, K.R. (2020) 'Divide and Rule: Mitochondrial Fission Regulates Quiescence in Hematopoietic Stem Cells', *Cell Stem Cell*, 26(3), pp. 299–301. Available at: https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.009.

Luo, F. *et al.* (2022) 'Bone marrow mesenchymal stem cells promote the progression of prostate cancer through the SDF-1/CXCR4 axis in vivo and vitro', *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 24(5), pp. 892–901. Available at: https://doi.org/10.1007/s12094-021-02740-4.

Ma, T. *et al.* (2011) 'Synaptic Stimulation of mTOR Is Mediated by Wnt Signaling and Regulation of Glycogen Synthetase Kinase-3', *The Journal of Neuroscience*, 31(48), pp. 17537–17546. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4761-11.2011.

Maalouf, M. *et al.* (2024) 'Exploring the Potent Roles of an Internally Translated Truncated Connexin-43 Isoform', *Biology*, 13(12), p. 1046. Available at: https://doi.org/10.3390/biology13121046.

MacDonald, B.T., Tamai, K. and He, X. (2009) 'Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases', *Developmental Cell*, 17(1), pp. 9–26. Available at: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.

Macleod, K.F. (2020) 'Mitophagy and Mitochondrial Dysfunction in Cancer', *Annual Review of Cancer Biology*, 4(Volume 4, 2020), pp. 41–60. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033405.

Madan, S. *et al.* (2022) 'Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 781933. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2021.781933.

Maeda, S. *et al.* (2009) 'Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 A resolution', *Nature*, 458(7238), pp. 597–602. Available at: https://doi.org/10.1038/nature07869.

Mancini, S.J.C. *et al.* (2021) 'Deciphering Tumor Niches: Lessons From Solid and Hematological Malignancies', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 766275. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766275.

Maqbool, R. *et al.* (2015) 'The carboxy-terminal domain of connexin 43 (CT-Cx43) modulates the expression of p53 by altering miR-125b expression in low-grade human breast cancers', *Cellular Oncology*, 38(6), pp. 443–451. Available at: https://doi.org/10.1007/s13402-015-0240-x.

Marques-Ramos, A. *et al.* (2017) 'Cap-independent translation ensures mTOR expression and function upon protein synthesis inhibition', *RNA*, 23(11), pp. 1712–1728. Available at: https://doi.org/10.1261/rna.063040.117.

Márquez-Jurado, S. *et al.* (2018) 'Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression', *Nature Communications*, 9, p. 389. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-017-02787-4.

Mazure, N.M. (2024) 'Oxygen shortage: Himalayan adventures in an incubator', *The EMBO journal*, 43(11), pp. 2087–2090. Available at: https://doi.org/10.1038/s44318-024-00105-5.

McCutcheon, S. and Spray, D.C. (2022) 'Glioblastoma–Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion', *Molecular Cancer Research*, 20(2), pp. 319–331. Available at: https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0199.

McNeal, J.E. (1968) 'Regional morphology and pathology of the prostate', *American Journal of Clinical Pathology*, 49(3), pp. 347–357. Available at: https://doi.org/10.1093/ajcp/49.3.347.

McNeal, J.E. (1981) 'The zonal anatomy of the prostate', *The Prostate*, 2(1), pp. 35–49. Available at: https://doi.org/10.1002/pros.2990020105.

McNeal, J.E. (1988) 'Normal histology of the prostate', *The American Journal of Surgical Pathology*, 12(8), pp. 619–633. Available at: https://doi.org/10.1097/00000478-198808000-00003.

Melwani, P.K. and Pandey, B.N. (2023) 'Tunneling nanotubes: The intercellular conduits contributing to cancer pathogenesis and its therapy', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, p. 189028. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189028.

Mennecier, G. *et al.* (2008) 'Aberrant expression and localization of connexin43 and connexin30 in a rat glioma cell line', *Molecular Carcinogenesis*, 47(5), pp. 391–401. Available at: https://doi.org/10.1002/mc.20393.

Merrifield, P.A. and Laird, D.W. (2016) 'Connexins in skeletal muscle development and disease', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 50, pp. 67–73. Available at: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.001.

Milks, L.C. *et al.* (1988) 'Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations', *The EMBO journal*, 7(10), pp. 2967–2975. Available at: https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03159.x.

Mishra, A. *et al.* (2012) 'Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer', *Molecular cancer research: MCR*, 10(6), pp. 703–712. Available at: https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0569.

Mohammadian-Hafshejani, A. *et al.* (2024) 'Investigating the Relationship between Cadmium Exposure and the Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis', *Iranian Journal of Public Health*, 53(3), pp. 553–567. Available at: https://doi.org/10.18502/ijph.v53i3.15136.

Montanari, M. *et al.* (2017) 'Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview', *Oncotarget*, 8(21), pp. 35376–35389. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.15686.

Moorby, C. and Patel, M. (2001) 'Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation', *Experimental Cell Research*, 271(2), pp. 238–248. Available at: https://doi.org/10.1006/excr.2001.5357.

Morgan, C. *et al.* (2013) 'The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype', *PloS One*, 8(12), p. e81666. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081666.

Mulari, M., Vääräniemi, J. and Väänänen, H.K. (2003) 'Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts', *Microscopy Research and Technique*, 61(6), pp. 496–503. Available at: https://doi.org/10.1002/jemt.10371.

