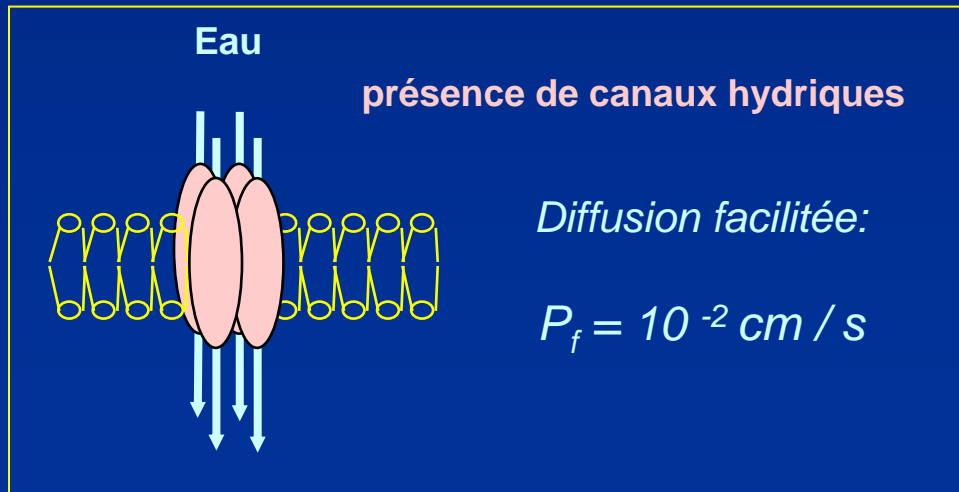
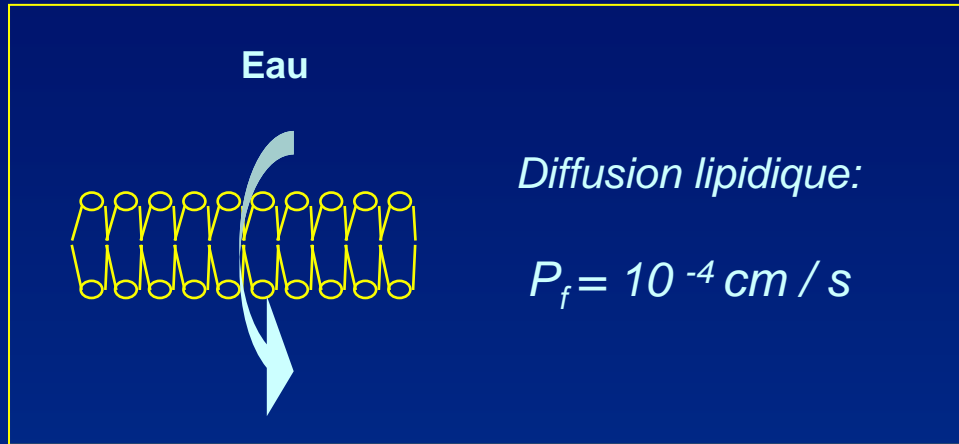


CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DE L'AQUAGLYCÉROPORINE
AQP3 EXPRIMÉE DANS DIVERS SYSTÈMES

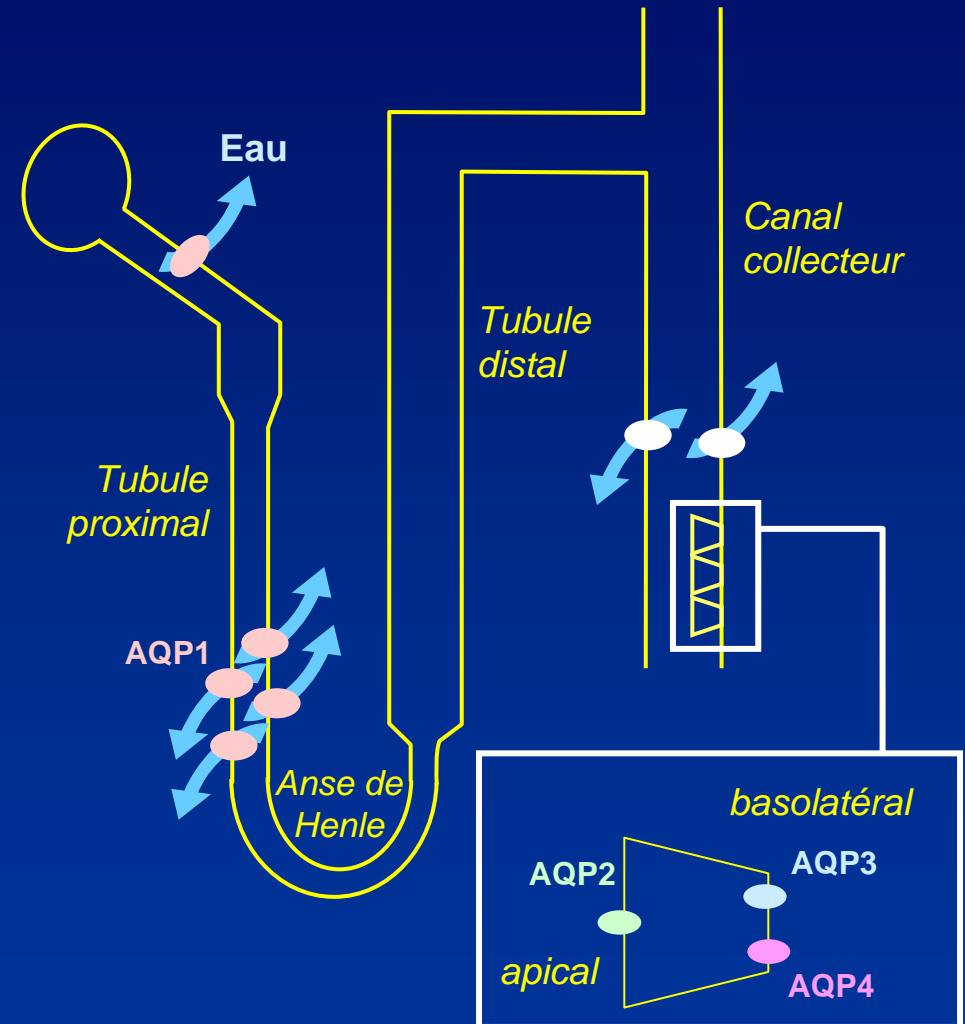
CEA Saclay

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire - *Service de Biologie Cellulaire*

