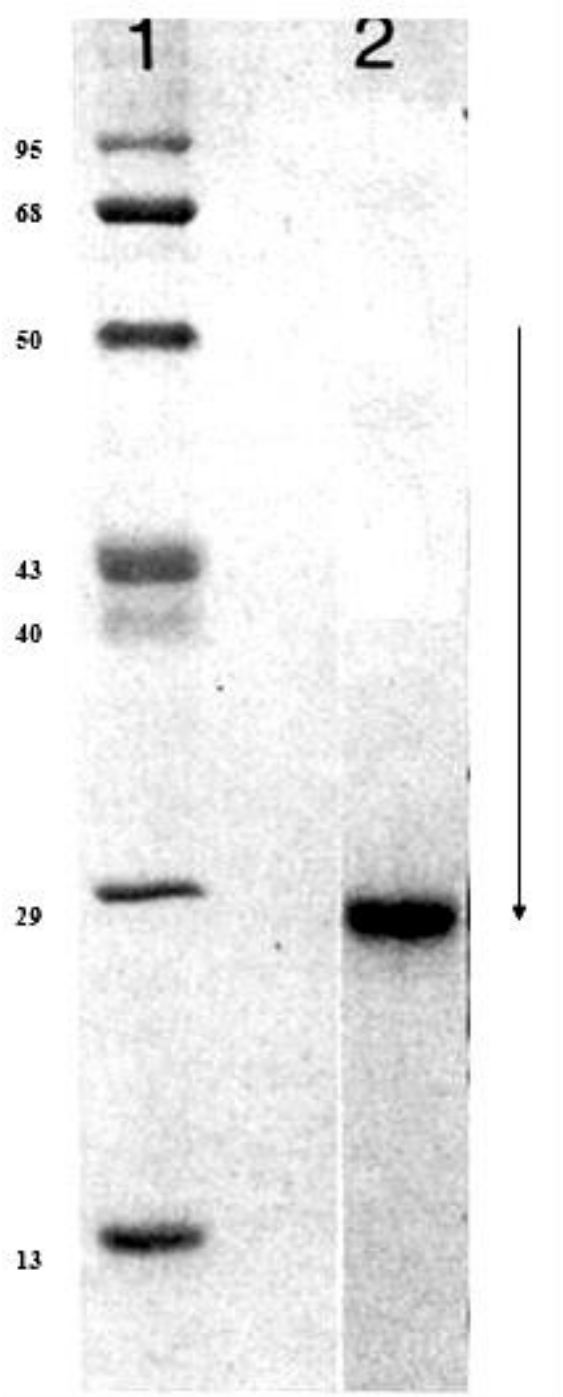
DM Etude de documents

L'objectif de cette étude est de dégager quelques propriétés structurales et fonctionnelles des jonctions intercellulaires présentes dans de nombreux tissus animaux, les jonctions gap.
Pour chacun des documents, vous identifierez le problème posé, le ou les objectifs des expériences, vous réaliserez une présentation des résultats ainsi que leur interprétation en soignant la concision. Une conclusion mettant en relation les informations saisies pourra être présentée.

Document 1
Électrophorèse des protéines des jonctions gap de cellules de foie

Des jonctions gap de cellules de foie (ou hépatocytes) de rat sont isolées et subissent un traitement salin.
Elles sont ensuite analysées par électrophorèse SDS-PAGE.



Piste 1 : protéines de masses moléculaires connues (masses moléculaires indiquées en kiloDaltons).

Piste 2 : protéines des jonctions gap

La flèche représente le sens de migration des protéines lors de l'électrophorèse.

(Paul D.L., 1986, J. Cell. Biol, 103, 123-134)

<u>Objectifs :</u> Connaître la structure des protéines constituant les jonctions gap. On réalise une électrophorèse en conditions dénaturantes et l'on compare avec des protéines de masses moléculaires connues (piste 1)

