

plaques s'étendaient et se densifiaient, le courant électrique passant à travers les cellules augmentait également. Ces jonctions semblaient donc faciliter l'échange d'ions.

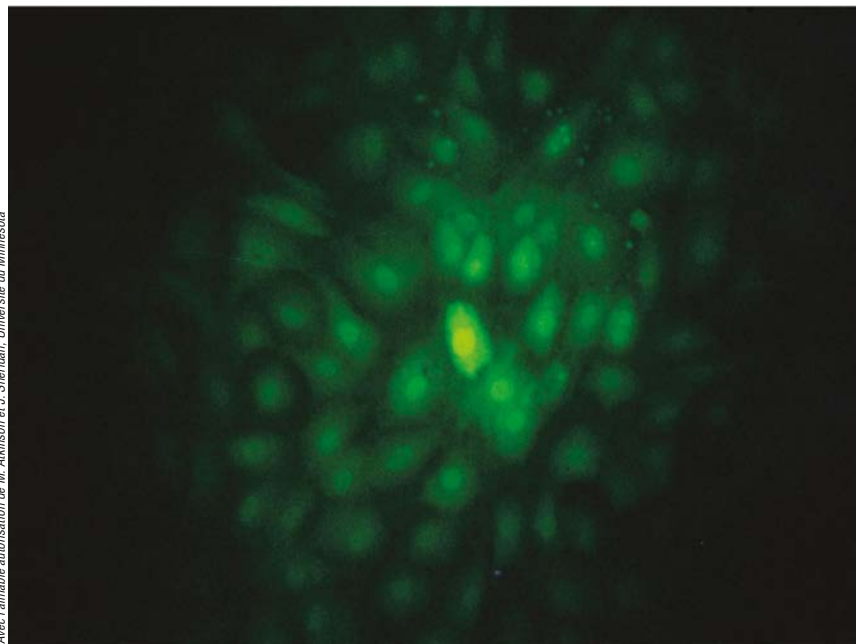
En détachant les membranes des cellules connectées pour les examiner de plus près, Ross Johnson et son équipe ont observé des sortes de grosses particules accumulées dans les plaques. Par la suite, ces particules se sont révélées être les canaux qui, assemblés, constituent les jonctions communicantes (voir l'encadré pages 48 et 49). Chaque canal est formé de protéines d'une même famille – les connexines – identifiée à la fin des années 1980.

Six connexines s'assemblent en un anneau nommé hémicanal. Ce dernier s'insère dans la membrane de la cellule, où il peut alors interagir avec un hémicanal d'une cellule voisine. Lorsque les connexines de ces deux hémicanaux complémentaires interagissent, elles forment un pore continu qui relie les cellules d'une telle façon que les cytoplasmes des deux cellules jointes – c'est-à-dire leurs contenus – communiquent directement. Ce pore est en fait un seul des centaines ou milliers de canaux qui constituent une jonction communicante.

L'édification de ces énormes conglomérats de communication est une entreprise colossale. Une seule jonction peut contenir 10000 canaux. Chaque canal étant composé de deux hémicanaux, une jonction compte donc environ 120000 connexines. Or le cœur, par exemple, est constitué à lui seul de milliards de cellules, dont chacune interagit avec plusieurs voisines *via* des jonctions communicantes. Une merveille de l'ingénierie moléculaire !

Plus remarquable encore, ces jonctions communicantes ne sont pas permanentes, ni même de longue durée, mais continuellement démontées et reconstruites. Il a été montré que la moitié des connexines d'une jonction communicante cardiaque sont remplacées toutes les deux heures. En une journée, chaque jonction communicante du cœur humain est très probablement dissociée et remplacée par des canaux nouvellement assemblés.

Au vu de la complexité de ces structures extraordinaires, il semblait vraisemblable que des systèmes de régulation existent, assurant le bon déroulement de leur construction et maintenant ainsi ininterrompues les communications entre cellules. Pour comprendre ces mécanismes



DU COLORANT FLUORESCENT INJECTÉ dans une cellule en culture (au centre) se propage rapidement de proche en proche *via* les canaux des jonctions communicantes qui relient chaque cellule à ses voisines.

de régulation, nous avons décidé – nous étudions tous trois les jonctions communicantes – de mettre en commun nos compétences ; nous voulions notamment comprendre comment l'assemblage et le démontage de ces jonctions sont contrôlés.