Mundy, G.R. (1997) 'Mechanisms of bone metastasis', *Cancer*, 80(8 Suppl), pp. 1546–1556. Available at: https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+%253C1546::aid-cncr4%253E3.3.co;2-r.

Myers, J.B. *et al.* (2018) 'Structure of native lens connexin 46/50 intercellular channels by cryo-EM', *Nature*, 564(7736), pp. 372–377. Available at: https://doi.org/10.1038/s41586-018-0786-7.

Nakagawa, S. *et al.* (2011) 'Asparagine 175 of connexin32 is a critical residue for docking and forming functional heterotypic gap junction channels with connexin26', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), pp. 19672–19681. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204958.

Nalwoga, H. *et al.* (2016) 'Strong Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1α (HIF-1α) Is Associated with Axl Expression and Features of Aggressive Tumors in African Breast Cancer', *PLoS ONE*, 11(1), p. e0146823. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146823.

Narendra, D.P. and Youle, R.J. (2024) 'The role of PINK1-Parkin in mitochondrial quality control', *Nature Cell Biology*, 26(10), pp. 1639–1651. Available at: https://doi.org/10.1038/s41556-024-01513-9.

Naus, C.C. and Laird, D.W. (2010) 'Implications and challenges of connexin connections to cancer', *Nature Reviews. Cancer*, 10(6), pp. 435–441. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc2841.

Neftel, C. *et al.* (2019) 'An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma', *Cell*, 178(4), pp. 835-849.e21. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024.

Nowicki, A., Sporny, S. and Duda-Szymańska, J. (2012) 'β-catenin as a prognostic factor for prostate cancer (PCa)', *Central European Journal of Urology*, 65(3), pp. 119–123. Available at: https://doi.org/10.5173/ceju.2012.03.art4.

Ottewell, P.D. (2016) 'The role of osteoblasts in bone metastasis', *Journal of Bone Oncology*, 5(3), pp. 124–127. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.03.007.

Oyamada, M. *et al.* (1990) 'Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43', *Molecular Carcinogenesis*, 3(5), pp. 273–278. Available at: https://doi.org/10.1002/mc.2940030507.

Paget, S. (1989) 'The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889', *Cancer Metastasis Reviews*, 8(2), pp. 98–101.

Palacios-Prado, N. *et al.* (2009) 'Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina', *The Journal of Physiology*, 587(Pt 13), pp. 3251–3269. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171496.

Palatinus, J.A. *et al.* (2023) 'GJA1-20k Rescues Cx43 Localization and Arrhythmias in Arrhythmogenic Cardiomyopathy', *Circulation Research*, 132(6), pp. 744–746. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.322294.

Panchin, Y. *et al.* (2000) 'A ubiquitous family of putative gap junction molecules', *Current biology: CB*, 10(13), pp. R473-474. Available at: https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00576-5.

Panov, A. and Orynbayeva, Z. (2013) 'Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3, DU145 and LNCaP', *PLoS ONE*. Edited by D. Nie, 8(8), p. e72078. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072078.

Park, H.U. *et al.* (2009) 'AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival', *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), pp. 733–741. Available at: https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0631.

Paul, D.L. (1986) 'Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein', *The Journal of Cell Biology*, 103(1), pp. 123–134. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.103.1.123.

Payton, B.W., Bennett, M.V. and Pappas, G.D. (1969) 'Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse', *Science (New York, N.Y.)*, 166(3913), pp. 1641–1643. Available at: https://doi.org/10.1126/science.166.3913.1641.

Pelaz, S.G. *et al.* (2020) 'Targeting metabolic plasticity in glioma stem cells in vitro and in vivo through specific inhibition of c-Src by TAT-Cx43266-283', *eBioMedicine*, 62, p. 103134. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103134.

Peleli, M., Moustakas, A. and Papapetropoulos, A. (2020) 'Endothelial-Tumor Cell Interaction in Brain and CNS Malignancies', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), p. 7371. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms21197371.

Peracchia, C. (2004) 'Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1662(1–2), pp. 61–80. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.020.

Peracchia, C. (2024) 'Calcium Role in Gap Junction Channel Gating: Direct Electrostatic or Calmodulin-Mediated?', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), p. 9789. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms25189789.

Perkins, G.A., Goodenough, D.A. and Sosinsky, G.E. (1998) 'Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons', *Journal of Molecular Biology*, 277(2), pp. 171–177. Available at: https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1580.

Pfeifer, I. *et al.* (2004) 'Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies', *Nucleic Acids Research*, 32(15), pp. 4550–4562. Available at: https://doi.org/10.1093/nar/gkh792.

Phillips, C.M. *et al.* (2023) '20 kDa isoform of connexin-43 augments spatial reorganization of the brain endothelial junctional complex and lesion leakage in cerebral cavernous malformation type-3', *Neurobiology of Disease*, 186, p. 106277. Available at: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106277.

Pogoda, K. *et al.* (2016) 'Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision', *BMC Cell Biology*, 17(S1), p. 11. Available at: https://doi.org/10.1186/s12860-016-0099-3.

Pollmann, M.-A. *et al.* (2005) 'Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture', *Breast cancer research: BCR*, 7(4), pp. R522-534. Available at: https://doi.org/10.1186/bcr1042.

