

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.

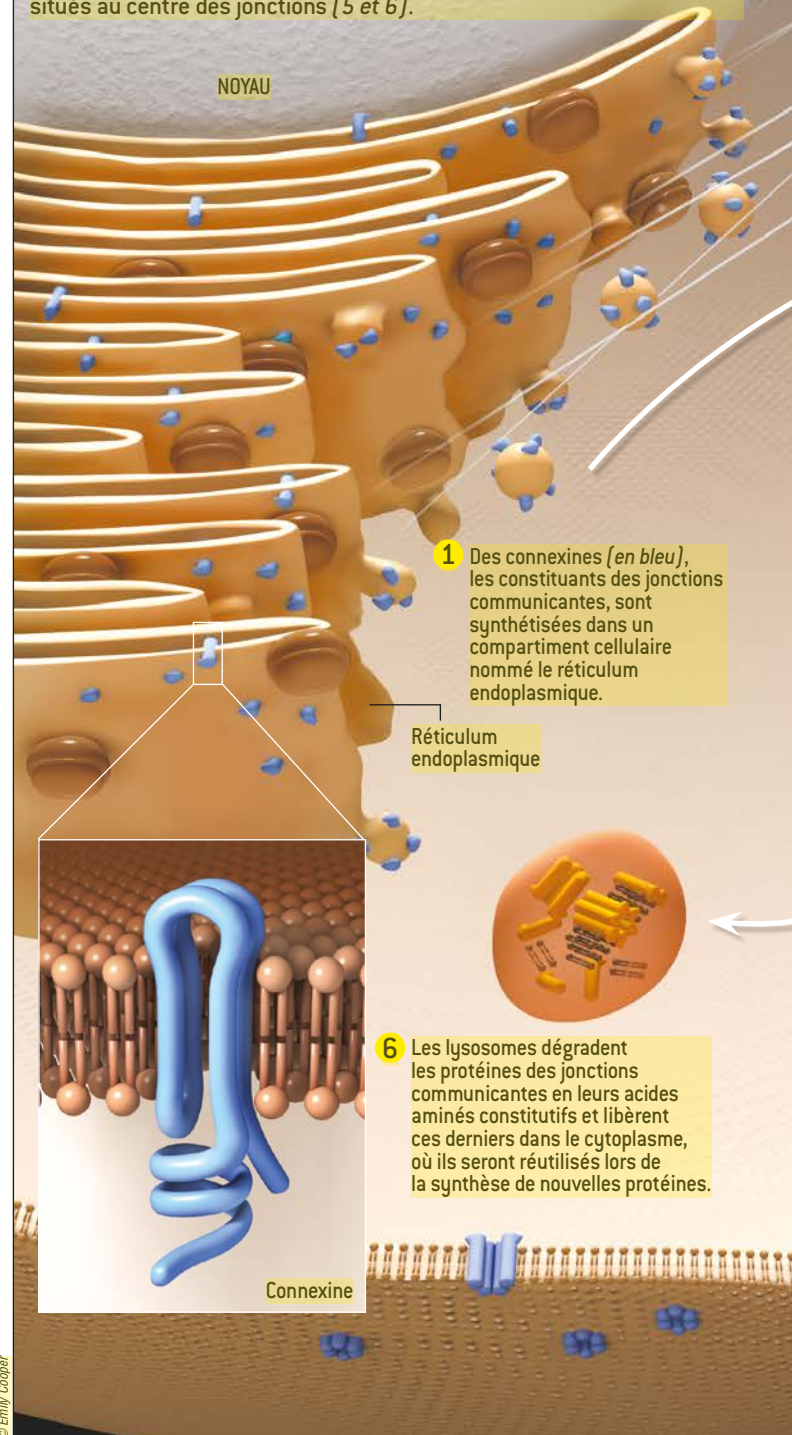
Nous avons commencé par attacher la GFP à la queue des connexines : nous avons introduit dans des cellules de mammifères un ADN codant la connexine Cx43 associée à la GFP. À notre grand plaisir, cette approche a fonctionné : les connexines ainsi marquées se sont bien intégrées dans la membrane cellulaire, 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 !