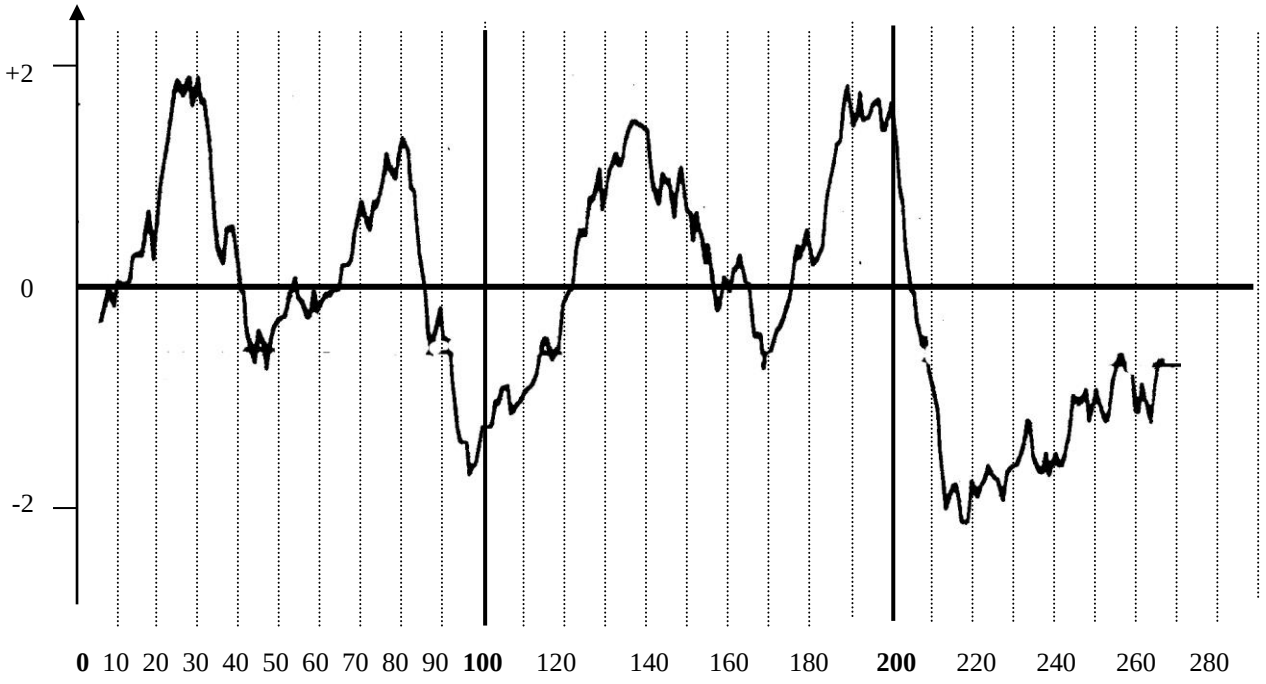
<u>Résultats et interprétation</u> :

On observe sur la piste 2 une seule bande ce qui signifie que les jonctions gap sont constituées par un seul type de protéine. En utilisant la piste 1, on déduit que la masse moléculaire de cette protéine est d'environ 29kD.

Document 2
Profil d'hydropathie des connexines des jonctions gap

Le séquençage d'une connexine de jonction gap d'hépatocytes de rat a été réalisé et le **profil d'hydropathie** de la protéine en a été déduit.

Le profil d'hydropathie de la connexine est présenté ci-dessous :



<u>L'index d'hydropathie</u> est reporté en ordonnées. <u>La position dans la séquence</u> est reportée en abscisses.

(Paul D.L., 1986, J. Cell. Biol, 103, 123-134)

<u>Objectif</u> : Le profil d'hydropathie ou d'hydrophobicité permet d'identifier des portions de la protéine à caractère hydrophobe (indice +) ou hydrophile (indice –) afin de déterminer des régions extramembranaire et intramembranaire de la connexine.

<u>Résultats et interprétations</u> : La connexine est constituée de 270 AA 4 régions se distinguent par un profil d'hydrophobicité positif et sont donc hydrophobes :
- de l'acide aminé 10 à 40, de l'acide aminé 65 à 85, de l'acide aminé 120 à 155 et enfin de l'acide aminé 175 à 205.
Ces 4 segments ou régions hydrophobes sont certainement des domaines intramembranaires de la connexine probablement des hélices alpha. Les autres régions sont donc extramembranaires.

Document 3
Localisation par rapport à la membrane plasmique des portions extramembranaires des connexines

(Milks L.M. et al., 1988, EMBO, 7, 10, 2967-2975)

On injecte à un lapin des peptides de synthèse, dont la séquence est identique à la portion de la connexine de cellule de foie de rat comprise entre l'acide aminé 6 et l'acide aminé 17. On prélève après quelques jours le sérum du lapin, d'où l'on extrait les anticorps spécifiquement dirigés contre le peptide de synthèse. Ces anticorps seront notés <u>anticorps A_{6-17}</u>.

On prépare ainsi d'autres anticorps, dirigés contre d'autres portions de la connexine :

- <u>anticorps A_{38-53}</u>, spécifiquement dirigé contre la portion de connexine comprise entre l'acide aminé 38 et l'acide aminé 53,
- <u>anticorps $A_{111-125}$</u>, spécifiquement dirigé contre la portion de connexine comprise entre l'acide aminé 111 et l'acide aminé 125,
- <u>anticorps $A_{217-234}$</u>, spécifiquement dirigé contre la portion de connexine comprise entre l'acide aminé 217 et l'acide aminé 234.

Ces anticorps sont tous marqués à l'or colloïdal, donc repérables en microscopie électronique sous la forme de particules sombres.

