

Devoir n°2 – Éléments de correction

Partie 1 : Topographie des connexines

On ne demandait pas d'introduction. On pouvait, éventuellement, présenter en **une phrase** les connexines et les jonctions gap. Toute tentative plus ambitieuse s'est révélée inefficace, puisqu'elle a souvent conduit à des contresens ou au développement de thèmes (couplage électriques entre cellules notamment) qui n'était pas développés dans le devoir.

Document 1

Ce document présente trois électronographies. Il y avait une erreur dans le sujet : la 2^e électronographie était au ME à balayage et pas à transmission.

Principe : il est inutile de détailler la technique du microscope électronique ici (technique très classique). En revanche, la cryofracture doit faire l'objet d'une phrase pour expliquer **qu'on sépare les deux feuilletts de la membrane, et qu'on peut donc avoir accès à l'intérieur de la membrane**. Sans ça, on ne peut pas comprendre le document.

Observation et interprétation :

a. On voit deux membranes très proches (espace de l'ordre de 5 nm entre les deux). Les membranes sont extrêmement proches dans les jonctions gap.

NB : 1. on ne voit pas le canal ; 2. on ne voit pas les connexines ; 3. on devine presque les connexons, mais il ne faut pas faire dire au document ce que vous voulez qu'il dise. Si vous ajoutez des informations venant de vos connaissances, dites que cela vient de vos connaissances explicitement.

b. L'image de cryofracture/cryodécoupage met en évidence la présence de nombreuses structures **intramembranaires**, qui sont vraisemblablement des protéines. Les jonctions gap sont des structures impliquant des protéines membranaires.

c. On distingue des structures symétriques associées par 6 et délimitant une lacune. Les protéines des jonctions gap (qu'on sait par ailleurs être les connexines) sont agencées en hexamères et ont la forme d'un canal.

*NB : les triangles noirs sont des **flèches** qui permettaient de montrer les structures intéressantes. En aucun cas les flèches étaient des structures interprétables !*

Document 2

Principe : l'électrophorèse avec SDS permet de séparer les protéines uniquement selon leur taille. C'est la raison pour laquelle on peut, par comparaison avec une **référence** (et non un témoin, comme on a pu le lire à de trop nombreuses reprises), déterminer la **masse moléculaire** (et non molaires) des protéines composant les jonctions gap.

Observation et interprétation : on voit deux bandes, dont l'une est bien plus intense que l'autre. Elles correspondent à une protéine abondante (27 kDa environ) et une moins abondante (45 kDa environ). On notera que la masse moléculaire est une fonction logarithmique de la distance de migration, et non une fonction linéaire.

Hypothèse : la bande à 45 kDa peut être soit une contamination lors de la purification, soit une protéine liée à la connexine (par exemple, un ligand). En revanche, proposer que le connexon soit un hétérodimère serait vraisemblable hors contexte, mais le cours vous dit que le connexon est un homodimère. Un document qui irait à l'encontre du cours ne vous serait pas présenté but en blanc sans un paragraphe qui vous mette en garde.

Document 3

Principe : le profil d'hydrophobicité donne le l'indice hydrophobicité **des différents acides aminés d'une protéines**. En aucun cas, on aurait affaire à plusieurs protéines, ou à une mise en contact de la connexine avec des aminés plus ou moins hydrophobes. Ce point était très mal maîtrisé. Il faut absolument savoir interpréter ces profils sans hésitation.

Observation et interprétation : la connexine comporte quatre domaines hydrophobes (0-42 ; 50-90 ; 120-165 ; 175-205). Les autres portions sont hydrophiles.

Hypothèse : il est vraisemblable que la protéine possède **quatre hélices α transmembranaires** liées par des **boucles hydrophiles extramembranaires**. Ceci est tout à fait en accord avec le document 1, qui montrait que les jonctions gap étaient des structures membranaires.

Transition : Il est cependant légitime de se demander si les portions hydrophiles (et probablement extramembranaires) sont extracellulaires ou intracellulaires. Le document 4 répond à cette question.