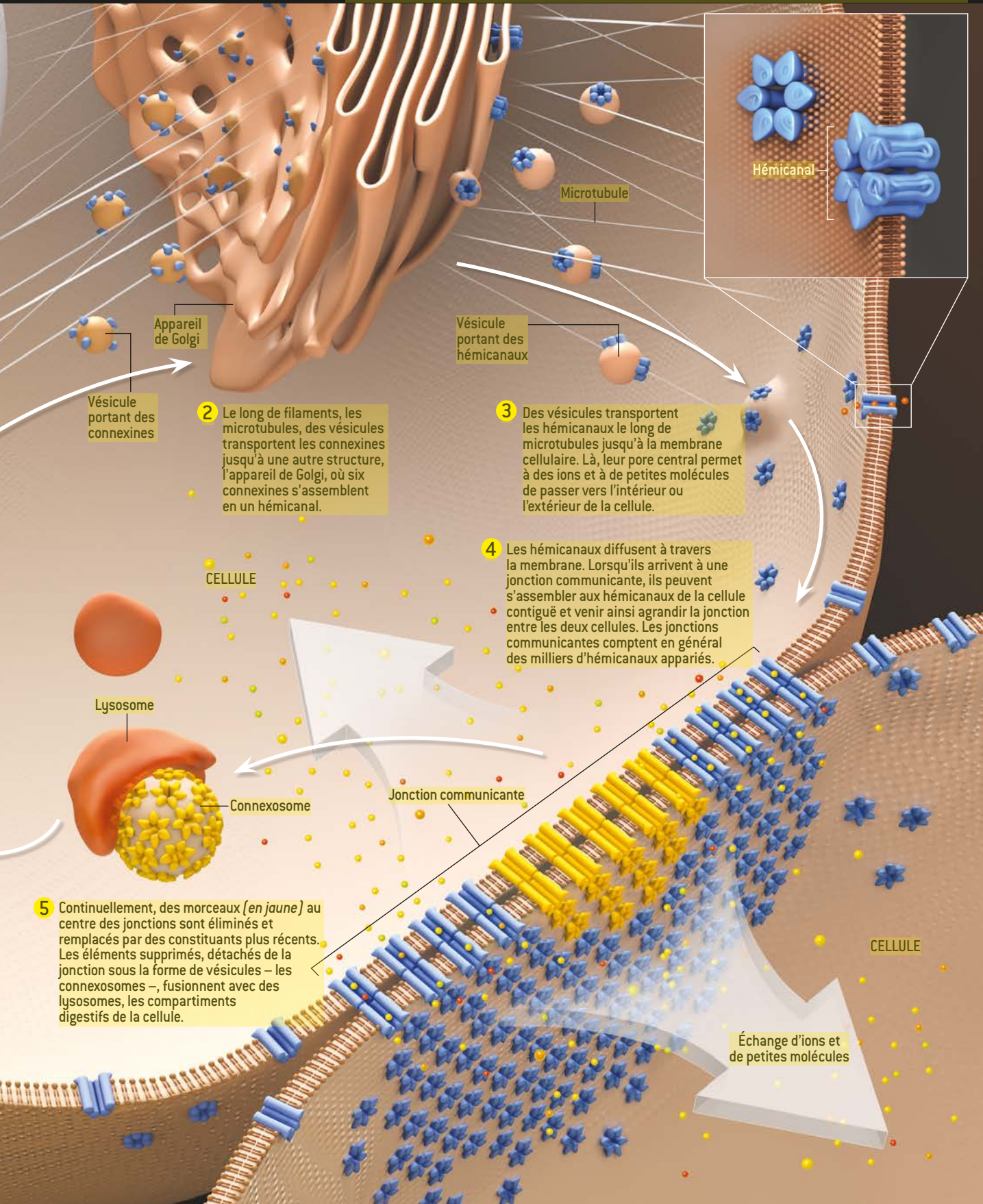
Nos toutes premières observations furent surprenantes. Nous avons d'abord pris des photos des cellules toutes les dix minutes, pensant que nous pourrions les monter en un film accéléré mettant en évidence le déplacement des connexines fluorescentes. Toutefois, ces dernières se déplaçaient si vite que 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].



DES JONCTIONS COMMUNICANTES EN PERPÉTUELLE RÉNOVATION



ailleurs constaté, comme d'autres chercheurs, que de petites jonctions communicantes se combinent parfois pour en former de plus grandes – ce que nos études au microscope électronique suggéraient déjà. Et à l'inverse, lorsque les cellules croissent, se déplacent, se déforment et se divisent, de grandes jonctions communicantes se scindent et en forment de plus petites.

En concevant de nouvelles méthodes de marquage qui permettaient de différencier les nouvelles connexines des anciennes, nos collègues ont montré que les jonctions communicantes s'étendent par l'ajout d'hémicanaux à leur périphérie, de sorte que le centre d'une jonction communicante représente la partie la plus « ancienne » de la plaque. Les composants de cette zone centrale disparaissent à mesure qu'elles vieillissent, ce qui suggère que les jonctions communicantes subsistent grâce à l'afflux de canaux plus récents de la périphérie vers l'intérieur, venant remplacer les plus anciens.