Perméabilité à l'eau des membranes



Réabsorption de l'eau au niveau rénal



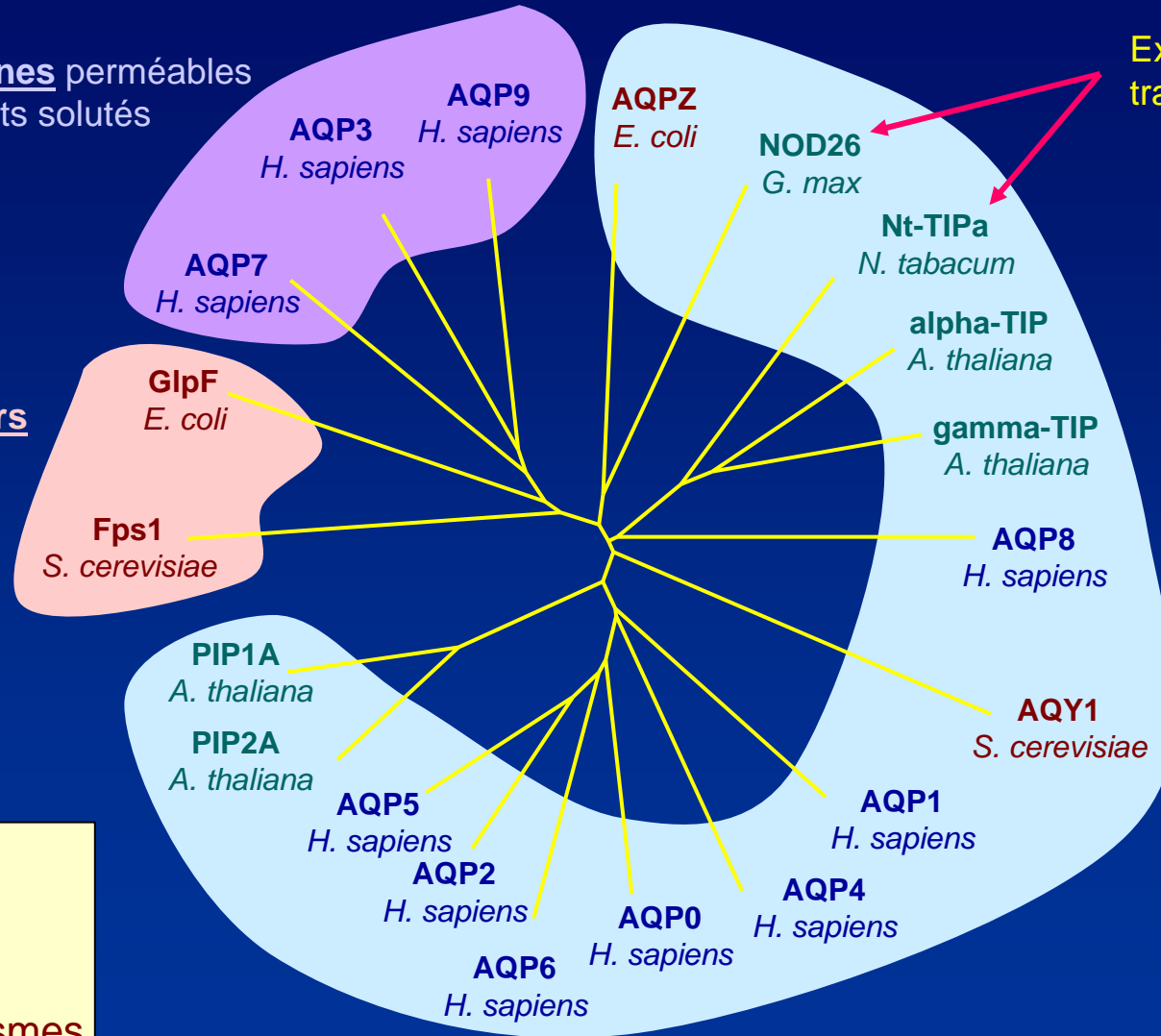
LES PROTÉINES DE LA FAMILLE MIP

Aquaglycéroporines perméables à l'eau et aux petits solutés

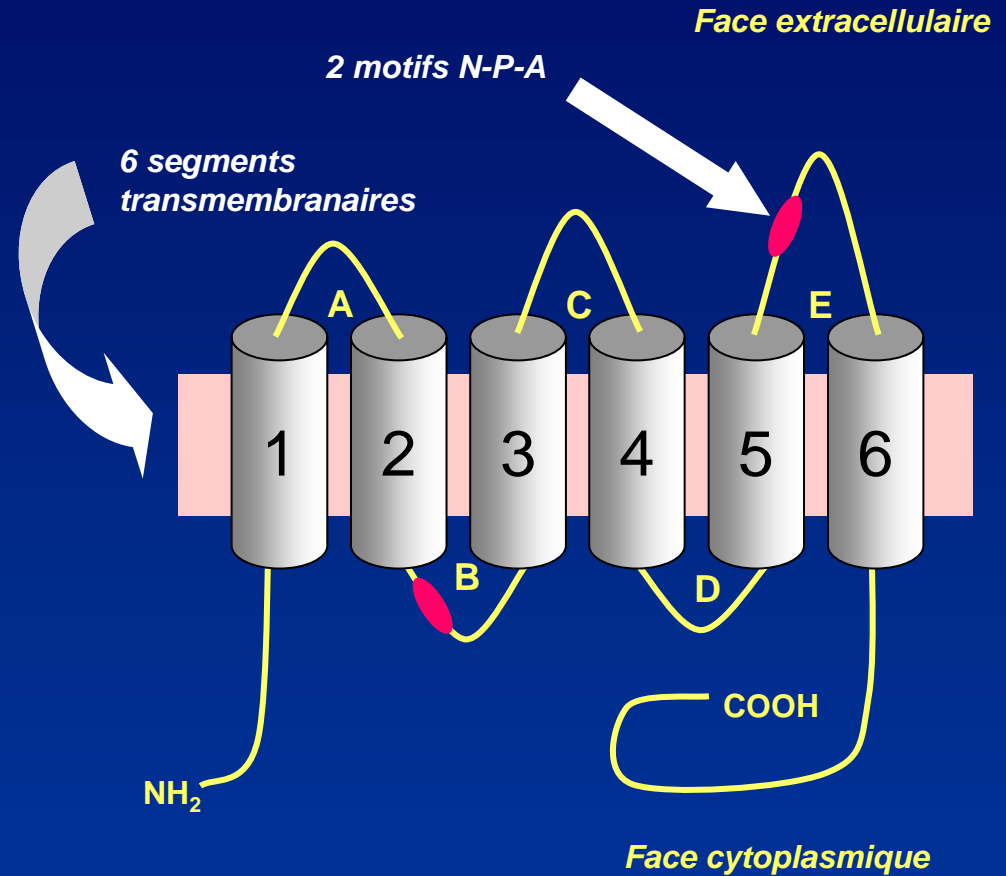
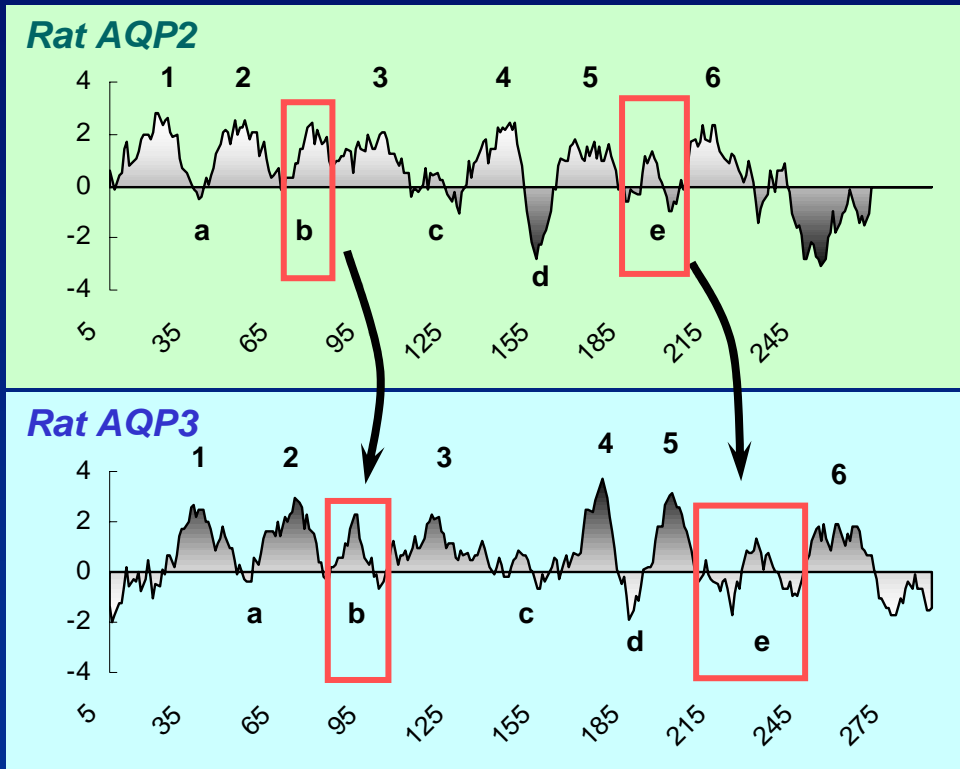
Exceptions: transportent des solutés

Transporteurs de glycérol

Aquaporines sélectivement perméables à l'eau



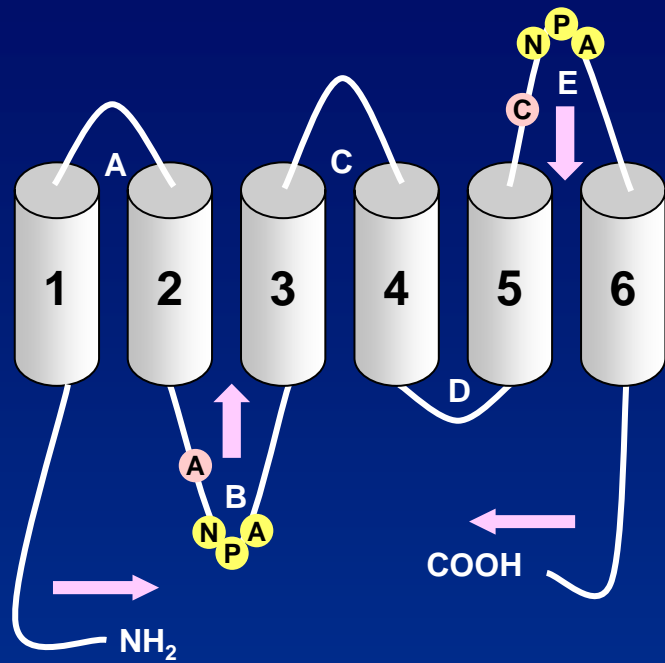
TOPOLOGIE ET CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES MIPs



