

Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires

Paolo Meda

La plupart des cellules animales synthétisent des protéines intégrales de membrane, appelées connexines, dont la séquence et la topographie ont été très conservées au cours de l'évolution. Ces protéines forment des canaux transmembranaires, regroupés au niveau des jonctions intercellulaires de type *gap*, qui permettent à des cellules voisines d'échanger directement de nombreux ions et métabolites cytoplasmiques. Ce mécanisme de communication intercellulaire, aussi appelé couplage jonctionnel, a été impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, au cours du développement embryonnaire et dans les tissus adultes. Des études récentes indiquent que des altérations des connexines pourraient jouer un rôle considérable dans diverses maladies, en particulier la neuropathie périphérique héréditaire de Charcot-Marie-Tooth (mutations de la connexine 32) et l'hétérotaxie viscéroatriale (mutations de la connexine 43).

Le fonctionnement normal de tout organisme multicellulaire dépend de la coordination des cellules qui le composent. Cette coordination implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines et règle en conséquence son propre niveau de fonctionnement. Les cellules des vertébrés communiquent entre elles par de nombreux mécanismes. Plusieurs de ceux-ci font intervenir des signaux qui sont transmis à des cellules équipées de récepteurs, canaux, enzymes ou voies métaboliques appropriés. Dans tous

ces cas, le transfert d'information d'une cellule à l'autre se fait indirectement *via* la diffusion de l'ion ou de la molécule signal dans l'espace intercellulaire. Cependant, le fonctionnement de nombreux tissus est préservé dans des conditions qui perturbent ou même abolissent le flux de signaux intercellulaires, indiquant que d'autres mécanismes de communication intercellulaire sont au moins aussi importants. La perte du fonctionnement normal de certains tissus après isolement de leurs cellules suggère que ces mécanismes dépendent d'interactions directes entre cellules voisines.

ADRESSE

P. Meda : docteur en médecine, professeur adjoint. Département de Morphologie, Université de Genève, Centre Médical Universitaire, 1, rue Michel-Servet, CH-1211 Genève 4, Suisse.

RÉFÉRENCES

1. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 1990; 116: 187-94.
2. Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. Gap junctions : new tools, new answers, new questions. *Neuron* 1991; 6: 305-20.
3. Kumar NM, Gilula NB. Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol* 1992; 13: 3-16.
4. Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 1-7.
5. Fishman GI, Eddy RL, Shows TB, Rosenthal L, Leinwand LA. The human connexin gene family of gap junction proteins : distinct chromosomal locations but similar structure. *Genomics* 1991; 10: 250-6.
6. Hennemann H, Kozjek G, Dahl E, Nicholson B, Willecke K. Molecular cloning of mouse connexins 26 and -32 : similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur J Cell Biol* 1992; 58: 81-9.
7. Yu W, Dahl G, Werner R. The connexin43 gene is responsive to estrogen. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 255: 125-32.
8. Neuhaus IM, Dahl G, Werner R. Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene* 1995; 158: 257-62.
9. Sáez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg EL, Greengard P, Bennett MVL. cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2473-7.
10. Meda P, Pepper M, Traub O, Willecke K, Gros D, Beyer E, Nicholson B, Paul D, Orci L. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* 1993; 133: 2371-8.
11. Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 1993; 74: 1065-77.

La plupart des cellules animales en contact peuvent, en effet, échanger des informations par le biais d'interactions entre molécules de surface appartenant à la famille des connexines [1], et qui forment les jonctions de type *gap*. Les connexines sont des protéines intégrales de la membrane plasmique qui sont synthétisées pratiquement par chaque type cellulaire, quelle que soit la position d'un organisme multicellulaire dans la phylogénèse du monde animal [2]. Chez les vertébrés, les rares cellules ne produisant pas de connexines sont les cellules musculaires striées adultes, quelques neurones, les spermatozoïdes et les cellules circulantes du sang. A ce jour, au moins treize connexines (Cx) distinctes [3, 4] ont été identifiées chez les mammifères (*Tableau 1*).

Les gènes des connexines

Chez les mammifères, chaque connexine est codée par un gène distinct [3, 4]. Cependant, l'existence d'une liaison génétique entre connexines de structure primaire différente, suggère que les treize gènes des connexines dérivent d'une seule séquence originale, encore indéterminée, qui a subi au moins deux duplications [2, 3] juste avant ou au tout début de l'évolution des vertébrés (*figure 1*). Ces duplications ont permis la divergence de deux groupes de protéines. Le groupe α comprend les connexines comportant une boucle cytoplasmique courte, alors que le groupe β comprend les connexines comportant une boucle cytoplasmique longue.

Tous les gènes des connexines étudiés à ce jour montrent une structure similaire [5, 6] comportant deux exons séparés par un intron (*figure 1*). Le premier exon est petit et code pour une séquence 5' non transcrite. L'intron varie en longueur d'un gène à l'autre mais, dans tous les cas, contient un site accepteur d'épissage en amont du codon de début de traduction. Le deuxième exon est plus grand et contient en un bloc toute la séquence codant pour la protéine. Les éléments régulateurs des régions promotrices varient d'un gène à l'autre, expliquant sans doute l'expression différentielle de diverses connexines. La région promotrice de

la Cx43 contient une boîte TATA, des sites AP-1 et AP-2 et des séquences de liaison d'œstrogènes [7]. La région promotrice de la Cx32 comporte au moins deux promoteurs (*figure 1*). L'un, localisé juste en amont du premier exon, est fonctionnel dans les épithéliums glandulaires et le système nerveux central; l'autre, localisé à l'extrémité 3' du long intron, est fonctionnel dans les systèmes nerveux central et périphérique [8]. L'existence de ces deux promoteurs et d'un site unique accepteur d'épissage permet d'envisager la production de deux transcrits distincts et donc une expression différentielle de cette connexine dans divers tissus, sous contrôle de divers facteurs de transcription, encore non identifiés.

La plupart des gènes des connexines sont dispersés sur des chromosomes différents [5, 6]. Dans l'espèce humaine, les gènes codant pour les Cx 26, Cx 32 et Cx 43 se trouvent respectivement sur les chromosomes 13, X, et 6, et il y a un pseudogène pour la Cx43 sur le chromosome 5. Cependant, les gènes codant pour les Cx37 et Cx40 se trouvent tous les deux sur le chromosome 1, et ceux codant pour les Cx26 et Cx46 sur le chromosome 13, suggérant un partage possible de séquences régulatrices communes. Il n'y a pas de lien immédiat entre ce regroupement chromosomique et l'expression des connexines. Ainsi, alors que la Cx37 et la Cx40 sont généralement produites dans les mêmes tissus, les Cx26 et Cx46 ne le sont pas.