Des kinases aux commandes

Mais la découverte la plus marquante de cette série d'études fut peut-être celle-ci : il arrive qu'une cellule arrache un morceau de sa voisine, un mécanisme que d'autres chercheurs avaient proposé auparavant à partir de clichés de microscopie électronique. Cette manœuvre consiste à ingérer d'un coup les composants de la jonction provenant des deux cellules – un processus qui fournirait un moyen sûr d'interrompre rapidement la communication entre deux cellules lorsqu'elle n'est plus souhaitable. Une telle élimination massive de jonctions communicantes a notamment lieu dans l'utérus après l'accouchement, mettant hors d'action les réseaux de communication qui s'étaient formés pour coordonner les contractions.

Nous savions désormais que les jonctions communicantes se renouvellent constamment. Nous avons donc décidé d'explorer comment les cellules supervisent cette restructuration. Des études préliminaires suggéraient que des protéines nommées kinases régulaient le processus. Les kinases sont capables de modifier l'activité d'une protéine ou sa localisation dans la cellule simplement en lui ajoutant

des groupes phosphate (une réaction que l'on nomme phosphorylation).

Le défi était de déterminer si les kinases régulent le comportement des connexines et, si tel est le cas, de mettre en évidence l'effet de la phosphorylation sur leur fonctionnement. Paul Lampe prit la direction

De nouvelles mutations ont été identifiées et, aujourd'hui, on compte 14 maladies ayant comme origine des défauts dans les connexines des jonctions communicantes

de cette série d'études lorsqu'il monta son laboratoire au Centre de recherche sur le cancer Fred Hutchinson à Seattle, en 1994. En isolant la connexine Cx43 et en examinant la protéine par petites sections, Paul Lampe et ses collègues ont découvert que, sur l'ensemble de sa durée de vie, cette connexine est phosphorylée en 15 endroits différents le long de sa queue. Cette information nous a permis de trouver une partie du code de régulation qui contrôle la formation de jonctions communicantes contenant la protéine Cx43. L'action de kinases spécifiques sur certaines parties de la queue de Cx43 augmente l'assemblage de jonctions contenant cette protéine ; d'autres kinases agissant sur des parties différentes de la queue inhibent quant à elles la formation ou l'activité des jonctions ou en limitent la taille.

La connaissance d'une partie du code de régulation nous a donné une piste pour explorer les liens entre maladies humaines et jonctions communicantes : dans des échantillons de tissus humains, nous recherchons à présent des indices sur la façon dont des changements de phosphorylation dus à une lésion ou à une maladie modifient l'assemblage et le fonctionnement des jonctions communicantes. Notamment, nous commençons à comprendre, ainsi que d'autres équipes, comment la communication *via* ces jonctions change lorsque des cellules cardiaques essaient de se remettre d'un manque d'oxygène après une crise cardiaque ou lorsque des cellules cutanées se mobilisent pour guérir une coupure ou une éraflure.

Dans les deux cas, l'équipe de Paul Lampe a montré que la phosphorylation augmente sur un site particulier de la queue de la connexine Cx43. Cette phosphorylation accroît brièvement la taille des jonctions communicantes dans ces tissus en empêchant la connexine d'interagir avec une protéine qui, en temps normal, limite l'intégration de nouvelles connexines dans les jonctions existantes. Les jonctions s'étendant plus, la communication entre cellules s'intensifie – ce qui est essentiel au cours des premières minutes qui suivent une lésion – et aide à préserver la fonction du tissu cardiaque ou à faciliter la migration des cellules de la peau jusqu'à une plaie.

Ces découvertes ont conduit au développement de traitements fondés sur la stimulation ou l'inhibition de l'activité des kinases concernées. De telles stratégies nécessitent cependant de la prudence. Une extension des jonctions communicantes à un stade d'une maladie peut se révéler nocive par la suite. Par exemple, en temps normal, bien que les jonctions communicantes s'agrandissent brièvement juste après une blessure, elles sont ensuite vite dégradées, ce qui favorise la guérison. Chez les personnes diabétiques, en revanche, une surproduction continue de la protéine Cx43 retarde la cicatrisation d'une blessure. Et en cas d'éraflure de la cornée, il arrive que la production de connexines entraîne une inflammation et la formation d'une lésion persistante au lieu d'une réparation. Dans ces cas, en limitant la production ou la fonction de la protéine Cx43 dans les cellules au voisinage de la blessure chez des rongeurs, on observe une réparation rapide sans cicatrice – une approche sur laquelle travaillent plusieurs sociétés de biotechnologie.

Mais comprendre l'évolution des profils de phosphorylation des connexines lors d'une maladie ou d'une lésion ne suffit pas pour concevoir des thérapies efficaces. Les chercheurs ont besoin de mieux comprendre comment les connexines s'assemblent dans les différents tissus et sous diverses conditions – et comment leur agrégation et leur activité sont perturbées en cas de maladie. L'étude de mutations pathogènes dans les gènes