Par ailleurs, des jonctions gap intactes de cellules de foie de rat sont réparties en différents lots :

- 4 lots témoins,
- 4 lots incubés 2 heures à température ambiante, respectivement avec les anticorps marqués A_{6-17}, A_{38-53}, $A_{111-125}$ et $A_{217-234}$,
- 4 lots mis en présence d'une solution 8 M d'urée, à pH = 12 : ce traitement sépare les deux membranes plasmiques mises en contact par les jonctions gap, mais conserve l'intégrité de chaque membrane. Après lavage, chacun de ces 4 lots est incubé 2

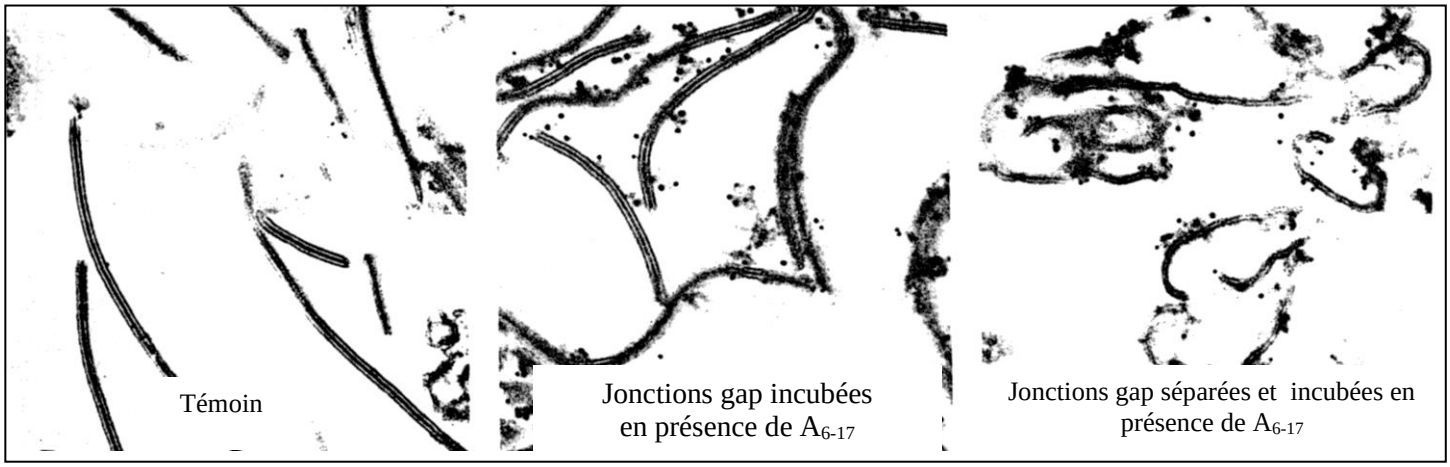
heures à température ambiante, respectivement avec les anticorps marqués A_{6-17}, A_{38-53}, $A_{111-125}$ et $A_{217-234}$.

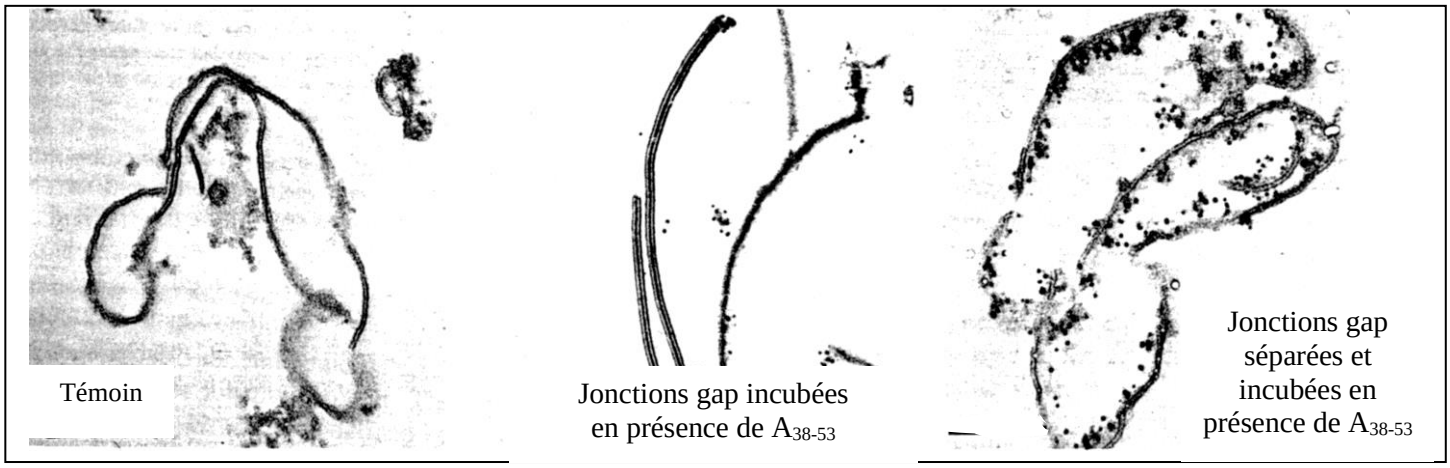
On observe ensuite les membranes plasmiques des différents lots, en MET, après déshydratation et fixation.