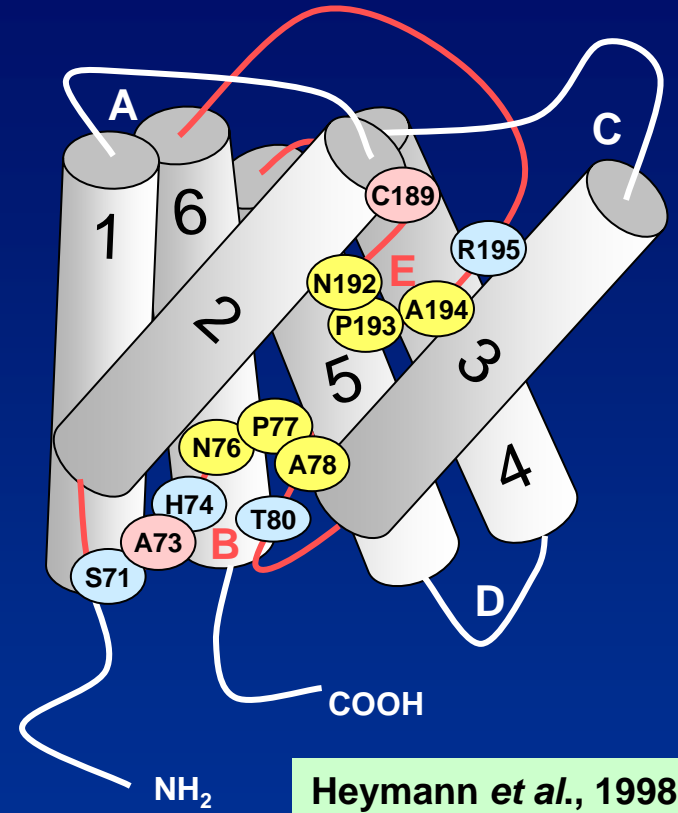
Identité de séquence d'au moins 20 %

PM de 26 à 31 kDa

LE MODÈLE DU SABLIER

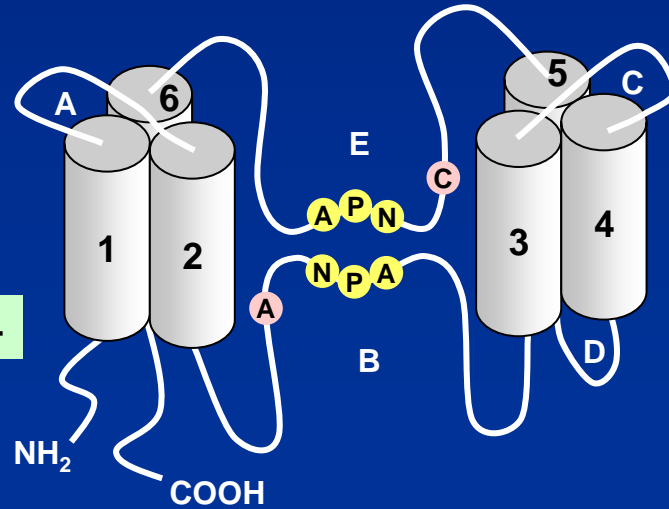


Preston et Agre, 1991

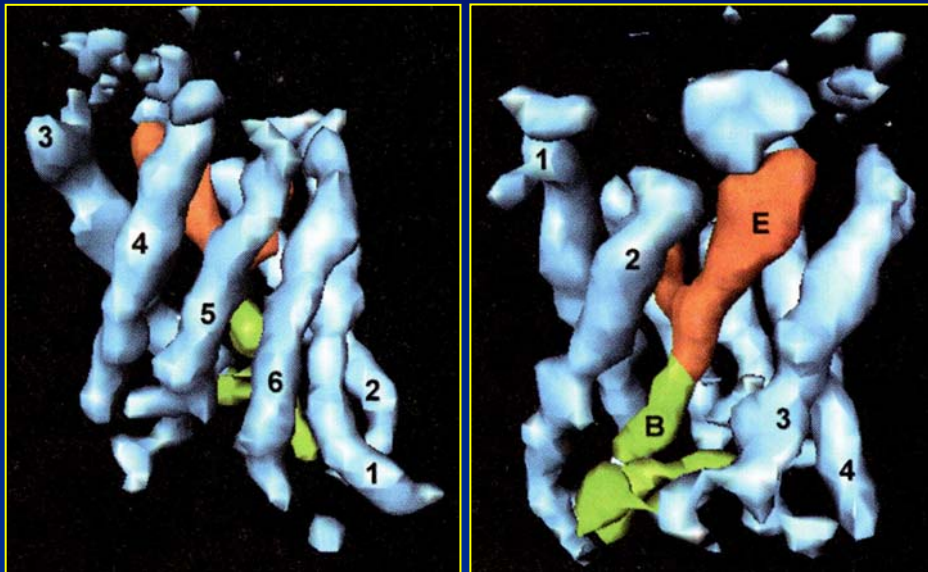


Heymann *et al.*, 1998

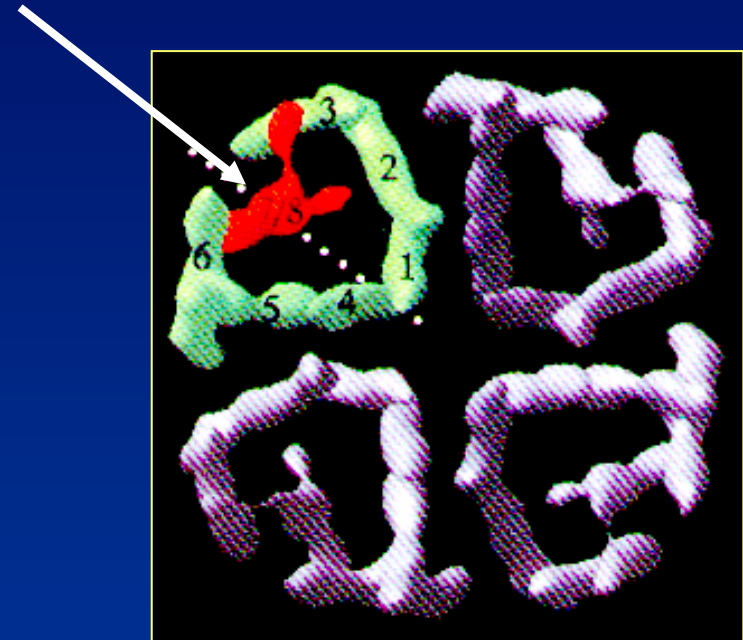
Jung *et al.*, 1994



STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'AQP1



Walz *et al.*, 1997 (6 Å)



Li *et al.*, 1997 (6 Å)

OBJECTIFS

Les voies de passage de l'eau et du glycérol à travers le globule rouge humain sont elles communes ?

Moyens

1 *Mesure des perméabilités à l'eau et au glycérol de globules rouges humains témoins et Colton (a-b-).*

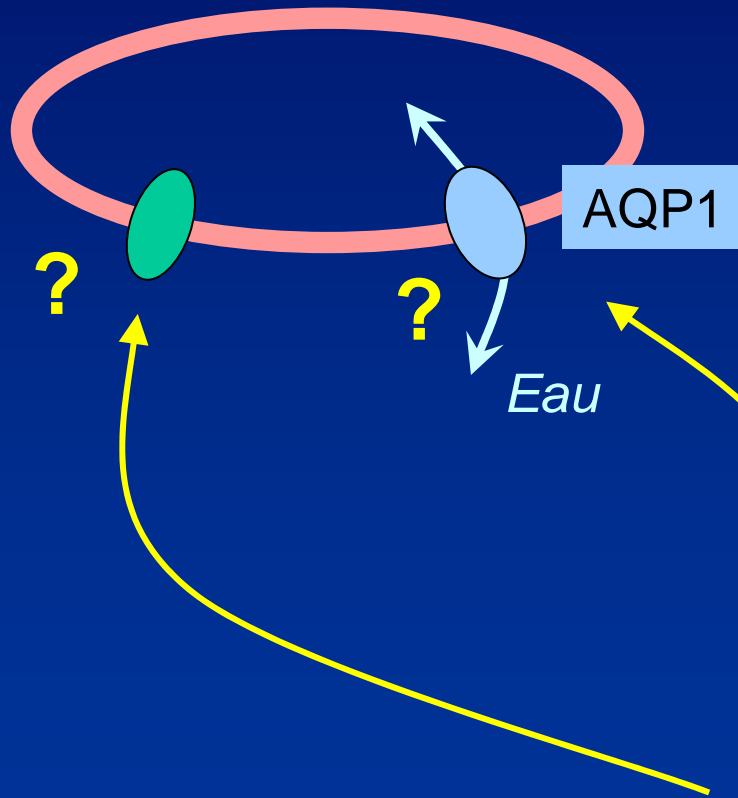
Immunotransfert

2 **Détermination d'éléments structuraux impliqués dans la sélectivité des protéines MIPs.**

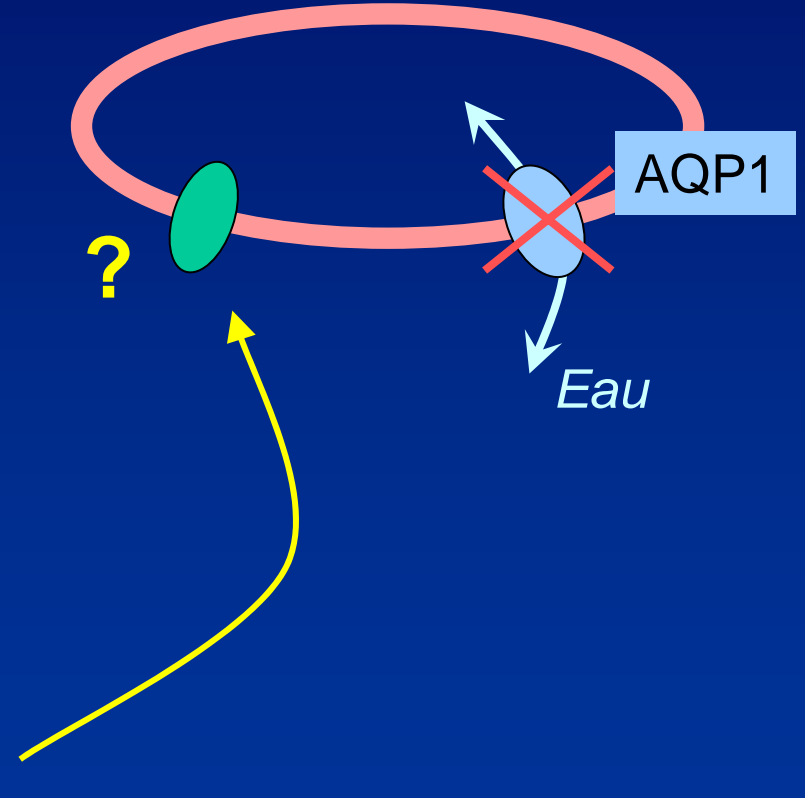
3 **Détermination de l'état d'oligomérisation d'AQP3 présente dans les systèmes natifs ou hétérologues, comparaison avec AQP1.**