Document 4

Ce document est **très complexe** : en plus du témoin, on a deux situations expérimentales, réalisées avec des anticorps particuliers. Ceci dit, tout est expliqué dans la légende du document. Il est anormal que tant d'étudiants n'aient pas compris ce document. Il faut faire l'effort de lire **toute la légende**, et de la relire, en faisant éventuellement des schémas sur le brouillon.

Principe : on a synthétisé quatre anticorps dirigés chacun contre **une portion de la connexine** présentée précédemment. On détecte les **portions de connexine** dans deux situations :

Biologie – Devoir n°2 – Correction

– Au milieu, jonctions gap non séparées. Les **parties extracellulaires sont entre les deux membranes, et donc inaccessibles aux anticorps**. On devrait ainsi détecter les parties de la connexine qui sont intracellulaires.

– À droite, jonctions gap séparées. Les membranes sont intactes, mais les connexons de la cellule 1 sont séparés des connexons de la cellule 2. **Les portions extracellulaires sont donc accessibles aux anticorps**. (les portions intracellulaires aussi, mais par comparaison avec la colonne du milieu, on conclura aisément).

De l'or colloïdal est attaché aux anticorps. Or l'or est un métal, qui est opaque aux électrons (ME à transmission). Le témoin est sans anticorps (à gauche), et permet de ne pas confondre des portions de membranes avec des grains d'or colloïdal. On attend **tout ça pour le principe**. Ceux qui ont fait cet effort ont en général bien compris le document. En revanche, préciser qu'on utilise de l'urée 12 M et un pH 12, on peut raisonnablement penser qu'on s'en fiche pas mal (sauf si l'un d'entre vous a des connaissances particulières sur l'influence du pH ou de l'urée sur la structure des protéines). Il faut penser que présenter un protocole n'a un intérêt que si c'est pour mieux comprendre l'expérience présentée.

Observation/interprétation : on pouvait très bien présenter cela sous forme d'un tableau (recommandé quand le nombre de pistes est important. On présente ici l'intensité de la détection par l'anticorps.

anticorps	membranes non séparées	membranes séparées	interprétation
A ₆₋₁₇	quelques détections	quelques détections	portion probablement intramembranaire, plutôt cytoplasmique **
A ₃₈₋₅₃	pratiquement aucune détection	détection abondante	portion très clairement extracellulaire
A ₁₁₁₋₁₂₅	détection abondante	détection abondante*	portion très clairement cytoplasmique
A ₂₁₇₋₂₃₄	détection abondante	détection abondante*	portion très clairement cytoplasmique

* certains considèrent qu'il y a ici une détection faible. C'est négliger que les membranes non séparées présentent un signal double (les deux côtés sont cytoplasmiques), alors que les membranes séparées ont un signal simple (une seule face est cytoplasmique, l'autre étant extracellulaire).

** la faible intensité du signal pousse à penser que la majeure partie de la séquence est intramembraire, et largement inaccessible aux anticorps. L'absence de différence entre les deux situations pousse à penser que la séquence est probablement située du côté cytoplasmique. De plus, comme la première séquence hydrophile qui lui succède dans la séquence est extracellulaire, on peut envisager une partie hydrophile courte (les quelques premiers AA), suivis par une séquence hydrophobe, suivie par une séquence hydrophile de l'autre côté de la membrane (38-53).

Critique : la critique ne doit en aucun cas être systématique. Ici, on pouvait franchement se demander l'intérêt d'avoir utilisé la séquence 6-17, qui est hydrophobe, pour une détection avec des anticorps (protéines solubles). Les résultats sont difficilement interprétables, et on pouvait sans doute l'anticiper.

Schéma bilan

Ce schéma devait montrer les choses suivantes :

- Une échelle
- Deux membranes (épaisseur de 7 nm), séparées de 5 nm environ
- Un milieu extracellulaire et deux faces cytosoliques
- Deux connexons, formés chacun de 6 connexines, avec un canal de 2 nm
- Dans une connexine au moins, 4 hélices transmembranaires, trois domaines cytosoliques (tous identifiés) et deux extracellulaires (dont un identifié et un putatif)

Partie 2 : Quelques fonctions des connexines astrocytaires

Ici non plus, pas d'introduction n'est attendu. Toute tentative sera forcément vaine : il est vraisemblable que vous n'avez aucune connaissance sur les astrocytes et sur les connexines 30 et 43. Vous n'avez normalement rien à dire. Donc ne dites rien, et passez à l'analyse des documents.