Pridham, K.J. *et al.* (2022) 'Connexin 43 confers chemoresistance through activating PI3K', *Oncogenesis*, 11(1), p. 2. Available at: https://doi.org/10.1038/s41389-022-00378-7.

Puebla, C. *et al.* (2017) 'Regulation of Connexin-Based Channels by Fatty Acids', *Frontiers in Physiology*, 8, p. 11. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00011.

Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003) 'Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator', *Endocrine Reviews*, 24(1), pp. 78–90. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2002-0012.

Rackauskas, M., Neverauskas, V. and Skeberdis, V.A. (2010) 'Diversity and properties of connexin gap junction channels', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 46(1), pp. 1–12.

Raggatt, L.J. and Partridge, N.C. (2010) 'Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), pp. 25103–25108. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087.

Ramteke, A. *et al.* (2015) 'Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules', *Molecular Carcinogenesis*, 54(7), pp. 554–565. Available at: https://doi.org/10.1002/mc.22124.

Redoute-Timonnier, C. and Auguste, P. (2024) 'Implication of the Extracellular Matrix in Metastatic Tumor Cell Dormancy', *Cancers*, 16(23), p. 4076. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers16234076.

Ren, D. *et al.* (2019) 'Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone', *The Journal of Experimental Medicine*, 216(2), pp. 428–449. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20180661.

Ren, D. *et al.* (2020) 'Overexpression of Astrocytes-Specific GJA1-20k Enhances the Viability and Recovery of the Neurons in a Rat Model of Traumatic Brain Injury', *ACS Chemical Neuroscience*, 11(11), pp. 1643–1650. Available at: https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00142.

Ren, D. *et al.* (2022) 'GJA1-20K Enhances Mitochondria Transfer from Astrocytes to Neurons via Cx43-TnTs After Traumatic Brain Injury', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(6), pp. 1887–1895. Available at: https://doi.org/10.1007/s10571-021-01070-x.

Revel, J.P. and Karnovsky, M.J. (1967) 'Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver', *The Journal of Cell Biology*, 33(3), pp. C7–C12. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.33.3.c7.

Ribeiro-Rodrigues, T.M. *et al.* (2017) 'Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication – gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes', *Journal of Cell Science*, p. jcs.200667. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.200667.

Rinaldi, F. *et al.* (2014) 'Cross-regulation of Connexin43 and β-catenin influences differentiation of human neural progenitor cells', *Cell Death & Disease*, 5(1), p. e1017. Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2013.546.

Rodríguez-Candela Mateos, M. *et al.* (2024) 'Insights into the role of connexins and specialized intercellular communication pathways in breast cancer: Mechanisms and applications', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1879(5), p. 189173. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189173.

Rodriguez-Sinovas, A. *et al.* (2006) 'Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection', *Circulation Research*, 99(1), pp. 93–101. Available at: https://doi.org/10.1161/01.RES.0000230315.56904.de.

Rodríguez-Sinovas, A. *et al.* (2021) 'Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4413. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms22094413.

Rosenbluh, J. *et al.* (2012) 'β-catenin driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis', *Cell*, 151(7), pp. 1457–1473. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.026.

S, M. *et al.* (2011) 'The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion', *Journal of cell science*, 124(Pt 15). Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.089532.

Sáez, J.C. *et al.* (1989) 'Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), pp. 2708–2712. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2708.

Saffitz, J.E., Hames, K.Y. and Kanno, S. (2007) 'Remodeling of gap junctions in ischemic and nonischemic forms of heart disease', *The Journal of Membrane Biology*, 218(1–3), pp. 65–71. Available at: https://doi.org/10.1007/s00232-007-9031-2.

Saidi Brikci-Nigassa, A. *et al.* (2012) 'Phosphorylation Controls the Interaction of the Connexin43 C-Terminal Domain with Tubulin and Microtubules', *Biochemistry*, 51(21), pp. 4331–4342. Available at: https://doi.org/10.1021/bi201806j.

Salat-Canela, C. *et al.* (2014) 'Internal translation of the connexin 43 transcript', *Cell communication and signaling: CCS*, 12, p. 31. Available at: https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-31.

Samaratunga, H. *et al.* (2016) 'From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer', *Scandinavian Journal of Urology*, 50(5), pp. 325–329. Available at: https://doi.org/10.1080/21681805.2016.1201858.

Santos, M. *et al.* (2025) 'Hypoxia-Driven Extracellular Vesicles Promote Pro-Metastatic Signalling in LNCaP Cells via Wnt and EMT Pathways', *Biology*, 14(9), p. 1135. Available at: https://doi.org/10.3390/biology14091135.

Sato, A. *et al.* (2021) 'Effects of Alpha-Connexin Carboxyl-Terminal Peptide (aCT1) and Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) on Canine Oral Mucosal Melanoma (OMM) Cells', *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p. 670451. Available at: https://doi.org/10.3389/fvets.2021.670451.

Schiavi, A., Hudder, A. and Werner, R. (1999) 'Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site', *FEBS letters*, 464(3), pp. 118–122. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01699-3.

Schiavi, Adam, Hudder, A. and Werner, R. (1999) 'Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site', *FEBS Letters*, 464(3), pp. 118–122. Available at: https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01699-3.