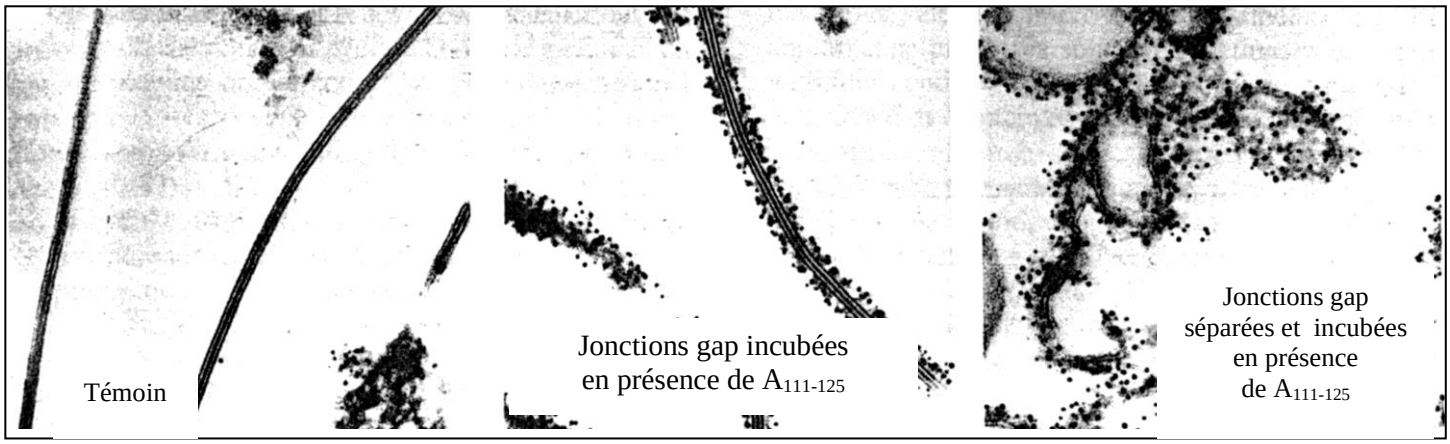
Les électronographies sont présentées sur la page suivante.

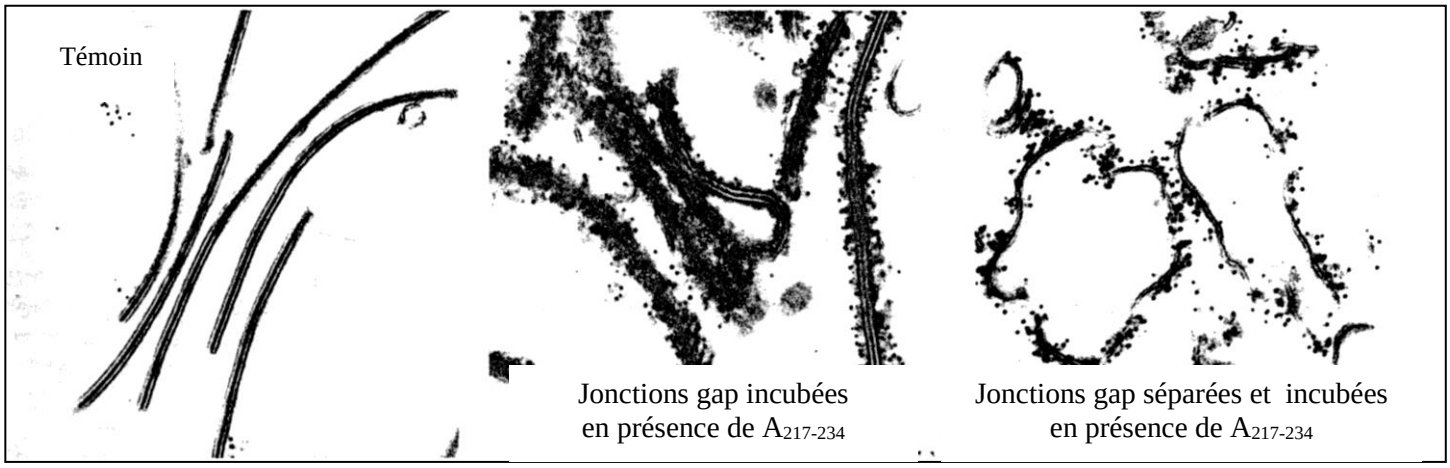
La **barre d'échelle** située en haut de page est valable pour tous les clichés et représente 100 nm.

Document 5 (suite)









<u>Objectif</u> : localiser les segments extramembranaires identifiés lors de l'étude du document 2, on utilise ici la technique de l'immunomarquage. Les différents anticorps marqués vont se fixer sur les régions qu'ils reconnaissent si celles-ci sont accessibles.

<u>Résultats et interprétations</u> :

Les témoins permettent d'identifier les deux membranes accolées des hépatocytes : 3 lignes sombres (segments hydrophiles) et 2 lignes claires avec une épaisseur totale d'une vingtaine de nm.