Les connexines

Toutes les connexines ont leurs extrémités amino- et carboxyterminales dans le cytoplasme et comportent quatre portions hydrophobes reliées les unes aux autres par une boucle cytoplasmique et deux boucles intercellulaires (*figure 2*) [1-3]. Les quatre portions hydrophobes ont une topologie d'hélices α arrangées parallèlement. La troisième portion intramembranaire comporte des résidus polaires, acides et basiques, qui entourent le canal hydrophile de chaque connexon [3]. Les connexines de différentes espèces montrent une structure primaire particulièrement bien conservée, surtout au niveau de l'extrémité aminoterminal, des seg-

Tableau I						
CARACTÉRISTIQUES DES CONNEXINES DES MAMMIFÈRES						
Nom	Gène	Taille de l'ARNm (kb)	Poids moléculaire de la protéine (kDa)	Peut former des canaux avec Cx	Ne peut pas former des canaux avec Cx	Distribution cellulaire*
Cx26	β2	2,7	26,5	26, 32, 46, 50	31, 31,1, 37, 40, 43, 45	Hépatocytes, cellules sécrétrices de glandes endocrines et exocrines, certains kératinocytes, cellules de l'épithélium intestinal
Cx30	β6		30,3	?	?	?
Cx30.3	β5	3,2, 1,8	30,4	30,3	?	Cellules des blastocystes, certains kératinocytes
Cx31	β3	2,3, 1,7	31	31	26, 32, 37, 40, 43, 45	Certains kératinocytes, cellules des blastocystes, cellules du trophoectoderme placentaire
Cx31.1	β4	1,6	31,1	?	26, 31,1, 32, 43	Certains kératinocytes, cellules des épithéliums stratifiés
Cx32	β1	1,6	32	26, 32, 46, 50	31, 37, 40, 43, 45	Hépatocytes, cellules sécrétrices des glandes exocrines, certains neurones, oligodendrocytes, cellules de Schwann
Cx33	α7	2,3	32,9	?	33, 37, 43	Quelques cellules testiculaires
Cx37	α4	1,7	37,6	37, 40, 43, 45	26, 31, 32, 33	Certaines cellules endothéliales, certains kératinocytes, cellules musculaires cardiaques
Cx40	α5	3,5	40	37, 40, 45	26, 31, 32, 43, 46, 50	Certaines cellules endothéliales, cellules du blastocyste, cellules du système de conduction cardiaque
Cx43	α1	3,2	43	37, 43, 45, 46	26, 31, 32, 33, 40, 50	Cellules musculaires cardiaques, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices des glandes endocrines, certains kératinocytes
	α1 Pseudogène					
Cx45	α6	2,3	45	37, 40, 43, 45	26, 31, 32	Cellules musculaires cardiaques, cellules du blastocyste, cellules épithéliales du poumon, certains kératinocytes
Cx46	α3	2,8	45,6	26, 32, 43, 46, 50	40	Fibres du cristallin, cellules musculaires cardiaques
Cx50	α8	8,5	49,6	26, 32, 46, 50	40, 43	Fibres du cristallin, cellules épithéliales de la cornée

* Cette liste ne se veut pas exhaustive. Elle ne donne en fait que quelques exemples de cellules synthétisant chaque connexine, dans le but d'illustrer la distribution complexe de ces protéines.

RÉFÉRENCES

12. Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991; 115: 1357-74.
13. Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA. Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J Cell Biol* 1977; 74: 629-45.
14. White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 459-70.
15. Veenstra RD, Wang HZ, Westphale EM, Beyer EC. Multiple connexins confer distinct regulatory and conductance properties of gap junctions in developing heart. *Circ Res* 1992; 71: 1277-83.
16. Hooper ML, Subak-Sharpe JH. Metabolic co-operation between cells. *Int Rev Cytol* 1981; 69: 46-104.
17. Kohen E, Kohen C, Thorell B, Mintz DH, Rabinovitch A. Intercellular communication in pancreatic islet monolayer culture: a microfluorometric study. *Science* 1979; 204: 862-5.
18. Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 1978; 272: 501-6.
19. Sáez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MVL. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2708-12.
20. Meda P, Spray DC. Physiological roles of gap junctions. In : Hertzberg EL, ed. *Gap junctions advances in cellular and molecular biology*, vol. 18. Greenwich CT: JAI Press 1996 (sous presse).
21. Salomon D, Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res* 1986; 162: 507-20.
22. Bosco D, Soriano JV, Chanson M, Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of amylase release by individual acinar cells. *J Cell Physiol* 1994; 160: 378-88.
23. Mears D, Sheppard NF Jr, Atwater I, Rojas E. Magnitude and modulation of pancreatic β -cell gap junction electrical conductance *in situ*. *J Membr Biol* 1995; 146: 163-76.
24. Miller SM, Garfield RE, Daniel EE. Improved propagation in myometrium associated with gap junctions during parturition. *Am J Physiol* 1989; 256: C130-41.

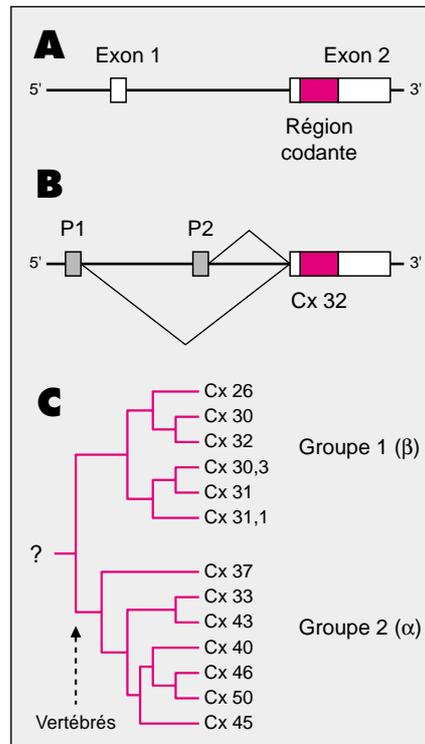


Figure 1. Structure et phylogénie des gènes des connexines. **A.** Tous les gènes des connexines étudiés jusqu'à présent ont une structure similaire. Ils comportent deux exons séparés par un intron. La région codante est entièrement contenue dans le deuxième exon. **B.** Le gène codant pour la Cx32 comporte au moins deux promoteurs, l'un (P1) fonctionnel au niveau des épithéliums glandulaires et du système nerveux central, l'autre (P2) au niveau des systèmes nerveux central et périphérique. Les lignes obliques noires indiquent que deux transcrits peuvent être synthétisés à partir de ce gène. **C.** La reconstitution d'un arbre phylogénétique suggère que l'ensemble des connexines dérive d'un ancêtre commun non encore identifié. Le groupe des connexines α s'est vraisemblablement distancé du groupe des connexines β au moment de l'apparition des vertébrés.