Schröder, F.H. *et al.* (1992) 'The TNM classification of prostate cancer', *The Prostate. Supplement*, 4, pp. 129–138. Available at: https://doi.org/10.1002/pros.2990210521.

Segretain, D. *et al.* (2004) 'A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway', *Biochimie*, 86(4), pp. 241–244. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.05.003.

Seisen, T. *et al.* (2012) '[The prostate gland: a crossroad between the urinary and the seminal tracts]', *Progres En Urologie: Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie*, 22 Suppl 1, pp. S2-6. Available at: https://doi.org/10.1016/S1166-7087(12)70028-3.

Seo, J.H. *et al.* (2019) 'Mitochondrial fission factor is a novel Myc-dependent regulator of mitochondrial permeability in cancer', *EBioMedicine*, 48, pp. 353–363. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.017.

Severs, N.J. (2001) 'Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(4), pp. 355–366. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00170.x.

Shaw, R.M. *et al.* (2007) 'Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions'.

Shiao, S.L., Chu, G.C.-Y. and Chung, L.W.K. (2016) 'Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment', *Cancer Letters*, 380(1), pp. 340–348. Available at: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.022.

Shih, H.-J. *et al.* (2021) 'Differential expression of hypoxia-inducible factors related to the invasiveness of epithelial ovarian cancer', *Scientific Reports*, 11(1), p. 22925. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-021-02400-1.

Shimura, D. *et al.* (2021) 'Protective mitochondrial fission induced by stress-responsive protein GJA1-20k', *eLife*, 10, p. e69207. Available at: https://doi.org/10.7554/eLife.69207.

Shimura, D. and Shaw, R.M. (2022) 'GJA1-20k and Mitochondrial Dynamics', *Frontiers in Physiology*, 13, p. 867358. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2022.867358.

Shiozawa, Y. *et al.* (2016) 'The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer', *Oncotarget*, 7(27), pp. 41217–41232. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.9251.

Shirao, T. and González-Billault, C. (2013) 'Actin filaments and microtubules in dendritic spines', *Journal of Neurochemistry*, 126(2), pp. 155–164. Available at: https://doi.org/10.1111/jnc.12313.

Sin, W.C. *et al.* (2016) 'Astrocytes promote glioma invasion via the gap junction protein connexin43', *Oncogene*, 35(12), pp. 1504–1516. Available at: https://doi.org/10.1038/onc.2015.210.

Singh, D. *et al.* (2005) 'Connexin 43 Interacts with Zona Occludens-1 and -2 Proteins in a Cell Cycle Stage-specific Manner*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), pp. 30416–30421. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M506799200.

Singh, S. *et al.* (2004) 'CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 84(12), pp. 1666–1676. Available at: https://doi.org/10.1038/labinvest.3700181.

Smith, P.C. *et al.* (2001) 'Interleukin-6 and prostate cancer progression', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(1), pp. 33–40. Available at: https://doi.org/10.1016/s1359-6101(00)00021-6.

Smyth, J.W. *et al.* (2012) 'Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin 43 vesicles to the plasma membrane', *Circulation Research*, 110(7), pp. 978–989. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.257964.

Smyth, J.W. and Shaw, R.M. (2013) 'Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms', *Cell Reports*, 5(3), pp. 611–618. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.009.

Soares, A.R. *et al.* (2015) 'Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells', *Scientific Reports*, 5, p. 13243. Available at: https://doi.org/10.1038/srep13243.

Söhl, G. and Willecke, K. (2003) 'An Update on Connexin Genes and their Nomenclature in Mouse and Man', *Cell Communication & Adhesion*, 10(4–6), pp. 173–180. Available at: https://doi.org/10.1080/cac.10.4-6.173.180.

Sorgen, P.L. *et al.* (2018) 'Protein⁻Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), p. 1428. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms19051428.

Spagnol, G. *et al.* (2018) 'Connexin43 Carboxyl-Terminal Domain Directly Interacts with β-Catenin', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), p. 1562. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms19061562.

Steder, M. *et al.* (2013) 'DNp73 Exerts Function in Metastasis Initiation by Disconnecting the Inhibitory Role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 Signaling', *Cancer Cell*, 24(4), pp. 512–527. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.023.

Stevenson, B.R. *et al.* (1986) 'Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia', *The Journal of Cell Biology*, 103(3), pp. 755–766. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.755.

Stewart, T.A., Yapa, K.T.D.S. and Monteith, G.R. (2015) 'Altered calcium signaling in cancer cells', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1848(10 Pt B), pp. 2502–2511. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.016.

Stoletov, K. *et al.* (2013) 'Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization', *Journal of Cell Science*, p. jcs.112748. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.112748.

Strale, P.-O. *et al.* (2012) 'Down-regulation of Connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion', *Molecular Carcinogenesis*, 51(11), pp. 845–860. Available at: https://doi.org/10.1002/mc.20853.

Suda, T., Takubo, K. and Semenza, G.L. (2011) 'Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche', *Cell Stem Cell*, 9(4), pp. 298–310. Available at: https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.010.

Sun, Y. *et al.* (2012) 'Connexin 43 interacts with Bax to regulate apoptosis of pancreatic cancer through a gap junction-independent pathway', *International Journal of Oncology*, 41(3), pp. 941–948. Available at: https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1524.