Avec les anticorps dirigés contre les régions A_{6-17} , on observe des marquages en nombre limité et pas de différence entre les membranes séparées ou non. Cette région est donc peu accessible, peut être se situe t'elle à l'intérieur du canal.

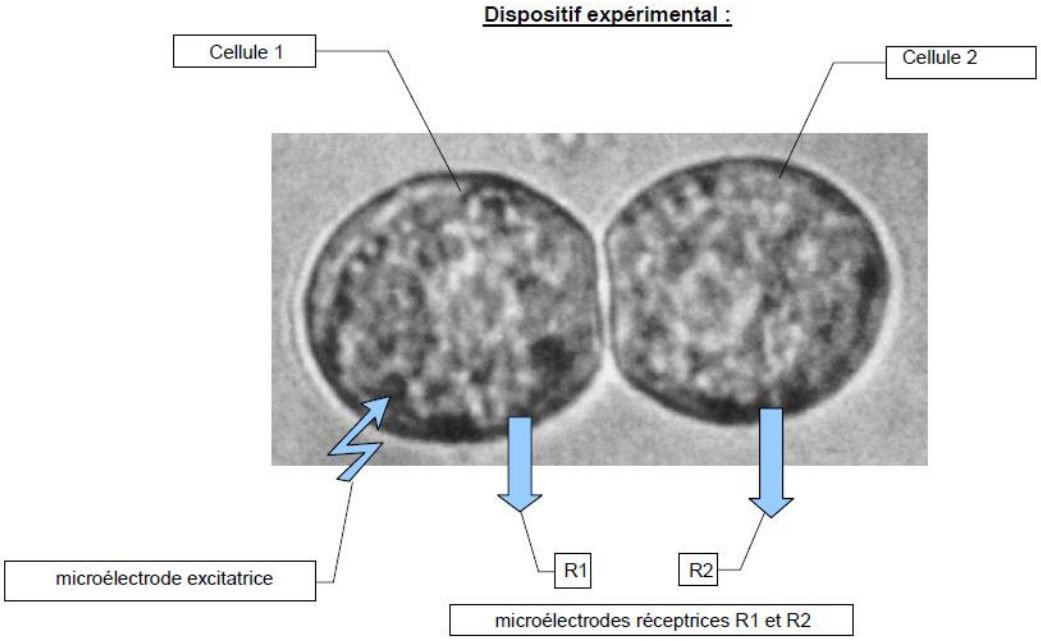
Avec les anticorps dirigés contre les régions A_{38-58}, on observe des marquages seulement lorsque les membranes sont séparées, cette région est donc située entre les deux membranes et joue vraisemblablement un rôle dans la reconnaissance entre deux connexines appartenant à deux cellules mitoyennes, c'est une région homophilique.

Avec les anticorps dirigés contre les régions $A_{111-125}$ et $A_{217-234}$, on observe de nombreux marquages que les membranes soient séparées ou pas ; on en déduit que ces deux régions sont orientées vers la face cytosolique.

Document 4
Étude de l'effet de l'ion calcium sur la perméabilité des jonctions gap.

Protocole expérimental :

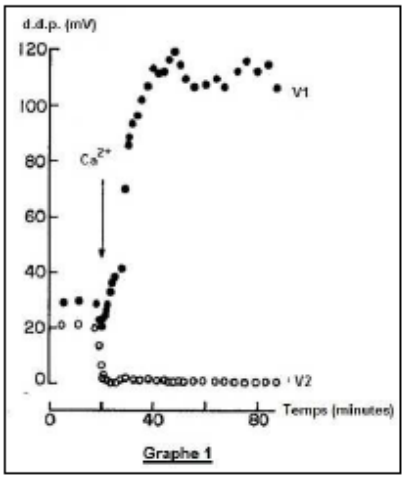
On utilise des hépatocytes (cellules de foie) qui possèdent entre elles des jonctions gap.
Des stimulations électriques brèves et répétées (durée 120 millisecondes - intensité 5.10^{-8} A) sont appliquées à une cellule 1 par l'électrode excitatrice.
Les électrodes réceptrices R_1 et R_2 enregistrent les différences de potentiel (en mV) V_1 et V_2 entre le cytosol de chaque cellule et le milieu extracellulaire (tensions notées V_1 pour la cellule 1 et V_2 pour la cellule 2).



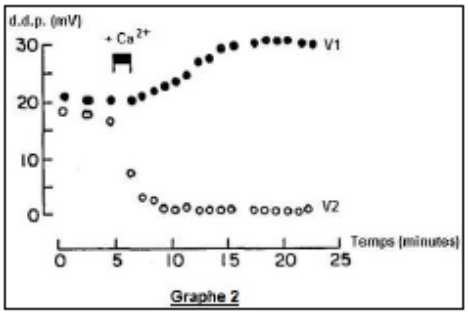
Expérience 1 :
A l'instant repéré par la flèche sur le graphe 1, la solution saline dépourvue de calcium qui baigne les cellules est remplacée par une solution contenant une concentration de Ca^{2+} libre égale à 0,5 mM.
Le graphe du haut montre les variations des différences de potentiel transmembranaire V_1 pour la cellule 1 (cercles sombres) et V_2 pour la cellule 2 (cercles clairs).