Les connexines, bandes Velcro cellulaires

Nous avons élaboré notre plan d'attaque en 1991, durant la pause-café d'une conférence sur les jonctions communicantes au Centre de conférence d'Asilomar, en Californie. L'un de nous (Paul Lampe) était alors postdoctorant dans le laboratoire de Ross Johnson, à l'université du Minnesota, où l'on s'intéressait désormais à la régulation de l'assemblage des jonctions communicantes. Le dernier membre de notre trio (Dale Laird), postdoctorant dans le laboratoire de Jean-Paul Revel, à l'Institut de technologie de Californie, venait de développer un ensemble d'anticorps se liant spécifiquement aux connexines. Ces anticorps nous permettraient d'interagir avec les connexines et de voir quelles parties de ces molécules sont essentielles pour l'assemblage des jonctions communicantes et leur activité.

Les anticorps de Dale Laird reconnaissaient une connexine particulière nommée Cx43. Le génome humain code

21 connexines, et chaque type cellulaire produit son propre « cocktail » de connexines. Les cellules cutanées, notamment, produisent pas moins de neuf connexines différentes. La protéine Cx43 est le membre le plus répandu de la famille. Elle est présente dans de nombreux organes, notamment la peau, le cœur, le cerveau, les poumons et les os.

Comme toutes les connexines, la protéine Cx43 est constituée de quatre segments transmembranaires qui l'ancrent dans la membrane cellulaire. Sa queue, qui pointe à l'intérieur de la cellule, contient divers éléments qui, nous l'avons montré plus tard, interviennent dans la régulation de son activité et de son assemblage en canaux puis en jonctions. Par ailleurs, en traversant plusieurs fois la membrane cellulaire, la protéine forme deux boucles qui ressortent dans l'espace entre les cellules. Certains anticorps que Dale Laird avait produits visaient ces segments extracellulaires.

Les boucles dépassant de la cellule, elles fonctionnaient peut-être comme des bandes Velcro accrochant les connexines les unes aux autres. Pour tester cette hypothèse, nous avons là encore séparé des cellules en culture, puis nous les avons mélangées à nouveau, mais cette fois en y ajoutant les anticorps de Dale Laird ciblant les boucles. Aucune jonction communicante ne s'est formée : d'aucune cellule testée, le colorant

injecté n'a diffusé vers les cellules voisines, et nous n'avons observé aucune plaque caractéristique du développement de jonctions communicantes. En se fixant sur les boucles, les anticorps avaient empêché les connexines d'une cellule de s'amarrer à celles de ses voisines.

Ces travaux montraient que la liaison des connexines est essentielle pour la construction des jonctions communicantes. Il s'agissait à présent d'observer les connexines en temps réel, au fil de leur activité au sein d'une cellule vivante. Toutefois, nous allions avoir besoin d'une autre technique pour y parvenir.

En 1994, nous nous sommes retrouvés tous trois à l'occasion d'une autre conférence – cette fois-ci à San Francisco. Au fil de discussions jusqu'au bout de la nuit sur les présentations auxquelles nous avons assisté, nous nous sommes passionnés pour la protéine fluorescente verte ou GFP (de l'anglais *green fluorescent protein*), un outil moléculaire qui a depuis été récompensé par un prix Nobel, en 2008. Une intervenante avait décrit comment elle avait lié ce marqueur fluorescent à sa protéine d'intérêt pour suivre ses trajets dans des cellules vivantes. Nous nous sommes donc demandé si nous pourrions utiliser la GFP pour suivre les déplacements des connexines.