Document 5

Principe : ici, il est **indispensable** de présenter le principe, et d'expliquer **en quoi le protocole réalisé permet de connaître l'importance des connexines dans le réseau astrocytaire**. On a injecté un traceur (et non un tracteur...) dans

Biologie – Devoir n°2 – Correction

UNE cellule (un astrocyte). On étudie au microscope optique la localisation du traceur. Si on voit le traceur ailleurs que dans une unique cellule, **c'est qu'il a diffusé ailleurs**. Pour diffuser, **sachant que les cellules sont séparées par des membranes (imperméables)**, ce traceur **est forcément passé pas des jonctions**. Observer si le traceur est présent dans d'autres astrocytes que celui dans lequel on l'a injecté initialement permet donc d'avoir une idée du degré de communication des astrocytes les uns avec les autres. On parlera de **réseau astrocytaire** si les astrocytes sont justement liés entre eux par des jonctions permettant la communication, comme les jonctions gap.

On a utilisé des mutants des connexines 30 et 43 permettant, en inactivant une ou deux connexine(s) partiellement (hétérozygote) ou totalement (homozygote), de tester l'influence de ces protéines sur ce réseau. NB : la notation « Cx43 » désigne le gène ou la protéine « connexine 43 ». La notation « Cx43+/- » désigne un mutant pour lequel la un des allèles de la Cx43 est normal (sauvage) alors que l'autre est muté. C'était indiqué dans la légende, mais on a eu tout de même beaucoup de confusions entre Cx43 et Cx43+/- . Ces notations très classiques sont à connaître parfaitement. Une fois que tout ça est dit, l'analyse des résultats est très rapide.

Observation/interprétation (en haut) :

L'échelle était donnée (50 µm). Donc chaque point noir est donc vraisemblablement **une cellule**.

A. WT (wild type = sauvage). C'est le témoin. Le marquage gris diffus est probablement une sortie des cellules, ou une réaction non spécifique (artéfact), qu'on n'analysera pas si on a compris que les cellules sont les petits points noirs.

B. Cx30+/+ Cx43-/. On a à peu près le même nombre de cellules marquées que pour le témoin. La Cx43 n'est pas indispensable dans le réseau astrocytaire. Il est possible que la Cx30 soit suffisante pour ce rôle.

C. Cx30+/- Cx43-/. On a moins de cellules marquées, et le colorant s'est globalement moins étendu. Il est plus concentré au centre (probablement proche de l'injection). Lorsqu'un seul allèle de Cx30 est présent, la diffusion de cellules entre les astrocytes est plus difficile.

D. Cx30-/- Cx43-/. La coloration est circonscrite à une zone centrale, comprenant quelques cellules, voire une seule cellule. Si les deux connexines sont mutées, la diffusion est très largement entravée.

Conclusion : Cx30 au moins, et peut-être Cx43 également, sont indispensables pour maintenir la communication entre cellules (réseau astrocytaire).

On peut soit critiquer vertement le document pour n'avoir par présenté le cas Cx30-/- Cx43+/, soit faire la transition avec le document 5 en bas.

Observation/interprétation (en bas) :

La première piste (WT) correspond au témoin.

Cx30-/- : on passe de 52 à 33 cellules fluorescentes. Cx30 est donc importante dans la communication entre astrocytes (jonctions gap). Valeur ajoutée par rapport au doc précédent : quantification plus aisée.

Cx43-/- : on passe de 52 à 28 cellules fluorescentes. Cx43 est donc importante dans la communication entre astrocytes (jonctions gap). Valeur ajoutée par rapport au doc précédent : on ne pouvait pas dire avec certitude si Cx43 était impliquée dans le réseau astrocytaire.

Cx30-/- Cx43-/- (double KO) : on passe de 52 à 0 cellules fluorescentes. Cx30 et Cx43 sont donc **les deux seules connexines** impliquées dans le réseau astrocytaire.