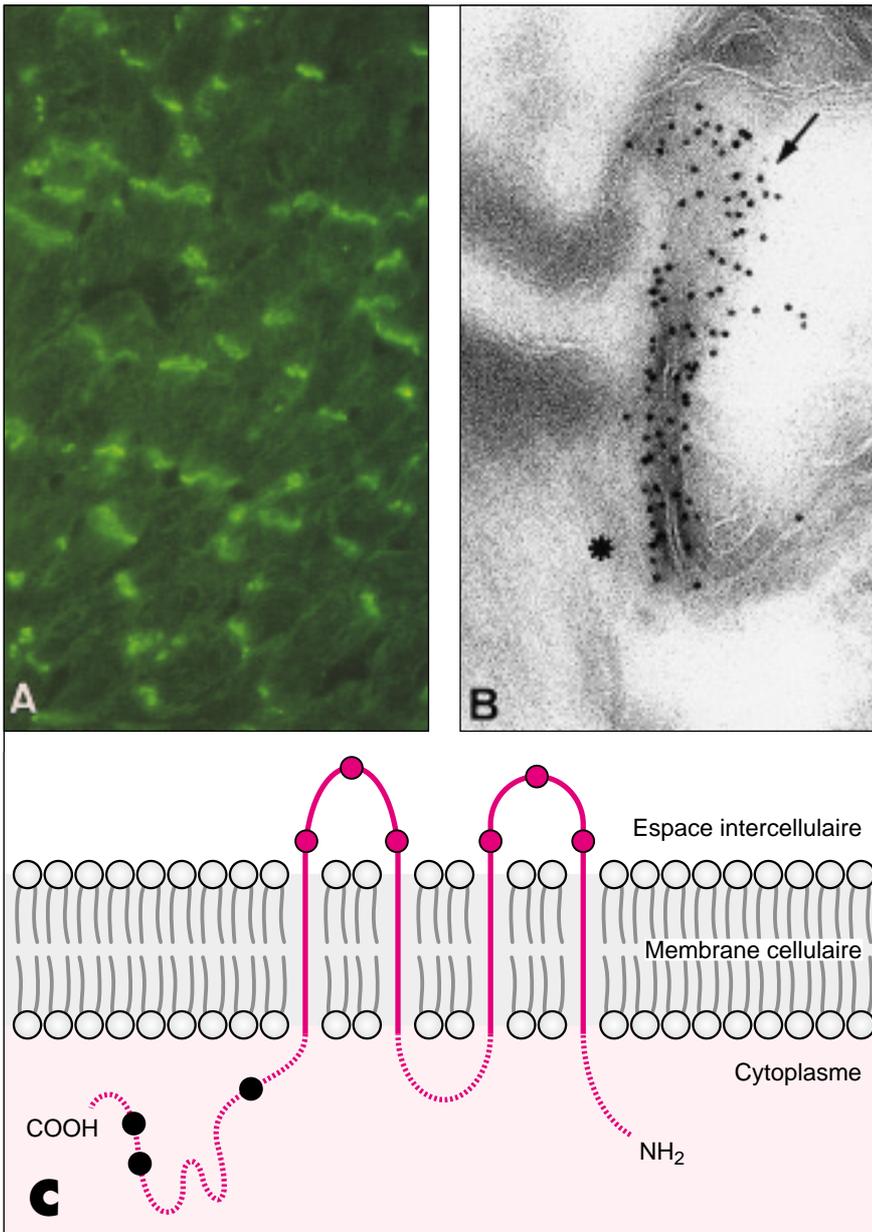
ments transmembranaires et deux boucles intercellulaires (30 % à 50 % d'analogie). Chacune de ces boucles contient, notamment, trois résidus cystéine qui ont conservé la même position au cours de l'évolution [2, 3]. Ces résidus forment des liaisons disulfure intramoléculaires qui pour-

raient être nécessaires pour stabiliser la structure tertiaire des portions intercellulaires, permettant l'alignement et l'interaction de connexons (voir figure 3) se faisant face.

Les treize connexines décelées chez les mammifères diffèrent considérablement entre elles en ce qui concerne la boucle cytoplasmique et l'extrémité carboxyterminale [1-3]. Cette dernière région comporte 18 acides aminés dans la Cx26 et 191 acides aminés dans la Cx46, expliquant que les poids moléculaires des connexines varient entre 26 et 50 kDa (Tableau I). La variabilité de l'extrémité carboxyterminale a permis la production d'anticorps spécifiques qui sont utilisés pour l'immunolocalisation des différentes isoformes (figure 2). Alors que l'on considère que les régions conservées des connexines sont importantes pour la formation et le fonctionnement des canaux jonctionnels, les régions variables sont probablement neutres. Certaines de ces régions pourraient cependant déterminer des propriétés spécifiques. Ainsi l'extrémité carboxyterminale de certaines connexines comporte des résidus phosphorylables absents dans d'autres isoformes [1, 3].

La phosphorylation de résidus sérine ou tyrosine est la seule modification post-traductionnelle qui ait été détectée dans les connexines [9]. Contrairement à de nombreuses autres protéines intégrales de la membrane cellulaire, les connexines ont une très courte demi-vie (entre 3 et 6 heures) [1-3], elles ne sont pas glycosylées et n'ont pas d'activité enzymatique. Plusieurs connexines comportent cependant des sites pouvant lier la calmoduline, suggérant une possible régulation par le Ca^{2+} cytoplasmique libre [2].

Pratiquement chaque type de connexine est présent dans plusieurs tissus, et, à de rares exceptions près, la plupart des cellules synthétisent plusieurs connexines [2, 10]. Certaines connexines sont produites par de très nombreux types cellulaires, alors que d'autres ont une distribution beaucoup plus restreinte (Tableau I). Au vu des propriétés spécifiques des canaux jonctionnels formés par différentes connexines, il est vraisemblable que la présence de multiples connexines soit nécessaire



la longueur détermine les différences de poids moléculaire des diverses connexines. Dans certaines isoformes, cette extrémité contient des résidus sérine et tyrosine (ronds noirs) phosphorylables.

pour assurer différentes fonctions cellulaires, une régulation différentielle de la communication intercellulaire et/ou pour établir des limites fonctionnelles entre divers territoires de cellules communicantes. Au sein d'un même tissu, l'expression native des gènes codant pour les connexines peut être modifiée dans des conditions très diverses, notamment au cours du développement, de changements du fonctionnement

physiologique ou pathologique. De plus, diverses connexines peuvent être réglées différemment dans une même cellule et, à l'inverse, une même connexine peut être réglée différemment dans différents types cellulaires [2].

Les connexons

Avant d'atteindre la membrane cellulaire, les connexines s'assemblent par

groupes de six molécules pour former des structures tubulaires creuses, appelées connexons (figure 3). Contrairement à ce qui se passe pour la plupart des autres protéines intégrales de la membrane, cette oligomérisation survient au niveau d'un compartiment distal de l'appareil de Golgi [11].

Les connexons sont ensuite incorporés, après la fusion de vésicules golgiennes avec la membrane plasmique,

RÉFÉRENCES

25. Warner A. Gap junctions in development – a perspective. *Semin Cell Biol* 1992; 3: 81-91.
26. Pepper MS, Montesano R, El Aoumari A, Gros D, Orci L, Meda P. Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. *Am J Physiol* 1992; 262: C1246-57.
27. Vozzi C, Ullrich S, Charollais A, Philippe J, Orci L, Meda P. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol* 1995; 131: 1561-72.
28. Stutenkemper R, Geisse S, Schwarz HJ, Look J, Traub O, Nicholson BJ, Willecke K. The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin32 and connexin26 but very low expression of connexin43. *Exp Cell Res* 1992; 201: 43-54.
29. Meda P. Junctional coupling of pancreatic β -cells. In: Huizinga JD, ed. *Pacemaker activity and intercellular communication*. Boca Raton: CRC Press, 1995: 275-91.
30. Meda P, Perrelet A, Orci L. Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J Cell Biol* 1979; 82: 441-8.
31. Meda P, Bosco D, Chanson M, Giordano E, Vallar L, Wollheim C, Orci L. Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* 1990; 86: 759-68.
32. Chanson M, Orci L, Meda P. Extent and modulation of junctional communication between pancreatic acinar cells *in vivo*. *Am J Physiol* 1991; 261: G28-36.
33. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Lowell Langille B, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 1995; 267: 1831-4.
34. Berghoffen J, Scherer SS, Wang S, Oronzi-Scott M, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262: 2039-42.

dans des régions membranaires qui ne participent pas à des contacts intercellulaires [12]. Chaque connexon traverse alors complètement la double couche lipidique de la membrane, exposant une de ses extrémités dans le cytoplasme et l'autre dans l'espace intercellulaire. La portion centrale de chaque connexon comporte un espace hydrophile de 2 à 4 nm de diamètre (figure 3) qui constitue la moitié d'un canal jonctionnel [13]. Vraisemblablement, ce demi-canal est fonctionnellement fermé jusqu'à ce que l'extrémité intercellulaire des connexons soit isolée de l'espace environnant. Dans le cas contraire, une rapide dialyse cytoplasmique s'établirait inévitablement.

Les canaux jonctionnels

Lorsqu'un contact intercellulaire est établi, les connexons d'une cellule s'alignent bout à bout avec ceux de la cellule voisine, établissant un canal hydrophile continu long d'environ 10 nm [13]. Ce canal jonctionnel met en communication directe le cytoplasme des deux cellules en contact, par delà l'espace intercellulaire (figure 3).