Expérience 2 :
3.10^{-14} mole d'ions Ca^{2+} sont introduits dans la cellule 1 par une micropipette dont la pointe se trouve à proximité de la membrane séparant les cellules 1 et 2. Le reste du dispositif expérimental est celui représenté ci-dessus. La période d'injection du calcium est indiquée sur le graphe 2 par la barre noire.

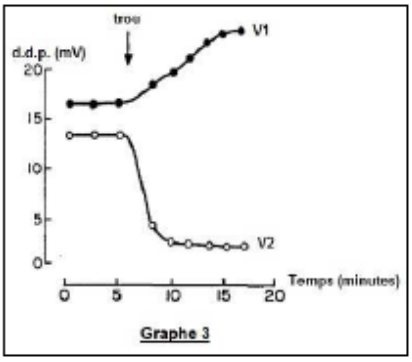
Expérience 3 :
A l'instant repéré par la flèche sur le graphe 3, un trou de quelques micromètres est pratiqué dans la membrane de la cellule 2. Les différences de potentiel transmembranaires sont mesurées dans une solution saline à 1,29 mM de Ca^{2+}.



Graphe 1



Graphe 2



Graphe 3

<u>Objectif</u> : On cherche à identifier le rôle du calcium sur la perméabilité des jonctions gap, on étudie pour cela les variations du potentiel de membrane de deux cellules connectées par les jonctions suite à des stimulations d'une des cellules.

<u>Résultats et interprétations :</u>

Sur l'expérience 1, avant le changement du milieu d'incubation, les ddp des cellules 1 et 2 sont proches. Le rapport V1/V2 est constant (0,8). Cette dépolarisation causée par la stimulation de la cellule 1 peut être à l'origine de mouvement d'ions dans la cellule 1, mouvements transmis à la cellule 2 par des jonctions communicantes ou jonctions gap.

L'introduction du calcium conduit à une multiplication par 4 de V1 et à une annulation de V2 ; le rapport V1/V2 devient nul. La dépolarisation de la cellule 1 n'est plus transmise à la cellule 2.

Hypothèse : en présence de calcium, les connexons formant les jonctions gap se ferment. Les ions, à 'origine de la dépolarisation, ne peuvent plus passer de la cellule 1 à la cellule 2. Les deux cellules sont découplées.

Sur l'expérience 2, une très faible quantité d'ions calcium est introduite non plus dans le milieu extra cellulaire mais directement dans la cellule. Les résultats sont identiques à ceux de l'expérience 1 ce qui confirme que c'est bien le calcium qui est responsable. Le calcium agit donc sur les connexons aussi bien du côté cytosolique que du côté extra cellulaire.

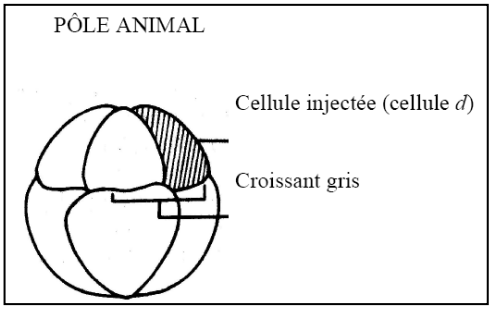
Sur l'expérience 3, le trou dans la membrane de la cellule 2 entraîne une chute de son potentiel membranaire vers 0, la cellule communique alors directement avec le milieu extra cellulaire. Mais cette altération de la cellule 2 est suivie d'une augmentation de la dépolarisation de la cellule1 comme dans les expériences précédentes. La solution de calcium perfusée est très concentrée : les ions calcium ont fermé les jonctions gap entre les cellules 1 et 2. De ce fait les perturbations ioniques qui affectent la cellule 2 lésée n'atteignent pas la cellule 1.

Ainsi le calcium semble contrôler les jonctions gap : une augmentation de la concentration en calcium que celle-ci soit intra ou extracellulaire entraîne une diminution de la perméabilité des jonctions.