Suzuki, A. *et al.* (2003) 'Induction of cell-cell detachment during glucose starvation through F-actin conversion by SNARK, the fourth member of the AMP-activated protein kinase catalytic subunit family', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(1), pp. 156–161. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.184.

Taichman, R.S. *et al.* (2013) 'GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation', *PloS One*, 8(4), p. e61873. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061873.

Takubo, K. *et al.* (2010) 'Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells', *Cell Stem Cell*, 7(3), pp. 391–402. Available at: https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020.

Talbot, J. *et al.* (2020) 'Antagonistic Functions of Connexin 43 during the Development of Primary or Secondary Bone Tumors', *Biomolecules*, 10(9), p. 1240. Available at: https://doi.org/10.3390/biom10091240.

Tamura, D. *et al.* (2008) 'Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone', *International Journal of Oncology*, 33(1), pp. 17–24.

Tan, J. *et al.* (2024) 'Limited oxygen in standard cell culture alters metabolism and function of differentiated cells', *The EMBO journal*, 43(11), pp. 2127–2165. Available at: https://doi.org/10.1038/s44318-024-00084-7.

TenBroek, E.M. *et al.* (2001) 'Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP', *The Journal of Cell Biology*, 155(7), pp. 1307–1318. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.200102017.

Tennakoon, J.B. *et al.* (2014) 'Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1α-mediated metabolic switch', *Oncogene*, 33(45), pp. 5251–5261. Available at: https://doi.org/10.1038/onc.2013.463.

Thiery, J.P. (2002) 'Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression', *Nature Reviews. Cancer*, 2(6), pp. 442–454. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc822.

Thompson, G.B. *et al.* (2025) 'Influence of Hypoxia on a Biomaterial Model of the Bone Marrow Perivascular Niche', *Advanced Healthcare Materials*, 14(14), p. 2500858. Available at: https://doi.org/10.1002/adhm.202500858.

Thuringer, D., Jego, G., *et al.* (2016) 'Gap junction-mediated transfer of miR-145-5p from microvascular endothelial cells to colon cancer cells inhibits angiogenesis', *Oncotarget*, 7(19), pp. 28160–28168. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.8583.

Thuringer, D., Boucher, J., *et al.* (2016) 'Transfer of functional microRNAs between glioblastoma and microvascular endothelial cells through gap junctions', *Oncotarget*, 7(45), pp. 73925–73934. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.12136.

Tishchenko, A. *et al.* (2020) 'Cx43 and Associated Cell Signaling Pathways Regulate Tunneling Nanotubes in Breast Cancer Cells', *Cancers*, 12(10), p. 2798. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers12102798.

van der Toom, E.E., Verdone, J.E. and Pienta, K.J. (2016) 'Disseminated tumor cells and dormancy in prostate cancer metastasis', *Current Opinion in Biotechnology*, 40, pp. 9–15. Available at: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.002.

Tosatto, A. *et al.* (2016) 'The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1α', *EMBO molecular medicine*, 8(5), pp. 569–585. Available at: https://doi.org/10.15252/emmm.201606255.

Totland, M.Z. *et al.* (2023) 'Endocytic trafficking of connexins in cancer pathogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1869(7), p. 166812. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166812.

Toyofuku, T. *et al.* (1998) 'Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(21), pp. 12725–12731. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12725.

Toyofuku, T. *et al.* (1999) 'Functional role of c-Src in gap junctions of the cardiomyopathic heart', *Circulation Research*, 85(8), pp. 672–681. Available at: https://doi.org/10.1161/01.res.85.8.672.

Tsai, H. *et al.* (1996) 'Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(1), pp. 64–69. Available at: https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1468.

Ul-Hussain, M. *et al.* (2014) 'Internal ribosomal entry site (IRES) activity generates endogenous carboxyl-terminal domains of Cx43 and is responsive to hypoxic conditions', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(30), pp. 20979–20990. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540187.

Ul-Hussain, M., Dermietzel, R. and Zoidl, G. (2012) 'Connexins and Cap-independent translation: role of internal ribosome entry sites', *Brain Research*, 1487, pp. 99–106. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.065.

Unger, V.M. *et al.* (1999) 'Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel', *Science (New York, N.Y.)*, 283(5405), pp. 1176–1180. Available at: https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1176.

Unwin, P.N. and Zampighi, G. (1980) 'Structure of the junction between communicating cells', *Nature*, 283(5747), pp. 545–549. Available at: https://doi.org/10.1038/283545a0.

Vallenius, T. *et al.* (2011) 'An association between NUAK2 and MRIP reveals a novel mechanism for regulation of actin stress fibers', *Journal of Cell Science*, 124(Pt 3), pp. 384–393. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.072660.

Varelas, X. *et al.* (2010) 'The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling', *Developmental Cell*, 18(4), pp. 579–591. Available at: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.007.

Verselis, V.K. and Srinivas, M. (2013) 'Connexin channel modulators and their mechanisms of action', *Neuropharmacology*, 75, pp. 517–524. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.020.

Vigneron, A.M., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (2010) 'Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP', *Genes & Development*, 24(21), pp. 2430–2439. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.1954310.

Vikramdeo, K.S. *et al.* (2023) 'Mitochondrial Alterations in Prostate Cancer: Roles in Pathobiology and Racial Disparities', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), p. 4482. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms24054482.