La reconnaissance entre connexons opposés est déterminée par la structure de leurs domaines intercellulaires et par le type de connexine. Toutes les connexines natives sont capables de former des canaux jonctionnels en interagissant avec des molécules du même type, mais elles ne le font pas systématiquement [14] lorsqu'elles interagissent avec des molécules d'un type différent (Tableau I). La compatibilité de différentes connexines semble spécifiée par la structure du deuxième domaine intercellulaire [14] et par leur environnement. En effet, les molécules d'adhérence cellulaire, l'état de glycosylation d'autres protéines de surface, la composition en lipides de la double couche membranaire et la concentration cytoplasmique des ions Ca^{2+} et H^+ influencent l'assemblage des canaux intercellulaires [2]. La liaison entre connexons est maintenue par des interactions hydrophobes [12] qui doivent être suffisamment fortes pour isoler le canal jonctionnel de l'espace intercellulaire. Lorsque cet isolement est établi, les canaux jonctionnels s'ouvrent

progressivement avant d'atteindre leur conductance et perméabilité maximales [2].

Les canaux jonctionnels se différencient des autres canaux membranaires par plusieurs caractéristiques particulières. Ils sont formés obligatoirement par deux cellules, chacune contribuant pour une moitié du canal. Malgré une conductance ionique d'amplitude comparable à celle d'autres canaux membranaires et variant de 35 à 200 pS selon le type de connexine, ils sont perméables à presque tous les ions, particulièrement aux cations [2]. Ils sont également perméables à de très nombreuses molécules d'un poids moléculaire inférieur à 900 Da et d'un diamètre maximal d'environ 1,5 nm [2]. Ces propriétés varient sensiblement selon le type de connexine et son éventuelle modification post-traductionnelle [2, 15]. Généralement, les canaux formés par des connexines hétérologues ont une conductance et une perméabilité moindres que celles des canaux formés par des connexines du même type. De plus, dans ce dernier cas, la conductance électrique et sa régulation par la différence de potentiel peuvent ne pas être symétriques [14], établissant éventuellement une communication jonctionnelle préférentielle dans une direction.

La régulation des canaux jonctionnels est multifactorielle et diffère selon le type de connexine, le type de cellule et son état d'activité [2]. Expérimentalement, elle peut être obtenue par des anticorps, des alcanols (alcane comportant un groupe hydroxyle), des anesthésiques et des oligonucléotides antisens. Dans des conditions physiologiques, elle pourrait être assurée par le niveau de Ca^{2+} intracellulaire libre et/ou la calmoduline, le pH cytosolique, plusieurs hormones, neuromédiateurs et facteurs de croissance, des métabolites de l'acide arachidonique, les protéines kinases A et C, des phosphatases, des oncogènes et certains morphogènes [2].

Les jonctions de type gap

Le contact entre deux cellules entraîne, en quelques minutes, la concentration de canaux jonctionnels dans des régions où les membranes plasmiques sont étroitement juxtaposées.

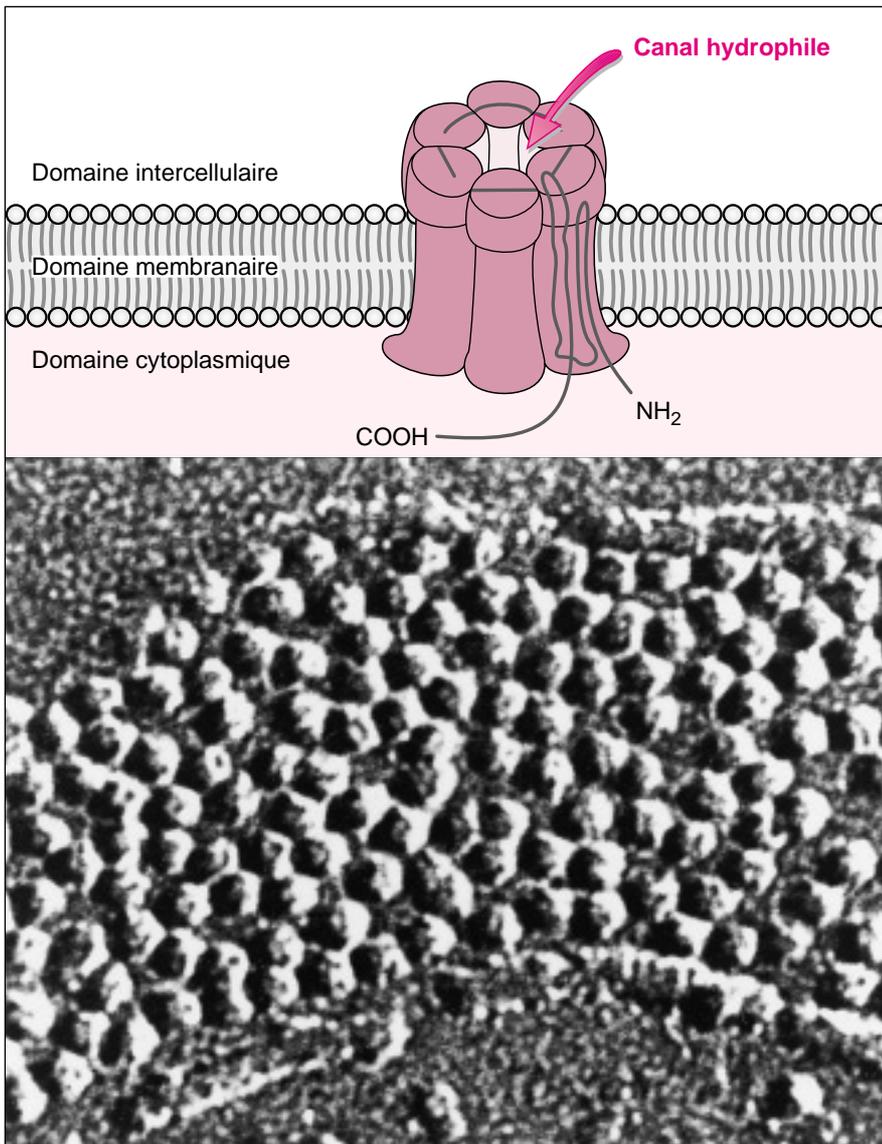


Figure 3. **Organisation d'un hémicanal jonctionnel.** Haut. Au cours de leur transit vers la membrane cellulaire, les connexines s'assemblent entre elles par groupes de six pour former une structure tubulaire creuse, appelée connexon. Au centre de chaque connexon, les connexines délimitent un espace hydrophile qui constitue la moitié d'un canal jonctionnel. Bas. A fort grossissement, les sous-unités formant la paroi des connexons ainsi que l'orifice du canal hydrophile central sont visibles dans des répliques de cryo-décapage.

Dans ces régions, l'espace extracellulaire est réduit à une fine fente de 1 à 2 nm [13], le *gap* anglo-saxon qui a déterminé la dénomination désormais usuelle de ces régions (figure 4). Il est maintenant établi que la synthèse de connexines est nécessaire et suffisante pour établir les jonctions de type *gap* et qu'il existe une relation obligatoire entre la présence de ces structures membranaires et celle

d'échanges intercellulaires directs d'ions et de molécules cytoplasmiques [1-3]. Ce type de communication cellulaire est aussi appelé couplage cellulaire ou jonctionnel.