Document 5

Les jonctions gap au cours du développement embryonnaire des amphibiens

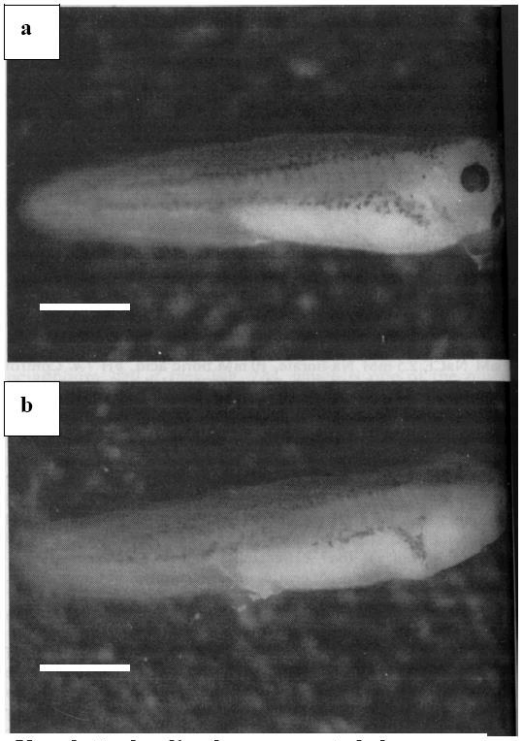
In vitro, des embryons de Xénope au stade 8 cellules reçoivent une injection d'anticorps anti-connexine dans l'un des blastomères (toujours le même, cellule d indiqué sur le document ci-contre).



Une injection de colorant Lucifer Yellow est effectuée dans la même cellule de ces embryons, ainsi que chez des témoins non traités. Ce colorant, de masse moléculaire 457 g/mol, ne franchit pas les membranes, sauf au niveau des jonctions gap.
La migration de ce colorant est suivie : elle est dite positive pour tout embryon chez lequel ce colorant est retrouvé en-dehors de la cellule d. Les résultats sont fournis ci-dessous.

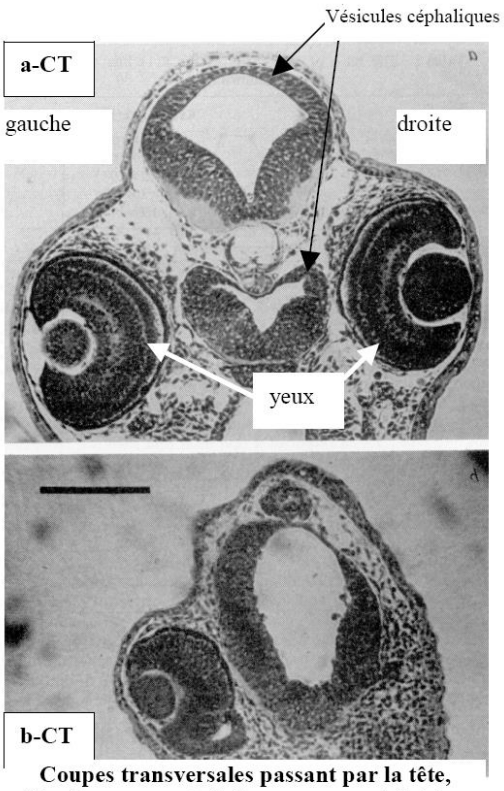
	Migrations positives du Lucifer Yellow à partir de la cellule *d* (en pourcentage du nombre d'essais)
Xénopes n'ayant subi aucune injection d'anticorps anti-connexine.	79
Xénopes ayant subi une injection d'anticorps anti-connexine (dans la cellule *d* ; au stade 8 cellules).	18

On compare l'organisation d'embryons traités et non traités par ces anticorps au stade bourgeon caudal



Vues latérales d'embryons au stade bourgeon caudal éclos.
a – embryon n'ayant subi aucune injection d'anticorps anti-connexine.
b – embryon ayant subi une injection d'anticorps anti-connexine au stade 8 cellules, dans la cellule *d*.

Barre d'échelle : 1 mm



Coupes transversales passant par la tête, d'embryons au stade bourgeon caudal éclos.
a-CT – embryon n'ayant subi aucune injection d'anticorps anti-connexine.
b-CT – embryon ayant subi une injection d'anticorps anti-connexine au stade 8 cellules, dans la cellule *d*. (même orientation que a-CT)

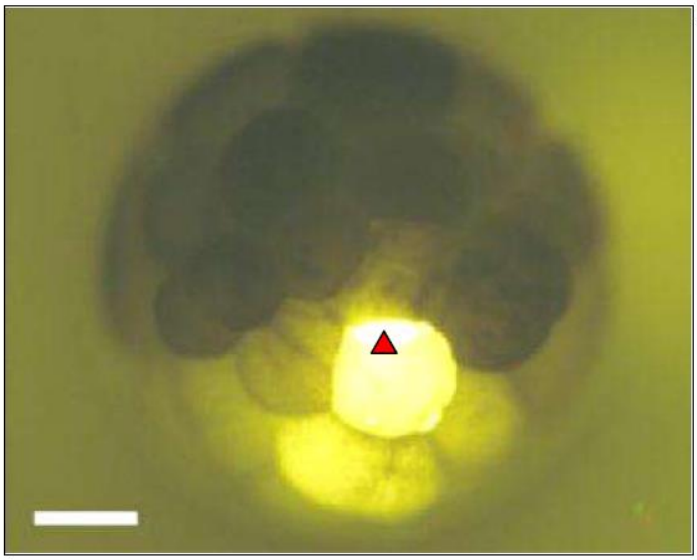
Barre d'échelle : 500 µm

Dans les années 1980, de nombreux tests de migration de Lucifer Yellow ont été réalisés sur des embryons de Xénope. Les observations, menées sur des embryons entiers, ont suggéré que les migrations étaient beaucoup plus efficaces au niveau de la future face dorsale des embryons qu'au niveau de la future face ventrale. Ces résultats suggéraient ainsi une forte asymétrie dans les communications *via* les jonctions gap, supposée être impliquée dans l'acquisition de la polarité dorso-ventrale de l'organisme.