Wallace, D.C. (2012) 'Mitochondria and cancer', *Nature Reviews Cancer*, 12(10), pp. 685–698. Available at: https://doi.org/10.1038/nrc3365.

Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) 'General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), pp. 4304–4308. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4304.

Wang, H. *et al.* (2015) 'The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells', *Cancer Cell*, 27(2), pp. 193–210. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.017.

Wang, H. *et al.* (2018) 'The Osteogenic Niche Is a Calcium Reservoir of Bone Micrometastases and Confers Unexpected Therapeutic Vulnerability', *Cancer Cell*, 34(5), pp. 823-839.e7. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.002.

Wang, L. *et al.* (2018) 'Calcium and CaSR/IP3R in prostate cancer development', *Cell & Bioscience*, 8(1), p. 16. Available at: https://doi.org/10.1186/s13578-018-0217-3.

Wang, M. *et al.* (2025) 'Connexin 43 dephosphorylation mediates the Dchs1/YAP/TEAD signaling pathway to induce cardiac fibrosis', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1872(3), p. 119919. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2025.119919.

Wang, M., Berthoud, V.M. and Beyer, E.C. (2007) 'Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 2), pp. 320–329. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.03343.

Wang, N. *et al.* (2012) 'Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca2+ elevation', *Basic Research in Cardiology*, 107(6), p. 304. Available at: https://doi.org/10.1007/s00395-012-0304-2.

Warn-Cramer, B.J. *et al.* (1998) 'Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15), pp. 9188–9196. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.9188.

Watts, S.W. *et al.* (1994) 'Gap junctional communication and vascular smooth muscle reactivity: use of tetraethylammonium chloride', *Journal of Vascular Research*, 31(6), pp. 307–313. Available at: https://doi.org/10.1159/000159057.

Wei, J. *et al.* (2023) 'CAPZA1 is low expressed in non-small cell lung cancer and contributed to tumor cell proliferation and metastasis', *Minerva Medica*, 114(1), pp. 124–126. Available at: https://doi.org/10.23736/S0026-4806.20.06910-4.

Weidmann, S. (1952) 'The electrical constants of Purkinje fibres', *The Journal of Physiology*, 118(3), pp. 348–360. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004799.

Wen, B. *et al.* (2022) 'HIF-1α is essential for the augmentation of myometrial contractility during labor†', *Biology of Reproduction*, 107(6), pp. 1540–1550. Available at: https://doi.org/10.1093/biolre/ioac174.

Willecke, K. *et al.* (2002) 'Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome', 383(5), pp. 725–737. Available at: https://doi.org/10.1515/BC.2002.076.

Wilson, R.B. *et al.* (2019) 'Resistance to anoikis in transcoelomic shedding: the role of glycolytic enzymes', *Pleura and Peritoneum*, 4(1), p. 20190003. Available at: https://doi.org/10.1515/pp-2019-0003.

Worral Wilfred Raj, A.S. and Manoharan, R. (2025) 'NUAKs promote mTOR/c-Myc-induced glucose and glutamine reprogramming for cell growth and metastasis in breast cancer cells', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1871(1), p. 167508. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167508.

Wu, Z. *et al.* (2024) 'Mitochondrial fusion-fission dynamics and its involvement in colorectal cancer', *Molecular Oncology*, 18(5), pp. 1058–1075. Available at: https://doi.org/10.1002/1878-0261.13578.

Xiao, S. *et al.* (2020) 'Auxiliary trafficking subunit GJA1-20k protects connexin-43 from degradation and limits ventricular arrhythmias', *The Journal of Clinical Investigation*, 130(9), pp. 4858–4870. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI134682.

Xing, J. *et al.* (2022) 'Roles of mitochondrial fusion and fission in breast cancer progression: a systematic review', *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1), p. 331. Available at: https://doi.org/10.1186/s12957-022-02799-5.

Xing, Y. *et al.* (2007) 'Altered expression of connexin-43 and impaired capacity of gap junctional intercellular communication in prostate cancer cells', *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 27(3), pp. 291–294. Available at: https://doi.org/10.1007/s11596-007-0319-3.

Xu, N. *et al.* (2016) 'Reduced Connexin 43 expression is associated with tumor malignant behaviors and biochemical recurrence-free survival of prostate cancer', *Oncotarget*, 7(41), pp. 67476–67484. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.11231.

Yamasaki, H. *et al.* (1995) 'Intercellular communication and carcinogenesis', *Mutation Research*, 333(1–2), pp. 181–188. Available at: https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00144-1.

Yang, J. *et al.* (2023) 'Extracellular Vesicles and Cx43-Gap Junction Channels Are the Main Routes for Mitochondrial Transfer from Ultra-Purified Mesenchymal Stem Cells, RECs', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), p. 10294. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms241210294.

Yang, Y. *et al.* (2018) 'A connexin43/YAP axis regulates astroglial-mesenchymal transition in hemoglobin induced astrocyte activation', *Cell Death and Differentiation*, 25(10), pp. 1870–1884. Available at: https://doi.org/10.1038/s41418-018-0137-0.

Yao, Y. *et al.* (2018) 'Connexin 43-Mediated Mitochondrial Transfer of iPSC-MSCs Alleviates Asthma Inflammation', *Stem Cell Reports*, 11(5), pp. 1120–1135. Available at: https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.012.