Le couplage jonctionnel

Le passage d'ions d'une cellule à l'autre au travers de canaux jonctionnels est suggéré par le couplage élec-

trique de cellules voisines et par l'enregistrement d'un potentiel électrotonique, c'est-à-dire induit par une injection de courant dans une cellule, à distance du site d'injection. Le couplage est démontré par une mesure directe de conductance à l'interface de deux cellules dans des conditions de potentiel et de composition ionique intracellulaires imposées pour réduire les transitions d'ouverture-fermeture des autres types de canaux membranaires [2]. La conductance des canaux jonctionnels peut aussi être différenciée de celle des autres canaux membranaires par le fait que l'ouverture des canaux jonctionnels se fait simultanément dans deux cellules voisines et est bloquée par des alcanols [2]. Pratiquement tous les ions passent au travers des canaux jonctionnels [2]. La conductance anionique de ces canaux est plus ou moins constante. En revanche, leur conductance cationique varie selon le type de connexine [15].

L'échange intercellulaire de molécules cytoplasmiques au travers des canaux jonctionnels est le plus aisément démontré après injection dans une cellule de traceurs exogènes [2] ne pouvant franchir la membrane cellulaire (figure 5). D'autres approches ont montré que les canaux jonctionnels sont aussi perméables à un grand nombre de molécules endogènes, comprenant des nucléotides (dont l'AMPc), des acides aminés, des cofacteurs vitaminiques, des métabolites des phospho-inositides (IP₃...) et des sucres (glucose 6-phosphate...) [16-19]. Comme la plupart de ces molécules sont chargées négativement, leur passage au travers des canaux jonctionnels peut varier selon le type de connexine [15].

Dans tous les cas, le passage intercellulaire d'ions et de molécules au travers des canaux jonctionnels se fait par diffusion le long d'un gradient électrochimique [2]. Ce passage peut être très étendu. On évalue, par exemple, qu'environ 10⁶ molécules de la taille de l'AMPc pourraient être échangées en une seconde entre une centaine de cellules couplées. De plus, la spécificité d'appariement et de perméabilité de différentes connexines permet d'envisager des échanges jonctionnels sélectifs, soit se faisant dans une direction préfé-

RÉFÉRENCES

35. Fairweather N, Bell C, Cochrane S, Chelly J, Wang S, Mostacciolo ML, Monaco AP, Haites NE. Mutations in the connexin32 gene in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet* 1994; 3: 329-48.
36. Bruzzone R, White TW, Scherer SS, Fischbeck KH, Paul DL. Null mutations of connexin32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1994; 13: 1253-60.
37. Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. Mutations of the connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med* 1995; 332: 1323-9.
38. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishié H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-2.
39. Li Bi W, Parysck LM, Warnick R, Stambrook PJ. *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 725-31.
40. Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Kaiser LR, Albelda SM. Gap junctions play a role in the « bystander effect » of the herpes simplex virus thymidine kinase system *in vitro*. *Gene Ther* 1996; 3: 85-92.
41. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nature Genet* 1992; 2: 21-5.

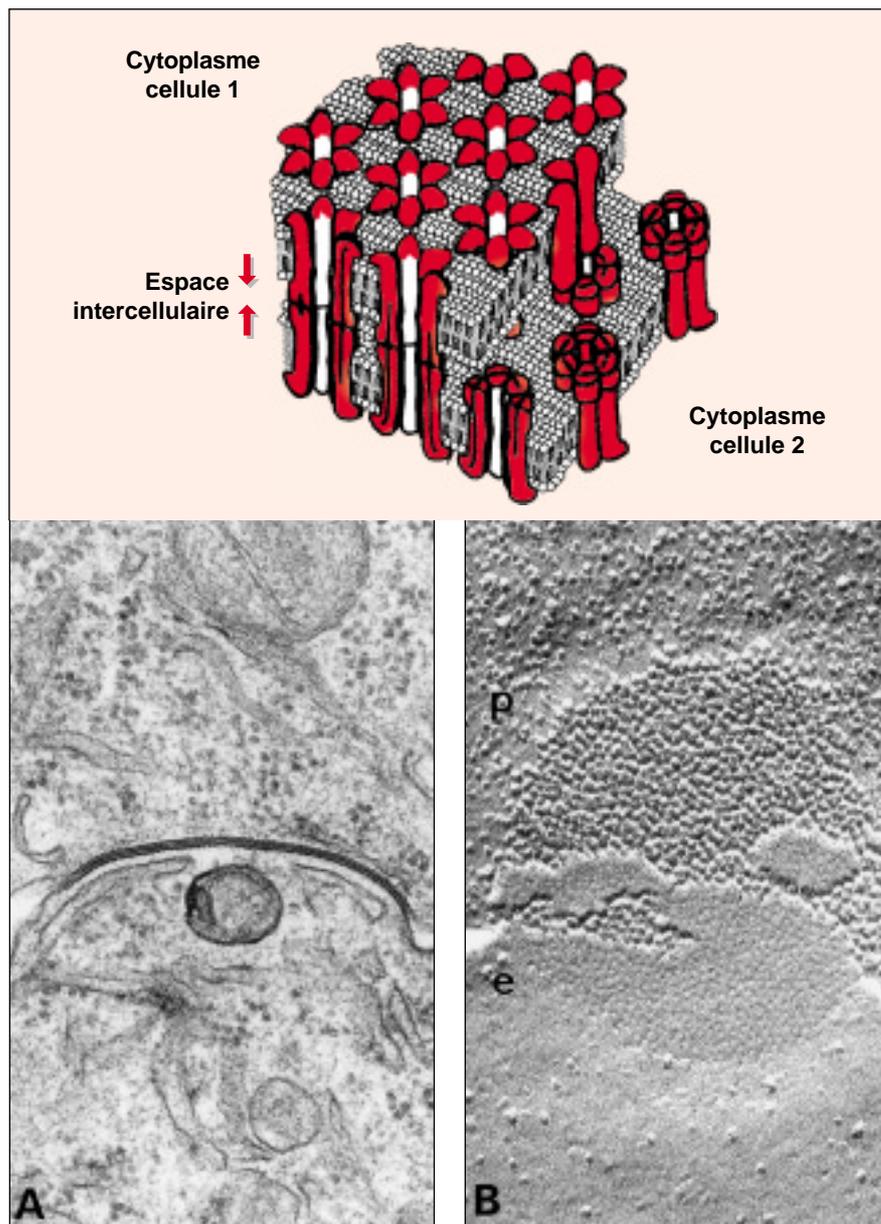


Figure 4. **Organisation d'une jonction intercellulaire de type gap.** Dans les régions dans lesquelles les membranes cellulaires de deux cellules voisines sont étroitement apposées, plusieurs connexons peuvent s'assembler pour constituer des jonctions de type gap. Dans ce cas, les connexons d'une cellule, dont une extrémité s'étend dans l'espace intercellulaire, interagissent avec l'extrémité correspondante des connexons de la cellule voisine. L'alignement de deux connexons opposés assure la formation d'un canal jonctionnel, qui met en communication les cytoplasmes des deux cellules adjacentes. **A.** En microscopie électronique, les jonctions de type gap sont vues comme des sites d'apposition étroite entre deux membranes cellulaires, dans lesquelles l'espace extracellulaire est réduit à une fine fente (le gap) d'environ 2 nm. **B.** Dans ces régions, le cryodécapage met en évidence une concentration de connexons sur les faces protoplasmiques (p) de la fracture. Les empreintes que ces structures laissent sur la face exoplasmique (e) de la fracture, indiquent que les connexons traversent de part en part chacune des deux membranes qui se font face.

