

# ETUDE DES JONCTIONS ADHERENTES INTERENDOTHELIALES: APPROCHE PAR CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET VIDEOMICROSCOPIE DE FLUORESCENCE SUR MEMBRANES MODELES ET BIOLOGIQUES

Olivier Lambert <sup>a,\*</sup>, Jean-Christophe Taveau <sup>a</sup>, Sébastien Almagro <sup>b</sup>, Felix DeHaas <sup>c</sup>, Alain  
Brisson <sup>a</sup> Danielle Gulino-Debrac <sup>b</sup>

<sup>a</sup> UMR 5248 CBMN, CNRS-Université Bordeaux 1-ENITAB, IECB, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France

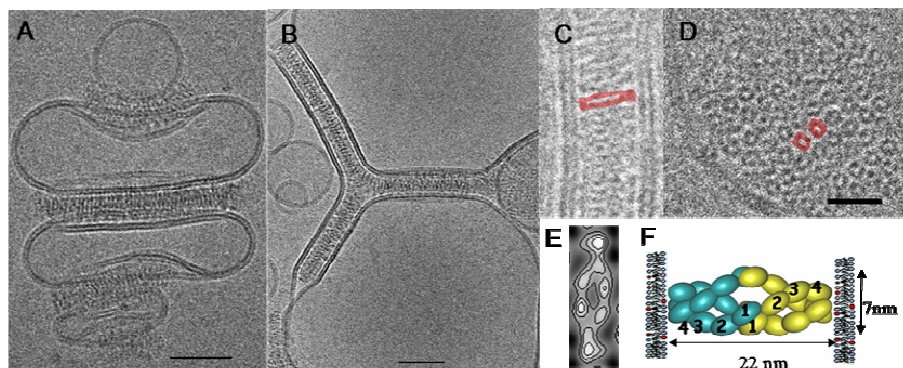
<sup>b</sup> APV U INSERM 882, iRTSV, CEA-Grenoble 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble

<sup>c</sup> FEI Electron Optics B.V. Achtseweg Noord 5, 5651 GG Eindhoven The Netherlands

**Résumé** – La formation de jonctions adhérentes interendothéliales a été étudiée par des approches combinées de cryomicroscopie électronique et de vidéomicroscopie de fluorescence. Les mécanismes d'assemblage d'ectodomains de VE-cadhérine ont été abordés *in vitro* sur membranes modèles. La mise en place des jonctions est actuellement disséquée *in cellulo*.

L'endothélium vasculaire (VE) est une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins. Cette barrière semi-perméable régule au niveau des jonctions intercellulaires la transmigration de différents constituants sanguins. Ces jonctions adhérentes sont en partie constituées de VE cadhérine. Ces molécules sont les ancres transmembranaires qui élaborent des interactions de type homotypique entre cellules de phénotype identique via leur domaine extracellulaire, alors qu'elles interagissent par leur domaine cytoplasmique avec le cytosquelette d'actine via les  $\beta$ - et  $\alpha$ -caténines.

De nombreuses questions concernant le mécanisme d'assemblage des jonctions adhérentes demeurent encore sans réponse : quel mécanisme est responsable du recrutement des molécules de cadhérine au niveau des jonctions ?, quel est le rôle respectif des édifices de cadhérine et du cytosquelette d'actine? Dans le but d'apporter des éléments de réponse à ces questions, une première étude a consisté à déterminer la structure d'assemblages de fragments extracellulaires de VE cadhérine au niveau de membranes lipidiques modèles. Des fragments comprenant quatre domaines extracellulaires de la VE cadhérine (VE-EC<sub>1-4</sub> pour Vascular Endothelial Ectodomain1-4) et présentant une extension polyhistidine au niveau C-terminal ont ainsi été exprimés [1]. Nous avons étudié la morphologie des assemblages formés par liaison de ces fragments de VE cadhérine à des liposomes contenant des lipides dotés de groupes NTA reconnaissant les peptides polyhistidine. L'analyse par cryo microscopie électronique a montré que les cadhérines s'assemblent spontanément *in vitro* entre liposomes constituant ainsi des jonctions adhérentes artificielles [2]. Ces "pseudo" jonctions adhérentes sont composées d'hexamères de VE-EC<sub>1-4</sub> orientés au niveau des surfaces membranaires (Figure 1). L'information structurale contenue dans les fragments des 4 domaines extracellulaires de cadhérine est donc suffisante pour induire la formation de jonctions adhérentes artificielles. De plus les structures formées ressemblent de manière remarquable aux jonctions adhérentes naturelles [3].



**Figure 1:** (A,B) Jonctions adhérentes formées à partir de fragments VE-EC<sub>1-4</sub> au niveau de membranes de liposomes observées en cryoME (barre 50 nm). (C,D) Vues agrandies de jonctions, observées de côté (C) et de dessus (D). Les hexamères de cadhérines apparaissent comme des objets cylindriques (23 nm de longueur, et 7 nm de diamètre - anneaux en D). (E) Projection de la structure de l'hexamère orienté à plat sur une monocouche lipidique. (F) Modèle de l'hexamère de VE-EC<sub>1-4</sub> cadhérine formé de trois dimères antiparallèles de VE-EC<sub>1-4</sub>.

\* Auteur à contacter o.lambert@iecb.u-bordeaux.fr – Tel : 05 40 00 34 90

Ce travail a été complété par l'étude de l'organisation générale de la pseudojonction en trois dimensions (3D) par cryotomographie. L'orientation des hexamères de VE cadhérine ainsi que leur architecture 3D seront présentées.

Une deuxième étude vise à comprendre la mise en place des jonctions et les mécanismes moléculaires associés. L'élaboration de ces jonctions adhérentes qui résulte d'un effet synergique entre les VE cadhérines et le cytosquelette d'actine est un processus très dynamique. La vidéomicroscopie sur cellules endothéliales vivantes a permis de montrer que l'élaboration des contacts intercellulaires précoces passe par la formation des filopodes. Ces structures exposent à leur extrémité des complexes VE cadhérine/caténines qui sont ainsi propulsés vers la cellule adjacente. La construction des jonctions intercellulaires résulte donc de la rencontre de ces molécules de VE cadhérine propulsées les filopodes émanant de cellules voisines. La structure et les propriétés dynamiques (incluant les interactions cadhérine /filaments d'actine) de filopodes et des jonctions adhérentes sont étudiées par vidéomicroscopie de fluorescence et cryoME associée aux approches de cryotomographie 3D.

Avec l'intégration d'informations obtenues à partir de techniques possédant des résolutions différentes, l'architecture et la dynamique des filopodes et des jonctions matures dans leur environnement natif seront mieux comprises.

### Références

- [1] Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T., and Gulino, D. (2001) *J Biol Chem* **276**, 3581-3588
- [2] Lambert, O., Taveau, J. C., Him, J. L., Al Kurdi, R., Gulino-Debrac, D., and Brisson, A. (2005) *J Mol Biol* **346**, 1193-1196
- [3] Al-Amoudi, A., Dubochet, J., and Norlen, L. (2005) *J Invest Dermatol* **124**, 764-777