Yeager, M. and Gilula, N.B. (1992) 'Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels', *Journal of Molecular Biology*, 223(4), pp. 929–948. Available at: https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90253-g.

Young, R.M. *et al.* (2008) 'Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(24), pp. 16309–16319. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M710079200.

Yu, H. *et al.* (2020) 'Targeting connexin 43 provides anti-inflammatory effects after intracerebral hemorrhage injury by regulating YAP signaling', *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), p. 322. Available at: https://doi.org/10.1186/s12974-020-01978-z.

Yw, Z., M, K. and I, M. (2003) 'The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43', *The Journal of biological chemistry*, 278(45). Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M305072200.

Zambonin-Zallone, A. *et al.* (1988) 'The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 3(5), pp. 517–523. Available at: https://doi.org/10.1002/jbmr.5650030507.

van Zeijl, L. *et al.* (2007) 'Regulation of connexin43 gap junctional communication by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate', *The Journal of Cell Biology*, 177(5), pp. 881–891. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.200610144.

Zeitz, M.J. *et al.* (2019) 'Dynamic UTR Usage Regulates Alternative Translation to Modulate Gap Junction Formation during Stress and Aging', *Cell Reports*, 27(9), pp. 2737-2747.e5. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.114.

Zhang, A. *et al.* (2015) 'Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration', *Oncotarget*, 6(13), pp. 11640–11651. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.3449.

Zhang, W. *et al.* (2003) 'Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions', *Journal of Neurosurgery*, 98(4), pp. 846–853. Available at: https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.4.0846.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'BTF3 confers oncogenic activity in prostate cancer through transcriptional upregulation of Replication Factor C', *Cell Death & Disease*, 12(1), p. 12. Available at: https://doi.org/10.1038/s41419-020-03348-2.

Zhao, B. *et al.* (2007) 'Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control', *Genes & Development*, 21(21), pp. 2747–2761. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.1602907.

Zhao, B. *et al.* (2012) 'Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis', *Genes & Development*, 26(1), pp. 54–68. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.173435.111.

Zhong, H. *et al.* (1999) 'Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases', *Cancer Research*, 59(22), pp. 5830–5835.

Zimmer, D.B. *et al.* (1987) 'Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures', *The Journal of Biological Chemistry*, 262(16), pp. 7751–7763.

Zou, J. *et al.* (2014) 'Gap junction regulation by calmodulin', *FEBS letters*, 588(8), pp. 1430–1438. Available at: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.003.

UNIVERSITÉ
Université de Poitiers

LABORATOIRE
Laboratoire 4CS - Channels and Connexins in Cancer and Cell Stemness - UR 22751

DOCTORAT
Physiologie et Physiopathologie

DIRECTION DE THÈSE
Laurent Cronier et Arnaud Monvoisin

LIEU DE THÈSE
Université de Poitiers

LA THÈSE DE **SARAH FOURNIER**

LE RÔLE DE LA CONNEXINE 43 ET DE SON ISOFORME COURTE, LA GJA1-20K, DANS L'ACQUISITION DU CARACTÈRE MÉTASTATIQUE OSSEUX DES CELLULES CANCÉREUSES PROSTATIQUES

La communication entre les cellules de notre organisme est la clef d'un bon équilibre entre nos différents organes. Chaque cellule a sa place et son rôle. Mais lorsque cette communication est perturbée, que nos cellules arrêtent de communiquer avec leurs voisines ou, au contraire, communiquent trop, ou avec d'autres cellules, alors l'organisme peut se retrouver désorganisé, et déclencher un cancer.

La connexine 43 est une protéine permettant de faire des ponts entre les cellules. Lorsque sa présence est modifiée, le cancer devient plus agressif, les cellules peuvent rejoindre d'autres organes et créer des métastases.

Ces cellules métastatiques se mettent alors à utiliser une petite version de la connexine 43, la GJA1-20k, et mon travail consiste à découvrir pourquoi.

Au cours de mes recherches, j'ai pu observer que les cellules possédant la GJA1-20k communiquent et résistent davantage par rapport aux autres cellules saines, au détriment de leur environnement, à savoir l'organe qu'elles colonisent.

Comprendre comment les métastases se mettent en place à cause de ces cellules qui ont des problèmes de communication est donc d'un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer.



Involvement of GJA1-20k, a short isoform of Connexin 43, in the adaptation of prostate cancer cells to the bone metastatic niche

Advanced-stage prostate cancer (PCa) is known to metastasize primarily to bone, due to its strong osteotropism. This preference results from complex bidirectional interactions between tumor cells and the bone microenvironment, leading to a vicious cycle involving various molecular and cellular factors that facilitate the invasion of the bone niche by prostate cancer cells.

Previous studies have highlighted the role of Connexin 43 (Cx43), a structural protein of GAP junctions, in the metastatic dissemination of PCa cells, showing its involvement as a key player in this vicious cycle. During these studies, a short isoform of Cx43, named GJA1-20k, was also identified in PCa cells. This short isoform, generated through alternative translation, corresponds to a part of the fourth transmembrane domain and the entire C-terminal domain of Cx43, which contains multiple phosphorylation sites and protein interaction domains.