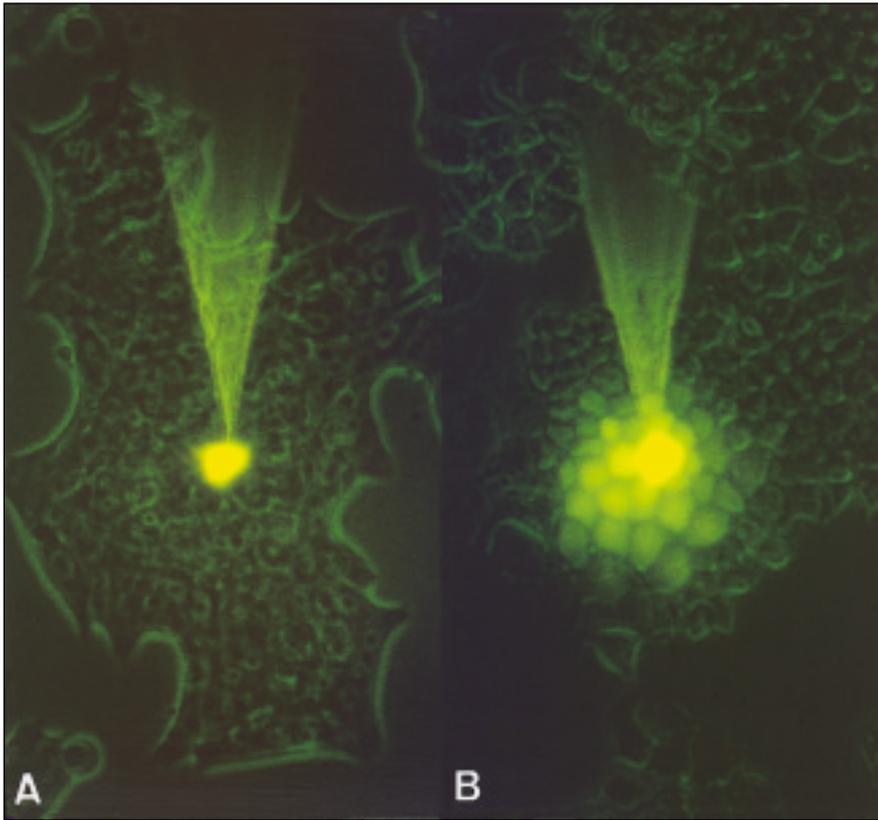


Figure 5. **Le couplage jonctionnel.** **A.** L'injection intracellulaire d'un traceur fluorescent non toxique, auquel la membrane cellulaire est imperméable, entraîne la rétention du traceur dans la cellule injectée lorsque celle-ci est dépourvue de canaux jonctionnels ou est connectée aux cellules voisines par des canaux fermés. **B.** En revanche, lorsque la cellule injectée est connectée aux cellules voisines par des canaux jonctionnels perméables, la même micro-injection est presque immédiatement suivie du passage du traceur depuis la cellule injectée dans les cellules voisines. Ce phénomène est appelé couplage intercellulaire ou jonctionnel. Les deux images montrent la micro-électrode remplie du Jaune de Lucifer qui a été utilisée pour l'injection de ligées cellulaires produisant de l'insuline.

rentielle (*m/s n° 2, vol. 10, p. 218*), soit permettant de discriminer entre divers seconds messagers [14, 15]. La demi-vie de ces molécules étant courte, de petites différences de perméabilité des canaux jonctionnels pourraient influencer considérablement sur le résultat de la transmission intercellulaire du signal.

Le couplage jonctionnel peut être rapidement modifié par l'ouverture ou la fermeture des canaux jonctionnels qui résulte vraisemblablement d'un changement conformationnel des connexines [2]. Dans les canaux fermés, celles-ci s'orientent obliquement par rapport à l'axe des connexons, réduisant ainsi le diamètre de l'espace

hydrophile central. Des modifications plus lentes, requérant des heures voire des jours, peuvent provenir d'un changement du nombre des canaux, par modification de leur synthèse ou de leur destruction [2].

Résultats du couplage jonctionnel

Par rapport aux autres formes de communication cellulaire, le couplage par canaux jonctionnels est particulier en ce qu'il permet d'équilibrer rapidement des gradients ioniques et moléculaires entre cellules voisines [2, 16, 20]. Dans un tel système, l'augmentation de la concentration

d'un ion ou d'une molécule cytoplasmique dans une cellule est rapidement suivie de son passage dans les cellules adjacentes. A l'équilibre, ce passage entraîne l'homogénéisation des concentrations d'ions et de métabolites de part et d'autre du canal (*figure 6*). Lorsque la concentration finale ainsi obtenue atteint le seuil permettant d'activer un mécanisme effecteur, un changement d'activité sera observé non seulement dans la cellule dans laquelle sont survenus initialement les changements ioniques et moléculaires, mais aussi dans toutes les autres cellules qui sont couplées avec elle. Ce modèle implique que le couplage jonctionnel pourrait être particulièrement avantageux dans les nombreux systèmes qui comprennent des cellules fonctionnellement hétérogènes [21, 22] (*figure 6*) ou fonctionnant de manière asynchrone. Via la diffusion intercellulaire de seconds messagers, le couplage jonctionnel pourrait compenser cette hétérogénéité en assurant le recrutement fonctionnel de cellules qui, autrement, n'auraient pu être activées [21, 22] et en coordonnant leur synchronisation [2, 23].

Parallèlement à leur rôle communicateur, les connexines pourraient également, par leur diversité, contrôler la mise en place des communications intercellulaires et le type de seconds messagers échangés, établissant ainsi des territoires de communication intercellulaire distincts, au sein d'un même tissu ou organe [14, 15].

Fonctions du couplage jonctionnel

La distribution quasi ubiquitaire des connexines suggère que ces protéines pourraient servir à de multiples fonctions (*m/s n° 9, vol. 3, p. 550*) [20]. Dans les systèmes excitables, comme les tissus nerveux et musculaires, de nombreuses observations indiquent que les communications jonctionnelles sont indispensables à la transmission et à la synchronisation de signaux électriques et mécaniques [24]. Un exemple particulièrement bien documenté est celui des cellules musculaires lisses de l'utérus qui, en dehors des périodes de travail précédant un accouchement, montrent une activité contractile faible, peu étendue et

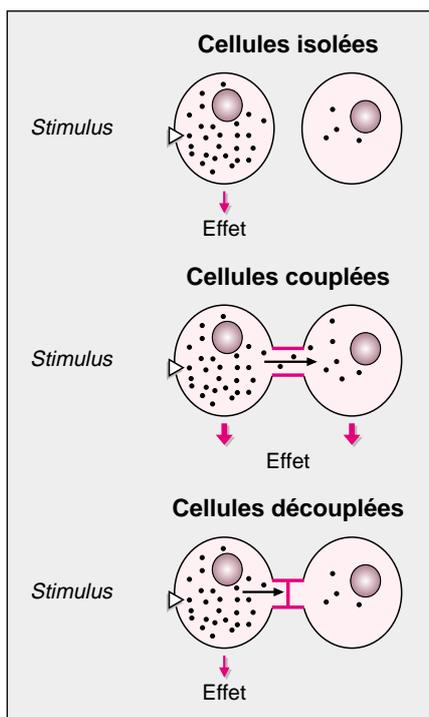


Figure 6. **Résultat du couplage jonctionnel.** Dans les systèmes comportant, soit plusieurs types cellulaires différents, soit des cellules fonctionnellement hétérogènes d'un seul type, seules certaines cellules répondent à un stimulus, parce qu'elles contiennent une quantité suffisante de seconds messagers (points noirs). L'établissement de canaux jonctionnels permet à ces cellules de transférer ces seconds messagers aux cellules voisines qui en sont déficientes. Ce transfert entraîne le recrutement fonctionnel des cellules receveuses et synchronise la réponse de l'ensemble des cellules couplées. La fermeture des canaux jonctionnels prévient ces effets, en empêchant les communications intercellulaires directes.

asynchrone dans diverses régions du myomètre. Dans cette situation, les connexines et le couplage jonctionnel ne sont pratiquement pas détectables. En revanche, juste avant l'accouchement, les contractions et les potentiels d'action s'intensifient, se transmettent sur de grandes distances et deviennent synchrones sur une vaste étendue du muscle utérin, en même temps qu'augmentent la synthèse des connexines et le coupla-

ge jonctionnel. L'association obligatoire de ces changements et leur contrôle par des taux d'œstrogènes, de progestérone et de prostaglandines qui sont observés au cours des phases terminales de la grossesse indique que les événements mécaniques et jonctionnels du muscle utérin sont vraisemblablement liés de manière causale et ont une importance physiologique [24].