CBX : l'inhibiteur de jonctions gap ne donne pas tout à faire le même résultat que le double KO. Deux hypothèses : soit l'inhibiteur n'inhibe pas parfaitement (c'est en faite la bonne hypothèse), soit l'importance de Cx30 et Cx43 dans le réseau est dû à une autre fonction des connexines que la fonction canal, comme une fonction de régulation d'autres processus cellulaires (je n'attendais pas une telle hypothèse, qui me paraît complexe, mais elle est très sérieusement envisagée par les chercheurs. Les protéines peuvent parfois avoir des rôles très divers).

Document 6

Principe : il était important de bien se souvenir que la cellule qui a les connexines mutées est uniquement l'astrocyte. C'est donc bien l'action de l'astrocyte qu'on mesure, et non celle du neurone.

Observation/interprétation : pour le double KO, le retour à une $[K^+]_0$ normale est plus lent que pour le sauvage. Cx30 et Cx43 permettent donc une réabsorption du K^+ . Comme ces connexines sont mutées uniquement dans l'astrocyte, on peut penser que Cx30 et Cx43 permettent à l'astrocyte de mieux réabsorber le K^+ extracellulaire, donc d'améliorer le fonctionnement du système nerveux.

Hypothèse : il est possible que les connexines 30 et 43 aient une influence que la pompe Na/K (en fait, c'est probablement faux, mais c'est une hypothèse intéressante). L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'un astrocyte qui se chargerait de K^+ à proximité d'un neurone très actif aurait plus de facilité à continuer à absorber si son K^+ intracellulaire excédentaire pouvait facilement passer aux astrocytes voisins éventuellement moins sollicités.

Document 7

Principe : on affame un neurone (privation de glucose) et on mesure son activité dans différentes situations : chez un sauvage ou un mutant double KO (Cx30-/- Cx43-/-), avec injection ou non de glucose dans un astrocyte adjacent. On

Biologie – Devoir n°2 – Correction

cherche de cette façon à savoir si un astrocyte peut apporter de l'énergie à un neurone (comparaison chez le sauvage : « control » contre « glucose astrocytes ») et si les connexines sont importantes dans cet apport d'énergie (comparaison glucose astrocytes : mutant contre sauvage).

Observation/interprétation :

E. L'activité du neurone qui décroît en situation de privation est restaurée par l'injection de glucose dans un astrocyte voisin. Il est donc vraisemblable que l'astrocyte soit capable d'apporter du glucose au neurone. Hypothèse : les connexines sont impliquées dans ce transfert.

E/F. L'activité du neurone qui décroît en situation de privation n'est pas restaurée par l'injection de glucose dans un astrocyte voisin dans le cas du double KO. Les connexines sont donc impliquées dans la restauration de l'activité.

G.

– Trois premières colonnes : le lactate a la même efficacité que le glucose pour restaurer l'activité du neurone. L'astrocyte doit vraisemblablement posséder des mécanismes permettant : soit le transfert de glucose et de lactate au neurone, soit le transfert de lactate et la transformation de glucose en lactate (c'est en fait la bonne hypothèse), soit le transfert de glucose et la transformation de lactate en glucose.

– Deux colonnes de droite : le mutant perd la capacité à restaurer l'activité du neurone (même niveau que la colonne de gauche)

– Deux colonnes du milieu : l'inhibiteur diminue la capacité de l'astrocyte à restaurer l'activité du neurone, à un point encore plus important que le double KO. Hypothèse : l'inhibiteur inhibe toutes les connexines (et pas seulement Cx30 et Cx43). Peut-être que d'autres connexines sont impliquées dans la restauration de l'activité de l'axone. Cela dit, la différence entre les pistes 4-CIN et Cx30^{-/-} Cx43^{-/-} n'est pas forcément très significative (les barres d'erreur sont juste chevauchantes).

On notera que l'analyse des documents 6 et 7 ne fait à aucun moment intervenir la notion de jonction gap. On peut faire toute l'analyse en montrant l'influence de Cx30 et Cx43 même sans savoir leur fonction.