UTILISATION DE GLOBULES ROUGES DE PHÉNOTYPE COLTON (a- b-)

Erythrocyte témoin

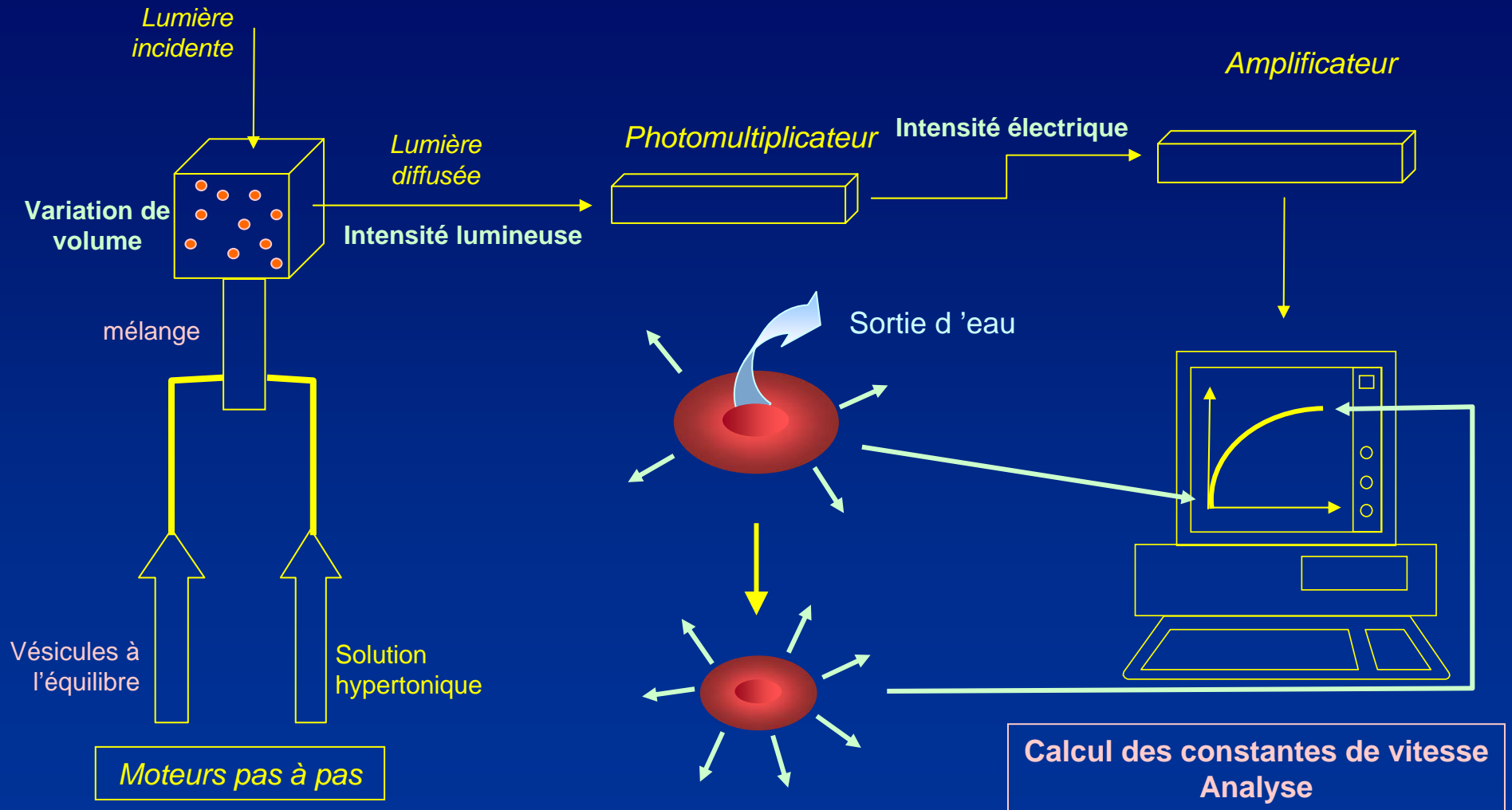


Erythrocyte Colton (a- b-)