Recent studies have demonstrated an essential role for GJA1-20k in cardiac function. Among its identified roles in cardiac and brain models are its function as a stress-response protein through interactions with the cytoskeleton, as a chaperone in the export of full-length Cx43 to the plasma membrane to enhance cardiac coupling, and as a regulator of mitochondrial activity to protect cells. In the context of cancer, GJA1-20k expression has been observed in several models, including prostate cancer. However, no specific function has yet been attributed to it.

To determine the impact of GJA1-20k on cell phenotype and metastatic potential, the PC-3 cell line, derived from bone metastasis of PCa and characterized by a defect in Cx43 membrane export, was used. In the first step, we investigated the effect on these cells of the bone microenvironment and hypoxia, conditions present in the endosteal niche. These conditions led to an increase in GJA1-20k expression, indicating a role as a stress-response protein. In the second step, PC-3 cells were transfected to overexpress GJA1-20k in order to study its potential roles. The main results obtained demonstrated that the overexpression of GJA1-20k: 1- Restores the membrane localization of Cx43 and consequently its channel functionalities; 2- Decreases cell proliferation and dynamics, migration and invasion; 3- Increases cellular resistance to anoïkis; 4- Induces a rearrangement of the mitochondrial network, associated with a decrease in the number and activity of mitochondria.

In conclusion, GJA1-20k is a stress-response protein able to restore membrane localization and function of Cx43, while significantly reducing the aggressive properties of PCa cells and regulating mitochondrial activity. GJA1-20k could therefore play a central role in regulating the survival and dormancy of tumor cells in prostate cancer, and consequently be involved in resistance to anticancer treatments, as well as in tumor recurrence.

Key words: Prostate cancer, Bone metastasis, GJA1-20k, Hypoxia, Mitochondria, Connexin 43

Implication de GJA1-20k, une isoforme courte de la Connexine 43, dans l'adaptation des cellules cancéreuses prostatiques au sein de la niche métastatique osseuse

Le cancer de la prostate (PCa) à un stade avancé est connu pour métastaser principalement dans les os, en raison d'un ostéotropisme important. Les interactions bidirectionnelles complexes établies entre les cellules tumorales et le microenvironnement osseux sont à l'origine de cette préférence mais également d'un cercle vicieux, impliquant divers facteurs moléculaires et cellulaires, responsable des conséquences métastatiques au sein de la niche osseuse.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence le rôle de la Connexine 43 (Cx43), protéine structurelle des jonctions GAP, dans la dissémination métastatique des cellules de PCa, soulignant son implication comme acteur de ce cercle vicieux. Au cours de ces travaux, une isoforme courte de la Cx43 nommée GJA1-20k a également été identifiée dans les cellules cancéreuses prostatiques. Cette isoforme courte générée par traduction alternative correspond à une partie du quatrième domaine transmembranaire ainsi qu'à la totalité du domaine C-terminal de la Cx43 qui possède de nombreux sites de phosphorylation et de multiples domaines d'interaction protéique notamment avec des protéines du cytosquelette.

Des études récentes ont démontré un rôle indispensable de GJA1-20k dans la fonction cardiaque. Dans les modèles cardiaques et cérébraux, GJA1-20k agit comme protéine de stress en interagissant avec le cytosquelette, comme chaperon facilitant l'exportation de la forme totale de Cx43 vers la membrane plasmique et améliorant ainsi le couplage cardiaque, ou encore comme régulateur de l'activité mitochondriale afin de protéger les cellules. Dans le contexte du cancer, l'expression de GJA1-20k a été observée dans plusieurs modèles, notamment prostatique, sans toutefois qu'aucune fonction spécifique ne lui ait été attribuée jusqu'à présent.

Afin d'évaluer l'impact de GJA1-20k sur le phénotype cellulaire et le potentiel métastatique, nous avons utilisé la lignée PC-3, issue de métastase osseuse du cancer de la prostate et possédant un défaut d'exportation membranaire de la Cx43. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet sur ces cellules du microenvironnement osseux et de l'hypoxie, deux caractéristiques majeures retrouvées au sein de la niche endostéale. Ces conditions ont entrainé une augmentation de l'expression de GJA1-20k, suggérant ainsi un rôle de protéine de réponse aux stress. Dans un second temps, les cellules PC-3 ont été transfectées afin de surexprimer GJA1-20k dans le but d'étudier ses potentiels rôles. Les principaux résultats obtenus ont démontré que la surexpression de GJA1-20k : 1- Restaure la localisation membranaire de la Cx43 et par conséquence sa fonctionnalité canalaire ; 2- Diminue la prolifération et la dynamique cellulaire (migration et invasion) ; 3- Augmente la résistance cellulaire à l'anoïkis ; 4- Induit un réarrangement du réseau mitochondrial, associé à une diminution du nombre et de l'activité des mitochondries.

En conclusion, GJA1-20k est une protéine de réponse au stress capable de restaurer la localisation membranaire de la Cx43 et sa fonction, tout en réduisant fortement les propriétés agressives des cellules, et en régulant l'activité mitochondriale. Elle pourrait ainsi jouer un rôle central dans la régulation de la survie et de la dormance des cellules tumorales dans le cancer de la prostate, et par conséquent être impliquée dans la résistance aux traitements anticancéreux, ainsi que dans le phénomène de récidive tumorale.

Mots clefs : Cancer de la prostate, Métastases osseuses, GJA1-20k, Hypoxie, Mitochondries, Connexine 43