En 2000, une équipe d'embryologistes reproduit les mêmes expériences d'injections sur des embryons précoces, mais affine les conditions d'observation : le suivi des migrations est réalisé sur des embryons entiers (comme précédemment), et sur des sections d'embryons. Les résultats ci-dessous sont obtenus après l'injection de Lucifer Yellow dans une cellule dorsale d'un embryon à 16 cellules juste avant la fin de la mitose aboutissant au stade 32 cellules : on s'attend donc à obtenir au moins 2 cellules marquées, la cellule ayant subi l'injection et sa cellule sœur.

Le **document 3B1** (ci-dessous) est une photographie de l'embryon observé dans sa totalité en microscopie optique, 30 minutes après l'injection du colorant dans la cellule dorsale marquée d'un triangle rouge.

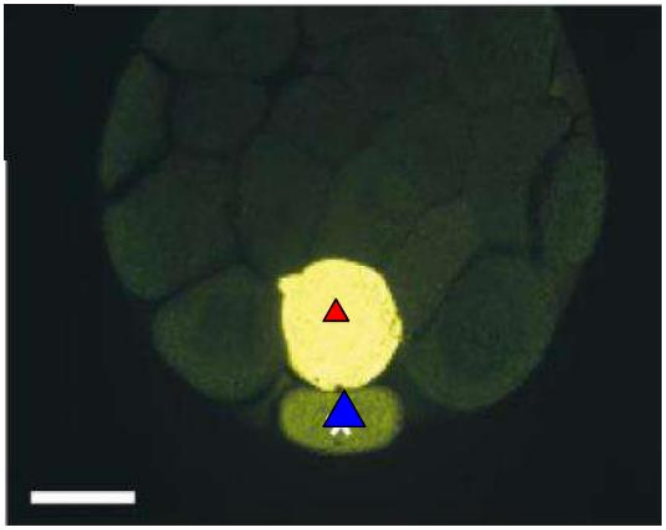
La barre d'échelle représente 200 µm.



Le **document 3B2** (ci-dessous) est une photographie d'une section de l'embryon, observé en microscopie optique, 30 minutes après l'injection du colorant dans la cellule dorsale marquée d'un triangle rouge.
Le triangle bleu indique la cellule-sœur de la cellule ayant subi l'injection.

70 sections différentes ont été réalisées, toutes passant par la cellule injectée. Elles fournissent toutes un résultat analogue à celui présenté sur ce document.

La barre d'échelle représente 200 µm.



<u>Objectifs :</u> On cherche ici à connaître le rôle des jonctions gap lors du développement embryonnaire et identifier le stade ou elles se mettent en place lors du développement.

<u>Résultats et interprétations</u> :

Les anticorps anti-connexines bloquent le fonctionnement des connexines, ce tableau montre l'existence de connexons fonctionnels entre les cellules dès le stade 8 cellules.

Lorsque les connexines sont libres (sans anticorps), les connexons laissent bien passer le colorant LY. Lorsque l'anticorps est fixé sur les connexines, les connexons laissent moins bien passer le colorant LY.

On observe une nette altération du développement des embryons chez lesquels a eu lieu l'injection d'anticorps anti connexine. Sur la vue générale : taille normale mais pas d'œil droit chez l'embryon dont les jonctions gap ne sont plus fonctionnelles. De plus le plan de symétrie bilatérale n'est plus net. La cellule d a une grande importance pour le bon déroulement du développement embryonnaire. Cette importance repose en particulier sur le bon fonctionnement des jonctions gap, qui permettent le transfert de molécules informatives d'une cellule à une autre.

Sur le doc3B1 la cellule d est marquée ainsi que sa cellule sœur. La cellule-sœur est marquée, les données du doc B32 semblent indiquer des communications avec les cellules voisines.

Donc la cellule injectée semble avoir des communications avec sa cellule-sœur, mais aussi avec les cellules voisines.

Conclusion : les jonctions gap sont seulement sur des régions localisées de la membrane plasmique, et orientent les communications d'une cellule avec ses voisines

Conclusion : les jonctions gap sont constituées par une seule catégorie de protéine : les connexines. Elles interviennent précocement au cours du DE ce qui permet le développement harmonieux de l'organisme. La perméabilité des jonctions et donc la communication directe entre les cellules est diminuée en présence de calcium.