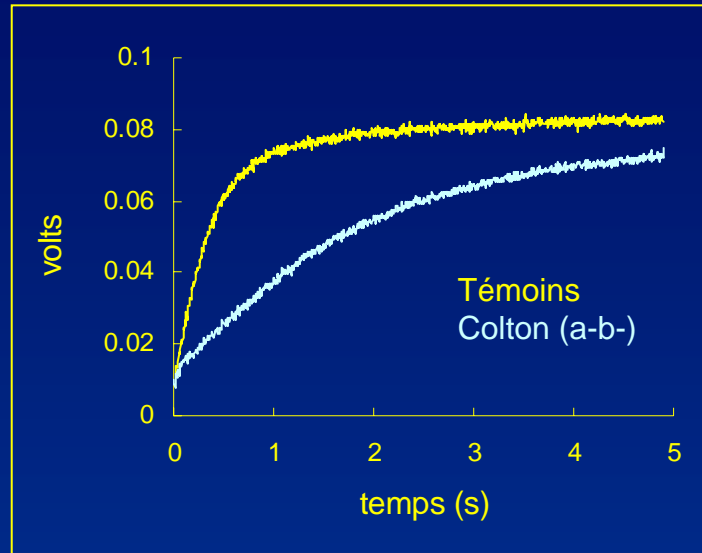
Glycérol

SPECTROPHOTOMÉTRIE A FLUX INTERROMPU

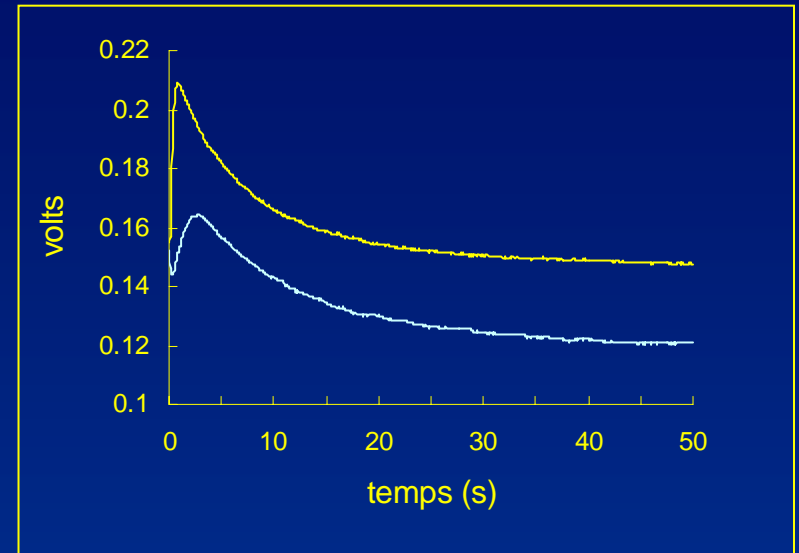


PERMÉABILITÉ À L'EAU ET AU GLYCÉROL DES MEMBRANES D'ÉRYTHROCYTES

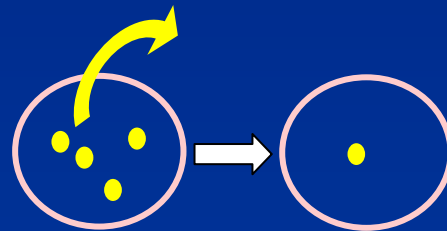
Spectrophotométrie
à flux interrompu



Glycérol

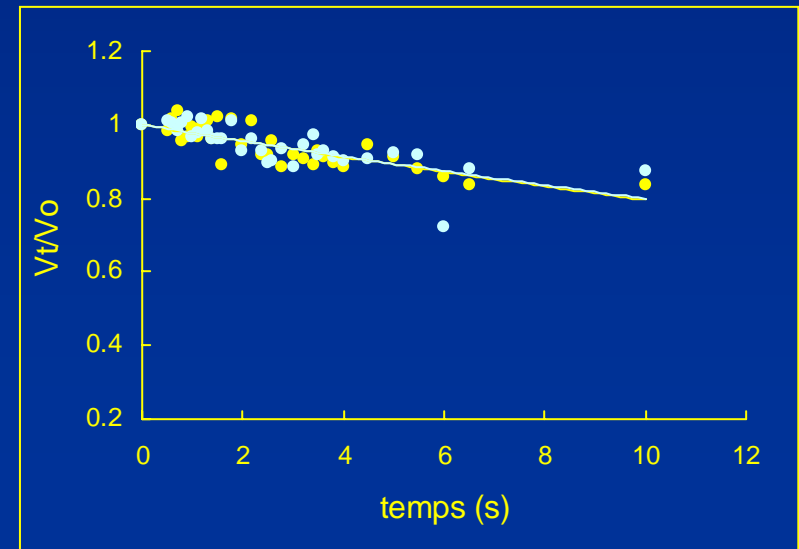


Filtration
ultra-rapide

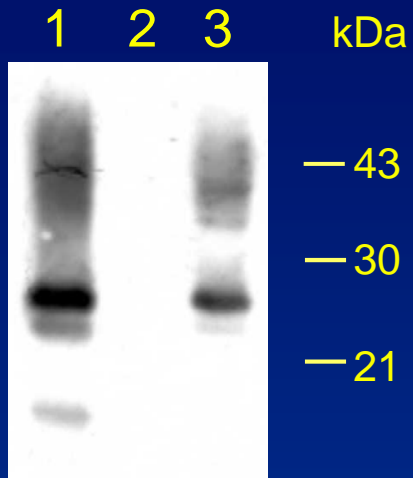


Fantômes d'hématies
équilibrés dans le glycérol

Sortie de glycérol

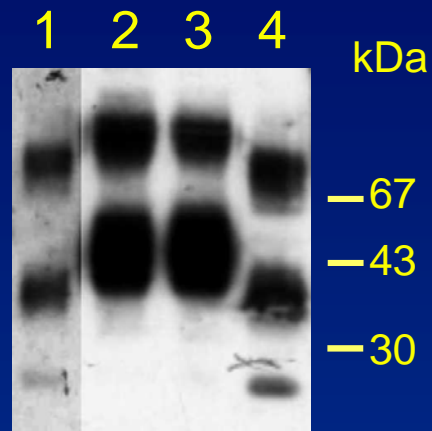


IMMUNOTRANSFERT ET IMMUNOFLUORESCENCE



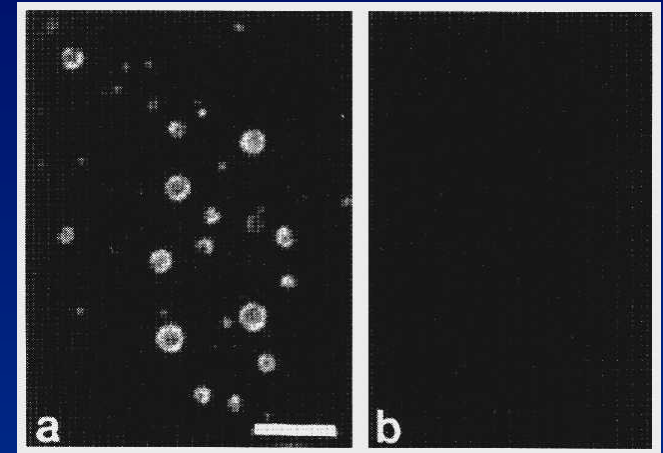
anti AQP1

- 1: AQP1 humaine pure
- 2: membranes GR humains Co (a- b-)
- 3: membranes GR humains témoins



anti AQP3

- 1: membranes GR de rat
- 2: membranes GR humains Co (a- b-)
- 3: membranes GR humains témoins
- 4: médullaire externe de rein de rat



- a: GR humains + anti-AQP3
- b: GR humains + anti-AQP3 épuisé par peptide

CONCLUSIONS

①

La perméabilité au glycérol du globule rouge humain n'est pas due à AQP1.

La protéine responsable du transport de glycérol dans le globule rouge humain est probablement AQP3.

OBJECTIFS

②

Détermination d'éléments structuraux impliqués dans la sélectivité des protéines MIPs.

Moyens

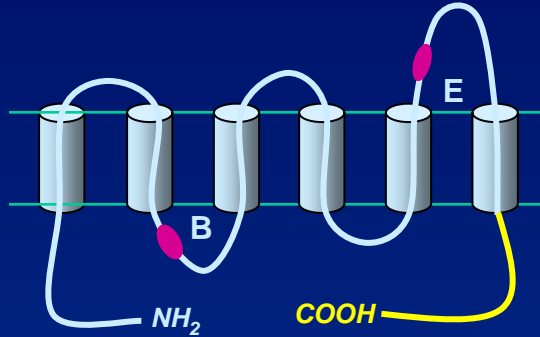
Étude de la fonction de chimères constituées d'AQP2 (strictement perméable à l'eau) et d'AQP3 (perméable à l'eau et au glycérol).

③

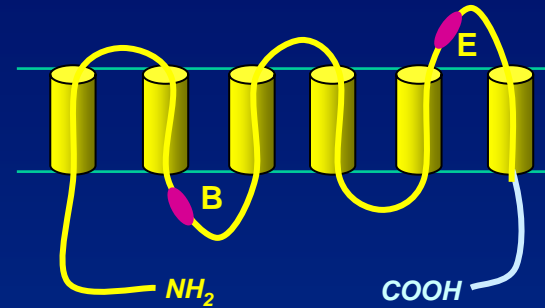
Détermination de l'état d'oligomérisation d'AQP3 présente dans les systèmes natifs ou hétérologues, comparaison avec AQP1.

SCHÉMA DES CHIMÈRES

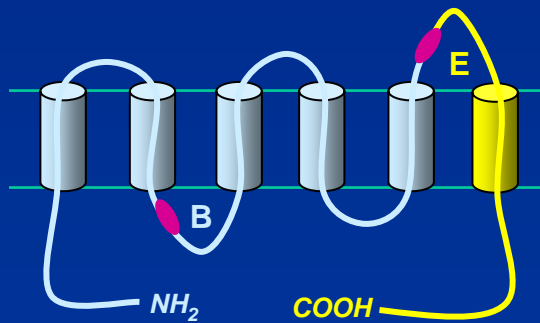
AQP3- AQP2 Cter



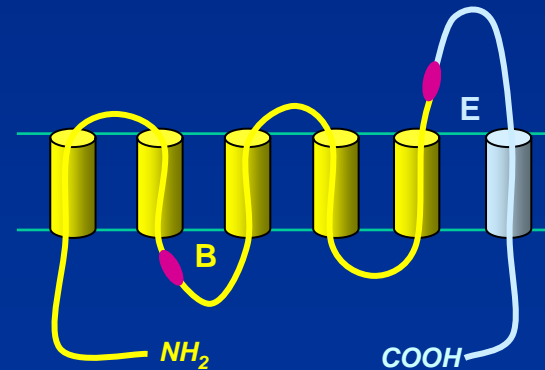
AQP2- AQP3 Cter



AQP3- NPA ' AQP2



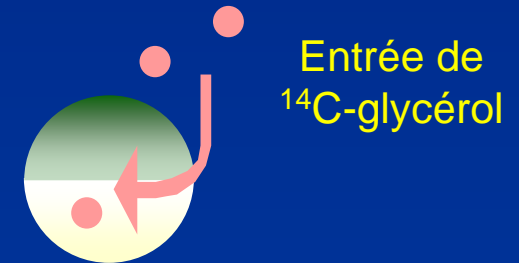
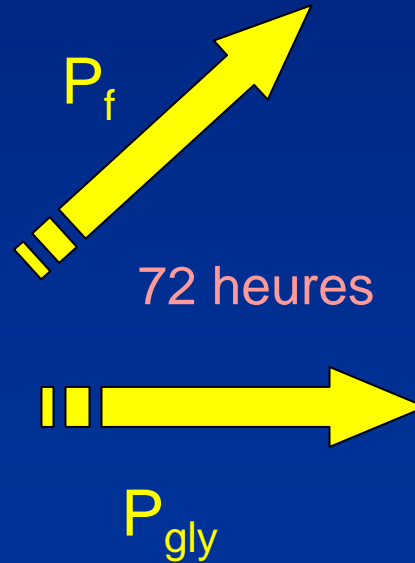
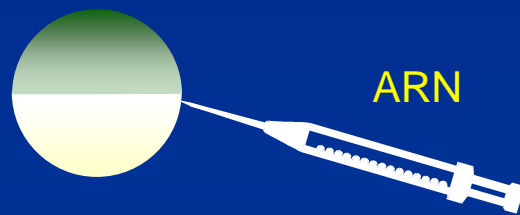
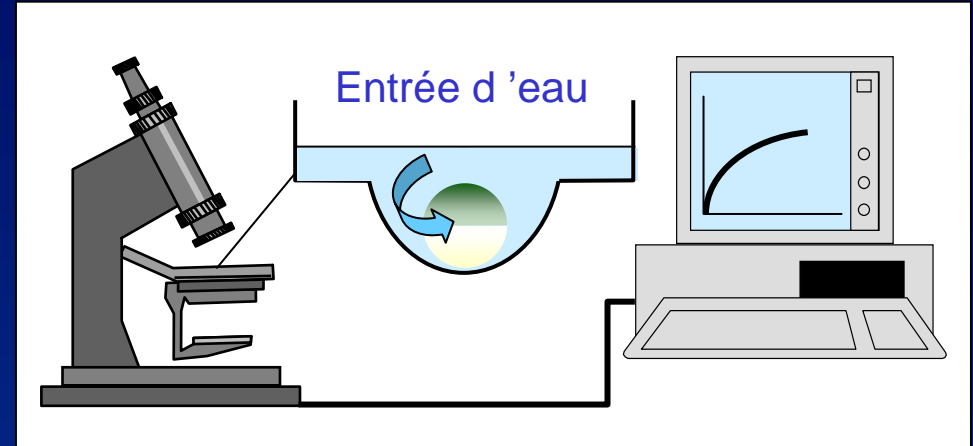
AQP2- NPA' AQP3