Dans les systèmes en continu remodelage, comme la plupart des tissus embryonnaires, mais aussi l'épiderme ou l'endothélium vasculaire adultes, les changements de synthèse des connexines lors d'étapes déterminantes de la différenciation cellulaire, ainsi que dans des domaines fonctionnellement distincts d'un même tissu, suggèrent que les communications jonctionnelles participent aux mécanismes de différenciation, de migration et de croissance cellulaires, dont dépend la morphogenèse des tissus et des organes [25, 26]. Ce rôle a pu être confirmé par l'observation qu'une synthèse normale de connexines est nécessaire au maintien de caractères spécifiques de plusieurs types cellulaires [27, 28]. Il pourrait également expliquer les malformations observées *in vivo* après blocage expérimental des canaux jonctionnels. Des molécules morphogénétiques peuvent, en effet, affecter le couplage jonctionnel [25].

Dans les systèmes qui ne sont pas spécialisés dans la conduction électrique ou mécanique et qui fonctionnent, dans la plupart des situations physiologiques, sans changement de la prolifération et de la différenciation cellulaire, les fonctions du couplage jonctionnel sont moins claires. Dans plusieurs épithéliums sécréteurs, le couplage semble important pour la synthèse, le stockage et la libération de produits de sécrétion spécifiques (*m/s n° 9, vol. 3, p. 550 et n° 9, vol. 11, p. 1358*) [29, 30]. Par exemple, l'expression du gène de l'insuline, la biosynthèse de cette hormone et sa sécrétion par les cellules β du pancréas endocrine augmentent lorsque ces cellules forment des canaux jonctionnels [29, 31]. A l'inverse, de nombreuses lignées de cellules tumorales qui synthétisent et sécrètent l'insuline de façon anormale ne synthétisent pas de connexine permettant leur couplage jonctionnel [27].

La correction de ces défauts par transfection stable du gène codant pour la connexine native du pancréas endocrine améliore leurs caractéristiques sécrétrices, pour autant que le couplage intercellulaire soit restauré aux niveaux observés *in vivo* [27]. La stimulation de la sécrétion d'insuline *in vivo* est également associée à une augmentation du couplage jonctionnel [30] alors que des changements inverses sont observés dans des conditions inhibant la sécrétion d'insuline [31]. Le rôle favorable du couplage jonctionnel est vraisemblablement lié à l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules β qui, individuellement, montrent une très grande variabilité sécrétoire. Des observations analogues ont été faites à propos de la sécrétion d'amylase par les cellules acineuses du pancréas exocrine [32]. Dans ce système, cependant, les sécrétagogues naturels induisent une diminution du couplage et le blocage pharmacologique des canaux jonctionnels entraîne rapidement une augmentation de la sécrétion d'amylase. Ce comportement, opposé à celui des cellules β , pourrait être lié à la synthèse d'une connexine différente. Les cellules insulaires et acineuses du pancréas, comme d'ailleurs celles de nombreuses autres glandes endocrines et exocrines, synthétisent différenciellement deux isoformes distinctes de connexines [10], qui paraissent fonctionnellement incompatibles [14].

A ce jour, la démonstration rigoureuse qu'une fonction physiologique est spécifiquement assurée par le couplage jonctionnel n'a pu encore être fournie, entre autres parce que les observations à ce propos n'ont été faites qu'exceptionnellement *in vivo* [32]. A première vue, la grande variété des fonctions proposées pour les connexines est aussi surprenante. Cependant, l'échange intercellulaire de la plupart des seconds messagers au travers des canaux jonctionnels permet de concevoir que le couplage pourrait compenser aussi bien des déficits ioniques, métaboliques ou des systèmes effecteurs de certaines cellules que la distribution hétérogène de récepteurs ou d'innervation au sein d'un tissu. Le récent développement de souris transgéniques chez lesquelles l'expression génique d'une

connexine est altérée suggère que ces fonctions sont fondamentales, voire vitales pour l'organisme. Ainsi, l'inactivation biallélique d'un de ces gènes entraîne la mort des animaux au début de l'embryogenèse (Cx26) ou immédiatement après la naissance (Cx43) et, dans ce dernier cas, les animaux naissent avec d'importantes malformations [33].

Couplage jonctionnel et clinique

Au vu des importantes fonctions cellulaires attribuées aux connexines, il est concevable que des altérations du couplage jonctionnel puissent intervenir dans la pathogénie de diverses maladies. Des changements des connexines, des jonctions de type *gap* ou du couplage jonctionnel ont été observés dans des situations cliniques très diverses [20], bien que le rôle pathogénique de ces changements n'ait pas été démontré. Des observations récentes indiquent cependant que des mutations des connexines sont liées à au moins deux maladies humaines.

La première est la maladie de Charcot-Marie et Tooth, la plus commune des neuropathies périphériques héréditaires, qui est caractérisée par des atteintes motrices et sensitives distales, débutant le plus souvent dans l'enfance ou l'adolescence, et progressant lentement vers une atrophie musculaire, la faiblesse des membres, et une perte de sensibilité [34, 35]. Sous cette symptomatologie commune, on regroupe un ensemble de syndromes hétérogènes tant du point de vue physiopathologique que génétique. Le type 1 de la maladie est dû à une dégénérescence de la myéline des nerfs périphériques et dans l'une de ses formes (CMTX1), le *locus* génétique a été localisé sur une région du chromosome X, où se trouve, entre autres, le gène codant pour la Cx32 (*m/s n° 2, vol. 10, p. 222*). Les malades atteints par cette forme de la maladie présentent des mutations ponctuelles diverses de cette connexine pouvant survenir tout au long de la molécule [34, 35] et qui, pour le moins dans certains cas, ne permettent pas l'établissement de canaux jonctionnels compétents [36]. Ce qui est surprenant, c'est que la Cx32 des nerfs périphé-

riques ne relie pas des cellules adjacentes, mais relie entre elles des régions membranaires d'une même cellule de Schwann. La distribution de la connexine au niveau des régions où la myéline n'est pas compacte et laisse persister un peu de cytoplasme (nœuds de Ranvier et incisures de Schmitt-Lantermann), suggère que la Cx32 pourrait faciliter la diffusion de métabolites et seconds messagers qui transitent entre les régions périnucléaires et périaxoniales d'une cellule de Schwann.

La deuxième série d'observations a été faite sur des enfants atteints d'hétérotaxie viscéroatriale (syndrome d'Ivemark), un ensemble cliniquement et génétiquement hétérogène associant le plus souvent de sévères malformations cardiaques à l'absence de rate et à des formes plus ou moins complètes de *situs inversus* thoracique et abdominal. Ces enfants présentent des mutations ponctuelles de la Cx43, entraînant le plus souvent la substitution du résidu sérine 364 par un résidu proline [37]. Dans plusieurs de ces cas, une deuxième mutation est également détectable au niveau d'autres résidus phosphorylables de l'extrémité carboxyterminale de la connexine. Des expériences de transfection d'une connexine mutée en position 364 ont montré que cette protéine peut établir une communication jonctionnelle qui est, cependant, modulée anormalement en présence de protéines kinases dépendant de l'AMPc. L'impact *in vivo* de cette dysrégulation et ses rapports avec la morphogenèse anormale qui caractérise l'hétérotaxie doivent encore être définis. Il est intéressant de noter que tous les enfants hétérotaxiques présentent une sténose ou une atrésie de l'artère pulmonaire, une malformation observée aussi chez les souris transgéniques dont l'expression du gène codant pour la Cx43 est supprimée [37].

