

***Caenorhabditis elegans* vu par cryo-microscopie électronique de sections vitreuses (CEMOVIS) : analyse du collagène cuticulaire et mise en évidence d'un processus d'auto-assemblage de type cristal liquide lors de la sécrétion du collagène par l'hypoderme**

Amélie Leforestier*, Françoise Livolant

Laboratoire de Physique des Solides, UMR CNRS 8502, Bât 510, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex

La cryo-microscopie électronique est une technique extrêmement puissante pour déterminer la structure des complexes macromoléculaires, et ce à une résolution maintenant inférieure au nanomètre [1]. Elle a été jusqu'à présent surtout développée pour l'analyse de nano-objets piégés en film minces vitrifiés (macromolécules et complexes, cristaux 2D, petits organelles), mais ne permet pas l'analyse d'objets d'épaisseur supérieure à 300-500 nm, donc de la plupart des cellules entières. La technique de cryo-microscopie de sections vitreuses (CEMOVIS [2]) permet de contourner cette limitation et d'accéder à la structure de la cellule entière dans son état natif. Cette technique consiste à vitrifier un échantillon (cellules isolées ou tissu) par congélation ultra-rapide, de manière à préserver l'environnement ionique et aqueux des macromolécules qui le constituent. Cet échantillon est ensuite coupé en sections ultra-minces (40-60 nm), observées au microscope électronique à basse température (-180°C). On peut ainsi obtenir des « instantanés » de la cellule, à une résolution suffisamment haute (1 à 2 nm) pour visualiser les macromolécules dans leur environnement natif, sans déshydratation ni coloration. Dans ce cas, la principale limitation est l'analyse de l'information contenue dans chaque image (identification des macromolécules, détermination de la structure 3D) [3]. Malgré cela, la méthode s'avère déjà fructueuse dans l'étude de plusieurs structures cellulaires (voir par exemple [4-6]).

Nous montrerons comment cette technique peut être utilisée pour l'analyse de l'ultrastructure du nématode *Caenorhabditis elegans*. Nous présenterons une analyse de plusieurs structures et sous-structures cellulaires et extracellulaires : microvillosités des membranes apicales, muscle, cuticule, hypoderme, ...

En particulier, nous illustrerons l'apport de la méthode à la compréhension de processus cellulaires, tels que la sécrétion du collagène cuticulaire. La cuticule de *C. elegans* est une matrice extracellulaire essentiellement composée de collagènes, et synthétisée par l'hypoderme de l'animal. Sous la cuticule, nous mettons en évidence, au sein de structures membranaires complexes, un processus de ségrégation de phase qui conduit à une augmentation locale de la concentration en collagène. On observe alors la formation d'une organisation supramoléculaire de type cristal liquide cholestérique à laquelle se superpose un ordre pentagonal local entre molécules de collagène (Figure 1).

* Auteur à contacter : leforestier@lps.u-psud.fr – Tel : 01 69 15 60 87

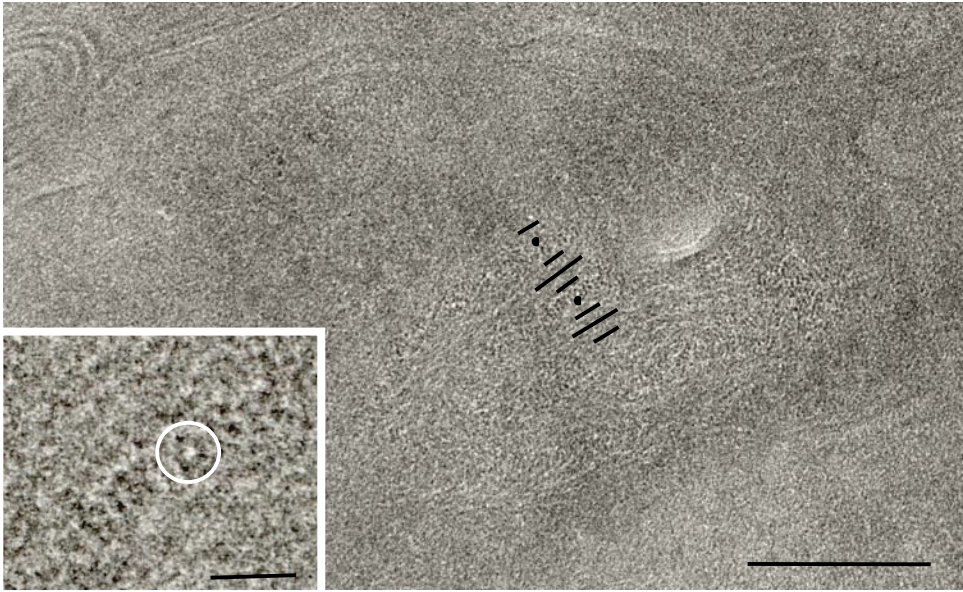


Figure 1 – Sécrétion du collagène chez *C. elegans*. Les molécules de collagène présentent une organisation de type cristal liquide cholestérique (les orientations moléculaires sont soulignées en noir par des traits et des points). Lorsque les molécules sont perpendiculaires au plan d'observation (insert) on visualise un ordre pentagonal entre les triple hélices (cercle blanc). Echelle 100 nm, insert 10 nm.

Ces résultats montrent l'implication des propriétés d'auto-assemblage cristallin liquide du collagène mises en évidence *in vitro* [7, 8, 9], dans le processus de sécrétion du collagène.

- [1] Chiu W, Baker ML, Jiang, W, Dougherty M, Schmid MF (2005) *Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution*. Structure **13**, 363-72.
- [2] Al-Amoudi A, Chang jj, Leforestier A, McDowall A, Salamin L, Norlen L, Sartori Blanc N, Studer D, Dubochet J (2004) *Cryo-Electron microscopy of vitreous sections*. EMBO J. **23**, 3583-3588.
- [3] Dubochet J., Zuber B, Elstov M, Bouchet-Marquis C, Al-Amoudi A, Livolant F (2007) *How to read a vitreous section*. Methods Cell Biol, **79**, 385-405.
- [4] Zuber et al, (2005) *The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. **1032**, 19192-19197)
- [5] Bouchet-Marquis et al (2007) *Visualization of cell microtubules in their native state*. Biol Cell. **99**, 45-53
- [6] Sartori Blanc N, Senn A, Leforestier A, Livolant F, Dubochet J (2001) *DNA in human and stallion spermatozoa forms local hexagonal packing with twist and many defects*. J. Struct. Biol. **134**, 76-81.
- [7] Giraud-Guille MM (1992) *Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions. A clue to the packing of collagen in extracellular matrices*. J. Mol. Biol. **224**, 861-873.
- [8] Martin R, Farjanel J, Eichenberger D, Colige A, Kessler E, Hulmes D, Giraud-Guille MM (2000) *Liquid crystalline ordering of procollagen as a determinant of 3-dimesional extracellular matrix architecture*. J. Mol. Biol. **301**, 11 –17.
- [9] Gobeaux F, Belamie E, Davidson P, Panine P, Giraud-Guille MM (2007) *Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state*. Langmuir, sous presse.