MESURE DES PERMÉABILITÉS A L'EAU ET AU GLYCÉROL DES OVOCYTES DE XÉNOPE

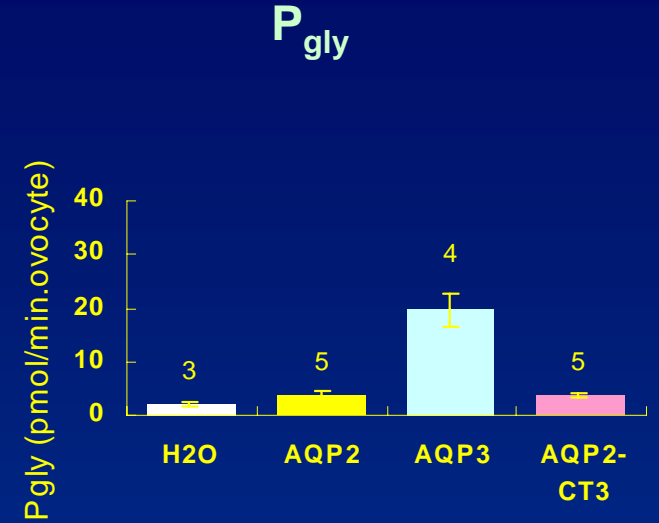
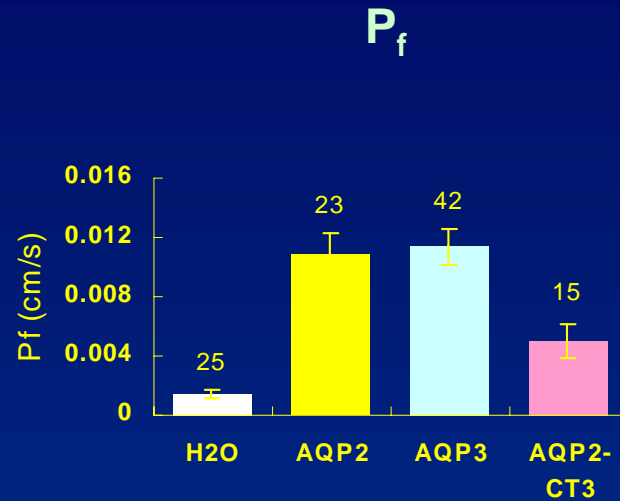
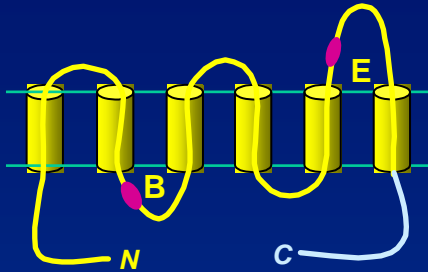


Xenopus laevis

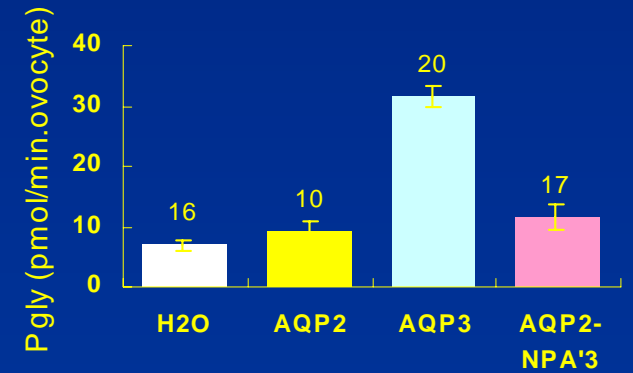
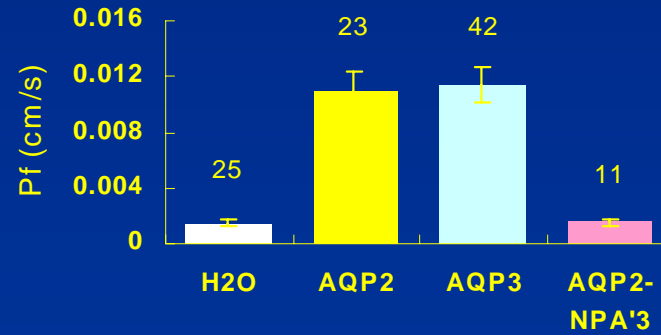
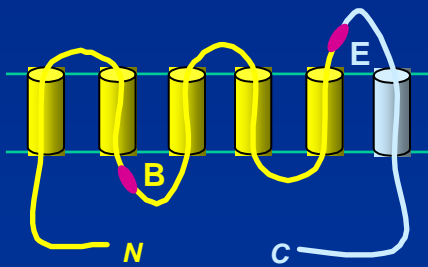


FONCTION DES CHIMÈRES

AQP2- AQP3 Cter

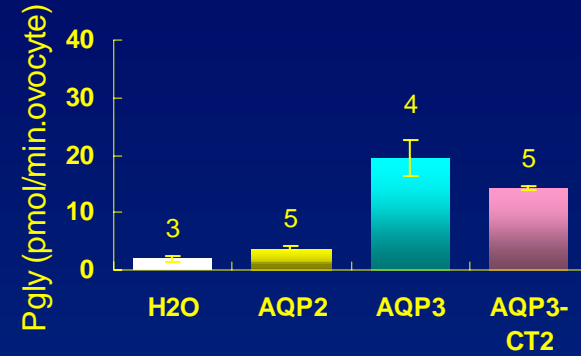
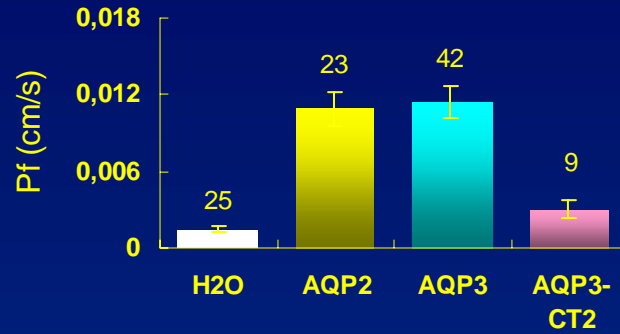
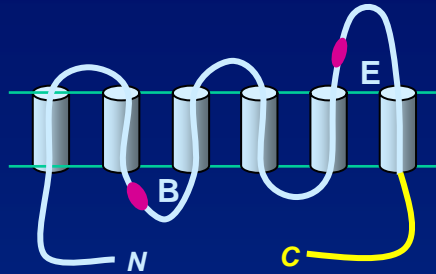


AQP2- NPA ' AQP3

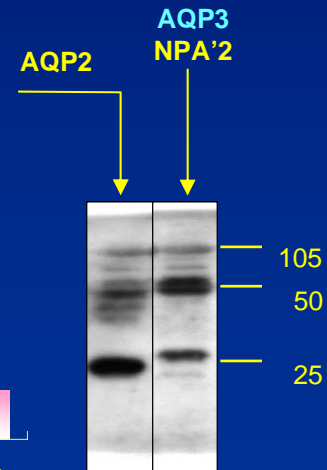
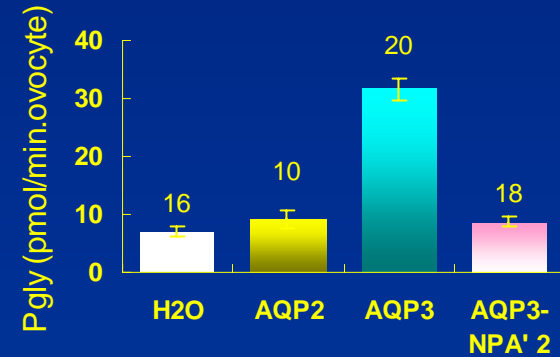
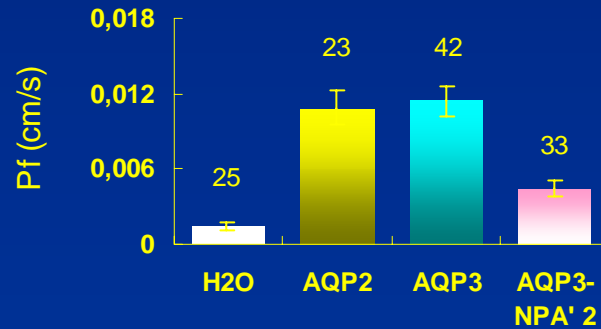
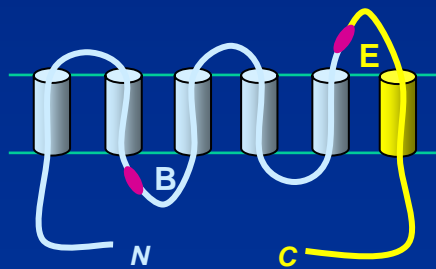