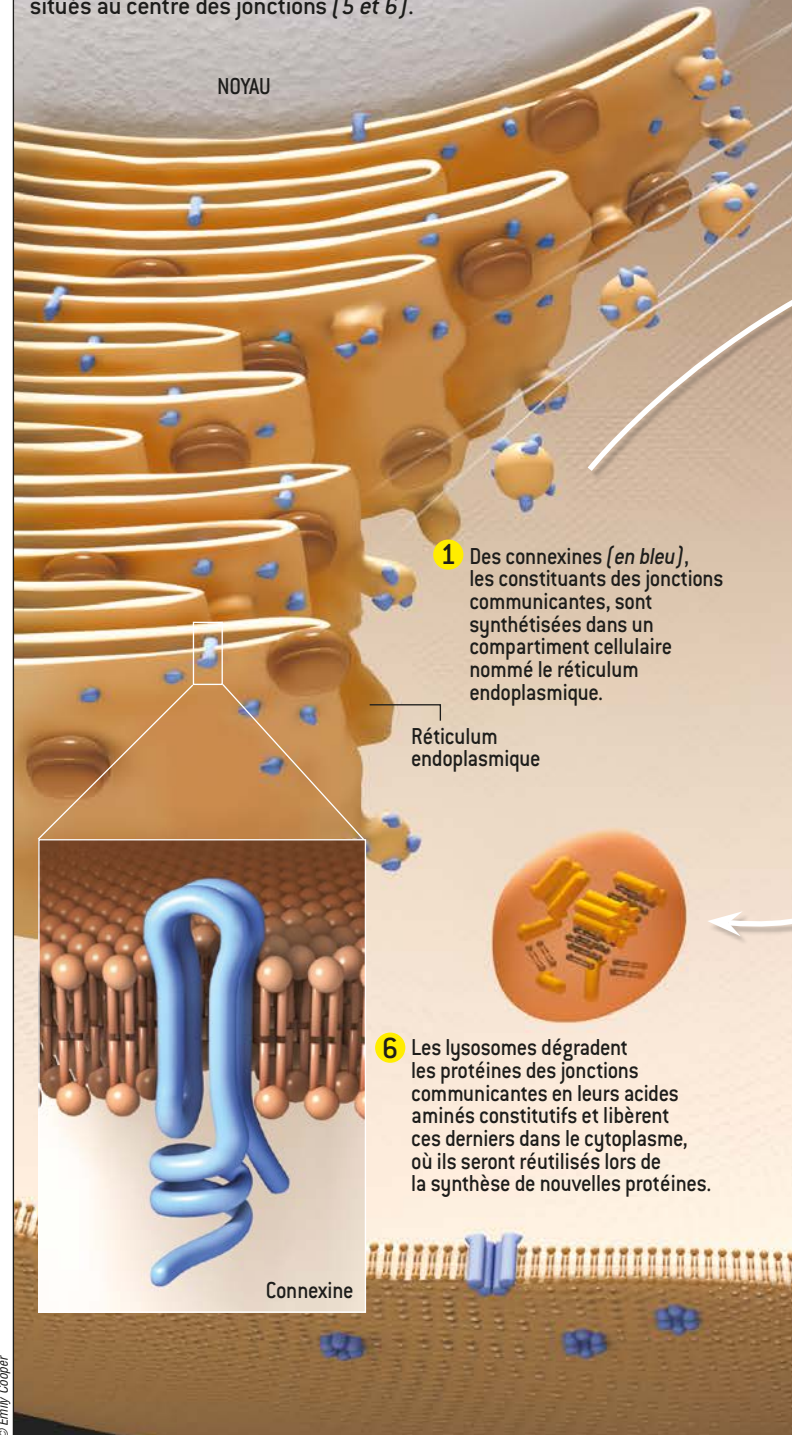
Nous avons commencé par attacher la GFP à la queue des connexines : nous avons introduit dans des cellules de mammifères un ADN codant la connexine Cx43 associée à la GFP. À notre grand plaisir, cette approche a fonctionné : les connexines ainsi marquées se sont bien intégrées dans la membrane cellulaire, où elles se sont assemblées en jonctions communicantes fonctionnelles qui présentaient pratiquement toutes les propriétés de celles formées à partir de connexines non modifiées. Nous disposions désormais d'un moyen puissant pour observer le comportement de connexines dans les cellules – une tâche que Dale Laird a poursuivie à son nouveau poste à l'université de Western Ontario, au Canada.

Suivez cette connexine !

Nos toutes premières observations furent surprenantes. Nous avons d'abord pris des photos des cellules toutes les dix minutes, pensant que nous pourrions les monter en un film accéléré mettant en évidence le déplacement des connexines fluorescentes. Toutefois, ces dernières se déplaçaient si vite que nous étions incapables de suivre une protéine d'une photo à la suivante. Nous avons réessayé en espaçant les photos de deux minutes, mais c'était toujours insuffisant. Pour suivre nos molécules dans la cellule, nous avons finalement dû prendre des photos séparées de quelques secondes seulement.

Le film obtenu nous a permis non seulement de suivre les connexines, mais aussi d'observer le transport d'hémicanaux vers l'intérieur des cellules sur de longs filaments nommés microtubules. Nous avons par

Continuellement, les cellules construisent et remodelent leurs jonctions communicantes (*en bas, à droite*), ces vastes structures qui leur permettent de communiquer avec leurs voisines. La construction commence par la synthèse de protéines nommées connexines [1], leur arrangement en anneaux – les hémicanaux [2] – et l'insertion de ces derniers dans la membrane cellulaire [3]. Si un hémicanal rencontre une jonction communicante existante, il peut alors s'amarrer à un hémicanal de la cellule voisine connectée à cet endroit, formant ainsi un nouveau passage entre les cellules [4]. Parallèlement, les cellules suppriment et dégradent les canaux les plus anciens, situés au centre des jonctions [5 et 6].



© Emily Cooper