Couplage jonctionnel et thérapeutique

Les observations précédentes soulignent l'intérêt d'envisager des moyens thérapeutiques permettant, soit d'agir de façon ciblée sur les jonctions de type *gap*, soit de profiter

de leur présence pour améliorer l'efficacité de traitements pharmacologiques ou génétiques.

La première stratégie vise à modifier le fonctionnement et/ou le nombre des canaux jonctionnels, dans le but d'influencer une fonction cellulaire qui en serait dépendante. Un grand nombre de molécules endogènes (hormones, facteurs de croissance, neurotransmetteurs, AMPc...) qui peuvent, soit modifier rapidement la conductance ou la perméabilité des canaux jonctionnels, soit induire des changements à plus long terme de leur formation ou dégradation, pourraient être utiles dans ce but [2]. A ce jour, cependant, l'utilisation de ces molécules est compliquée par leurs effets pléiotropes qui varient selon le type de connexine, de tissu et de situation physiologique, et par la distribution tissulaire complexe des connexines. Toutefois, l'existence de plusieurs promoteurs et de sites régulateurs distincts sur les gènes des connexines [6-8] devrait permettre l'utilisation de facteurs de transcription spécifiques capables de moduler sélectivement l'expression d'isoformes au niveau de cellules cibles particulières.

La deuxième stratégie vise à utiliser les canaux jonctionnels natifs pour faciliter la diffusion de facteurs (médicaments, par exemple) qui auraient pu n'atteindre que quelques régions d'un tissu, ou n'être corrigés (ions endogènes, par exemple) que dans quelques cellules. Ce mécanisme, dénommé effet *bystander*, a été mis en évidence au cours de traitements antitumoraux combinant du ganciclovir, un médicament antiherpétique, à un transfert génique (*m/s n° 6, vol. 11, p. 919*) [38]. La stratégie de cette approche est d'infecter des cellules tumorales par des vecteurs rétroviraux recombinants porteurs du gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-*tk*). Les cellules infectées qui synthétisent cette enzyme sont tuées en présence de ganciclovir, un analogue de la guanosine qui est métabolisé par la thymidine kinase virale mais pas par celle des mammifères. Le métabolite phosphorylé d'environ 300 Da qui en résulte est incorporé dans les molécules d'ADN en formation, bloquant leur synthèse dans les cellules en mitose. Lors des premiers essais, on

s'est rendu compte que seulement 50 % des cellules tumorales pouvaient être infectées par les rétrovirus, mais que cela suffisait pour obtenir un effet sur la totalité de la tumeur [38]. Plusieurs études indiquent que ces résultats favorables sont vraisemblablement dus à la persistance de canaux jonctionnels grâce auxquels les cellules tumorales infectées transfèrent aux cellules adjacentes le métabolite phosphorylé du ganciclovir et ainsi, également, la sensibilité à ce médicament [39, 40].

Un mécanisme analogue peut être envisagé pour amplifier au sein d'un tissu l'effet bénéfique d'une correction par thérapie génique de seulement quelques cellules. Ainsi, moins de 10 % des cellules épithéliales respiratoires dérivées de patients atteints de mucoviscidose peuvent être transfectées en culture avec un ADNc codant pour le CFTR normal, la protéine membranaire qui règle le transport épithélial de Cl⁻ [41]. Bien qu'affectant directement peu de cellules, cette correction suffit à normaliser le transport ionique au niveau d'un feuillet épithélial. L'interprétation de ce phénomène, considérée la plus vraisemblable par les auteurs de ce travail, est que les cellules dont le transport de Cl⁻ a été normalisé sont capables d'échanger cet ion avec les cellules voisines, au travers des canaux jonctionnels [41]. En équilibrant les concentrations de Cl⁻ entre les cellules couplées, cet échange permet la correction fonctionnelle du transport épithélial au niveau du tissu entier, malgré la persistance de la mutation du CFTR dans la majorité des cellules des malades.

Conclusions et perspectives

Les trois décennies qui ont suivi l'identification des jonctions de type *gap* ont permis d'établir que ces structures représentent des concentrations de canaux membranaires pour la communication cellulaire, d'identifier les connexines constituant ces canaux et d'établir que la séquence et la topographie de ces protéines ont été préservées par la majorité des types cellulaires, tout au long de l'évolution des organismes pluricellulaires. Nous savons aujourd'hui également que les

canaux jonctionnels permettent des échanges sélectifs d'ions et de molécules cytoplasmiques qui sont contrôlés de façons diverses dans différents tissus. Parallèlement, nous commençons à apprécier les variations de ce schéma général, qui ont été acquises au cours de l'évolution, de la morphogénèse des tissus et de la différenciation de cellules spécifiques. L'analyse des séquences génomiques et des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de connexines spécifiques devrait permettre de comprendre les raisons de cette diversité.

A ce jour, les fonctions physiologiques des communications jonctionnelles et les mécanismes moléculaires qui lient les changements de ces communications à ceux de diverses fonctions cellulaires sont mal compris. De même, nous savons encore peu de choses sur les rapports hiérarchiques qui existent entre les communications jonctionnelles et les nombreux autres mécanismes qui coordonnent le fonctionnement des systèmes pluricellulaires. Les observations récentes réalisées sur des animaux transgéniques et dans certaines maladies humaines suggèrent cependant déjà qu'une synthèse adéquate de connexines et du couplage jonctionnel est fondamentale, sinon vitale, et pourrait, lorsqu'elle est perturbée, contribuer à la pathogénie de dysfonctionnements importants. Ces considérations soulignent l'intérêt de reconsidérer un certain nombre de situations cliniques, dont la pathogénie est encore peu comprise, sous l'angle d'une désorganisation du réseau de communications cellulaires normales. Elles lancent également le défi d'élaborer des stratégies thérapeutiques utilisant la synthèse des connexines et les communications jonctionnelles qu'elles permettent, pour agir sélectivement sur certaines populations cellulaires. Des essais encourageants en oncologie et en thérapie génique permettent d'envisager qu'il s'agit là d'une possibilité réalisable dans un avenir pas trop éloigné ■

TIRÉS À PART

P. Meda.

Summary

Connexins, junctional channels and cell-to-cell communication

The majority of cells of multicellular animals, from mesozoa to man, form gap junctions. These specialised domains of the cell membrane are assemblies of channels for direct cell-to-cell exchanges of cytoplasmic ions and molecules. Recent studies have shown that these channels are made of a multigene family of integral membrane proteins, which have been highly conserved throughout evolution and which are referred to as connexins. We have now a fair appreciation of the structure, topographic arrangement and tissue distribution of these proteins, as well as of the biophysical characteristics of the junctional channels they form. Also, the mechanisms whereby the intercellular communications (junctional coupling) which these channels mediate are being unravelled. These recent developments have not completely elucidated the physiological function(s) of junctional coupling in most cell systems. Interest in this question has been fostered by the recent observations that knockout of two distinct connexin genes leads to lethal abnormalities in transgenic mice, and that at least two human diseases are linked to connexin mutations.

Remerciements

Les recherches de mon groupe sont financées par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (subside 32-043086.95), l'Union Européenne (subside BMH4-CT96-1427) et la Juvenile Diabetes Foundation International (subside 195077).

**m/s ANNIVERSAIRE EN
VIDÉO-CASSETTES**