FONCTION DES CHIMÈRES

AQP3- AQP2 Cter

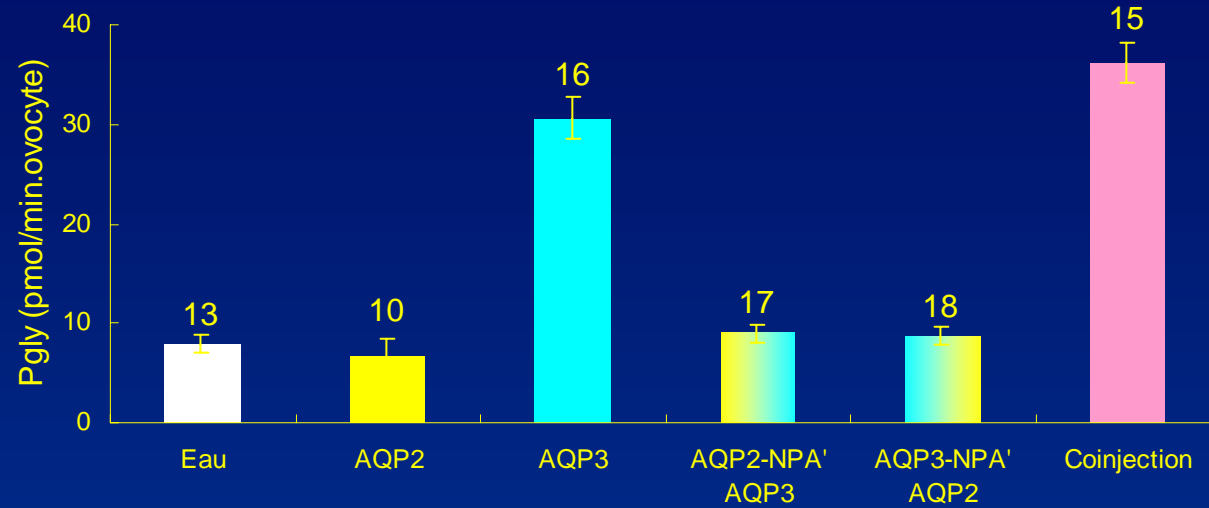


AQP3- NPA' AQP2

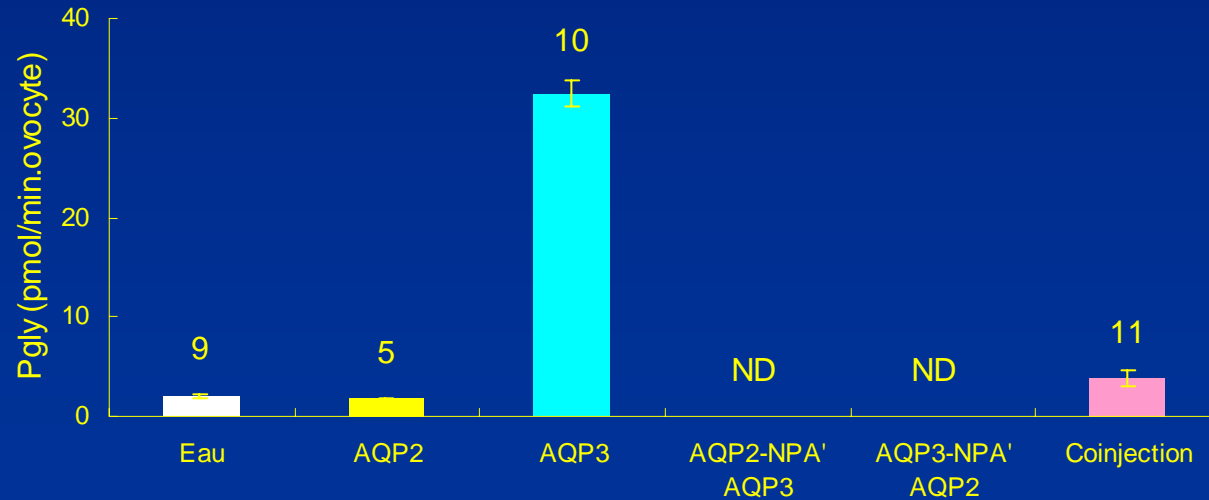


COEXPRESSION DES CHIMÈRES COMPLÉMENTAIRES AQP2-NPA' AQP3 ET AQP3-NPA' AQP2

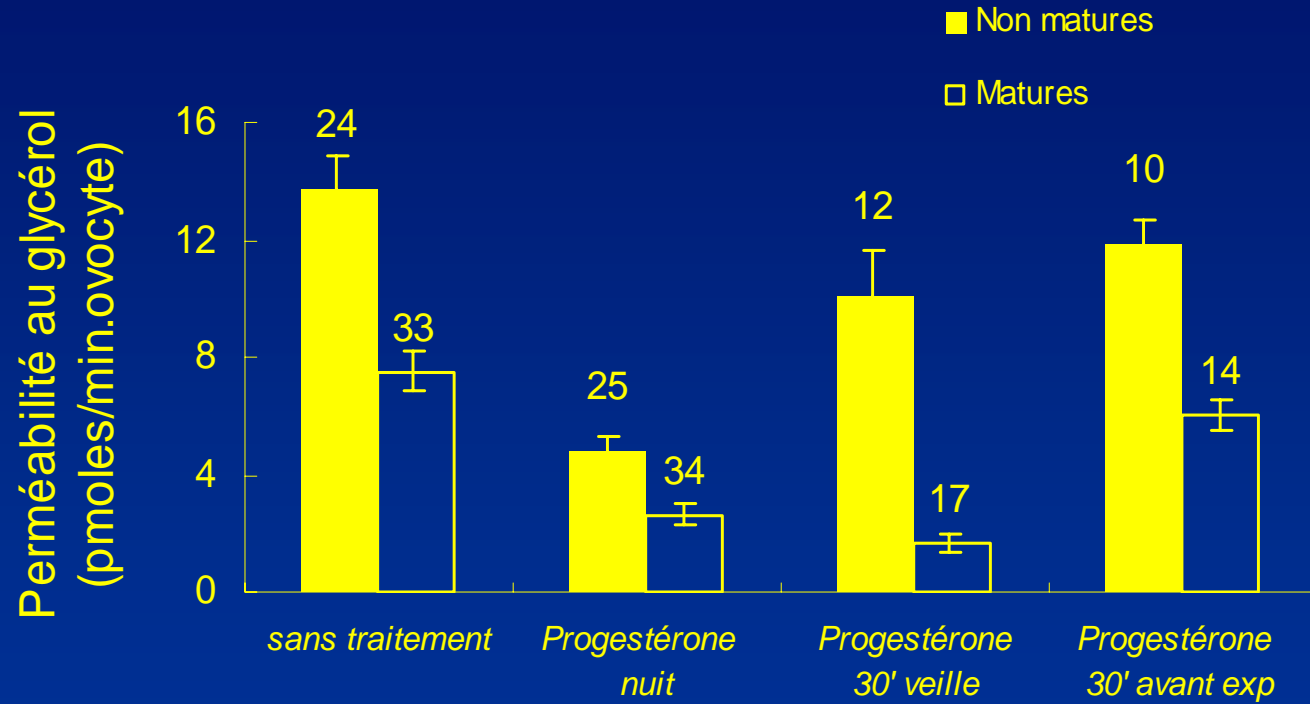
Lot A



Lot B



EFFET DE LA PROGESTÉRONE SUR LA PERMÉABILITE AU GLYCÉROL DES OVOCYTES



La perméabilité au glycérol du globule rouge humain n'est pas due à AQP1.

1

La protéine responsable du transport de glycérol dans le globule rouge humain est probablement AQP3.

CONCLUSIONS

2

La partie C-terminale d'AQP3 est impliquée dans la formation du pore hydrique mais elle n'est pas impliquée dans celle du pore du glycérol.

Nous avons démontré l'existence d'un canal endogène présent dans les ovocytes de xénope encore immatures.

OBJECTIFS

3

Détermination de l'état d'oligomérisation d'AQP3 présente dans les systèmes natifs ou hétérologues, comparaison avec AQP1.

Moyens

Sédimentation sur gradient de saccharose.

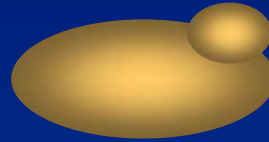
Cryofracture de membranes d'ovocytes de xénope exprimant AQP3 ou AQP1, et détermination de la taille des particules intramembranaires.

DÉTERMINATION DE L'OLIGOMÉRIISATION D'AQP3 EXPRIMÉE DANS DIVERS SYSTÈMES

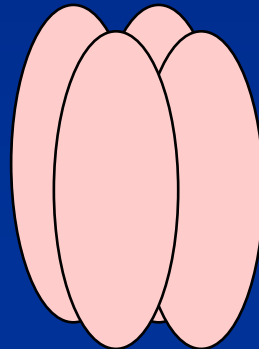
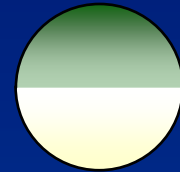
le globule rouge de
Homo sapiens



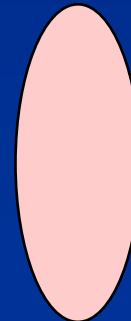
la levure
Saccharomyces cerevisiae



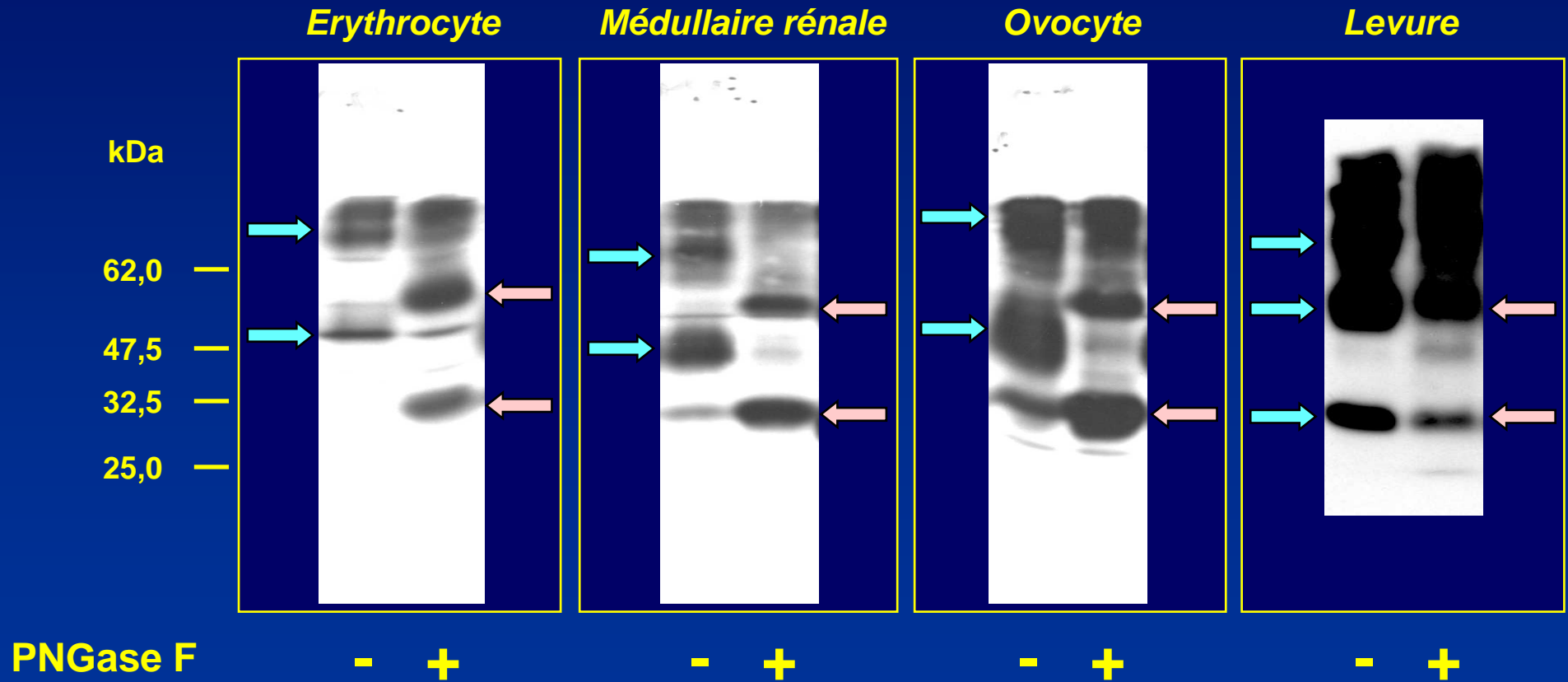
l'ovocyte de
Xenopus laevis



?



DÉGLYCOSYLATION D'AQP3



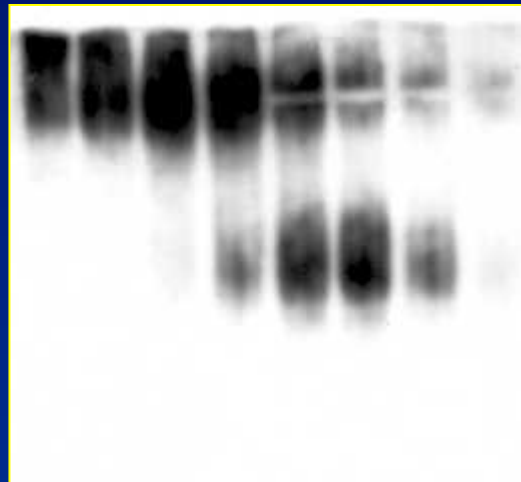
MEMBRANES DE GLOBULES ROUGES - SDS 1%

AQP3

12

15

kDa



Avant solubilisation:

?

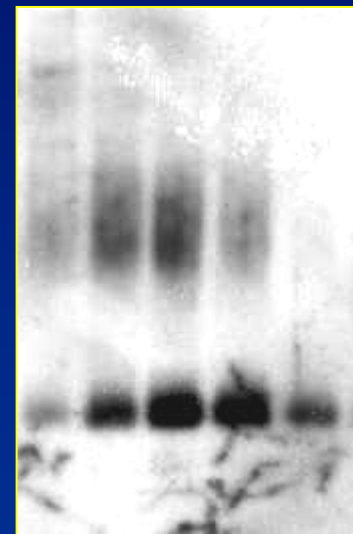
Après solubilisation: monomères attendus

Après dépôt sur gel-SDS: monomères et dimères

AQP1

16

kDa



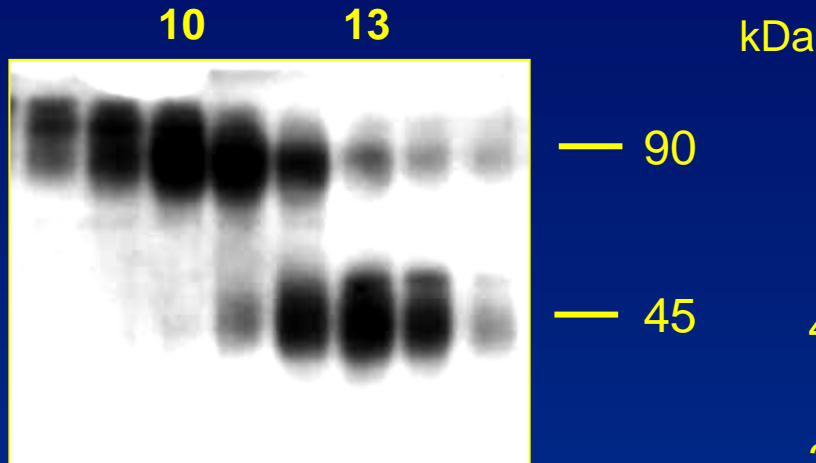
Avant solubilisation: tétramères

Après solubilisation: monomères attendus

Après dépôt sur gel-SDS: monomères

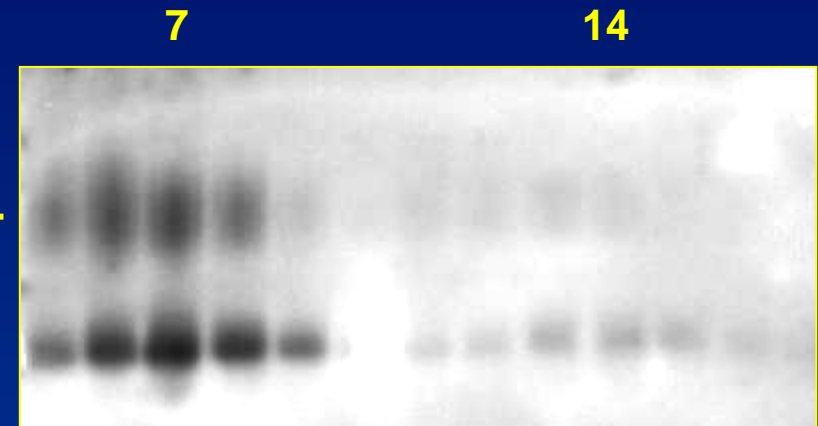
MEMBRANES DE GLOBULES ROUGES - NLS 2%

AQP3



Avant solubilisation: ?
Après solubilisation: **monomères et dimères**
Après dépôt sur gel-SDS: monomères et dimères

AQP1



Avant solubilisation: tétramères
Après solubilisation: **tétramères**
Après dépôt sur gel-SDS: monomères

Oligomérisation membranaire

AQP3: monomère, dimère ?

AQP1: tétramère

CRYOFRACTURE DE MEMBRANES D'OVOCYTES EXPRIMANT AQP1 ET AQP3

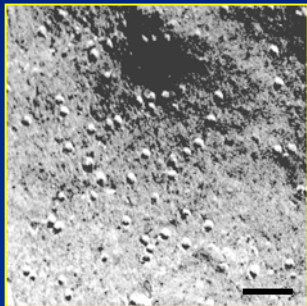
Densité de particules
(nombre / μm^2)

H₂O



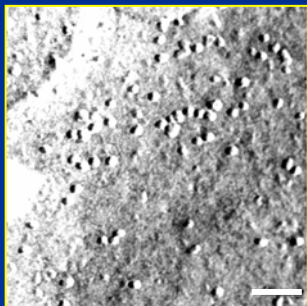
181 ± 40

AQP1

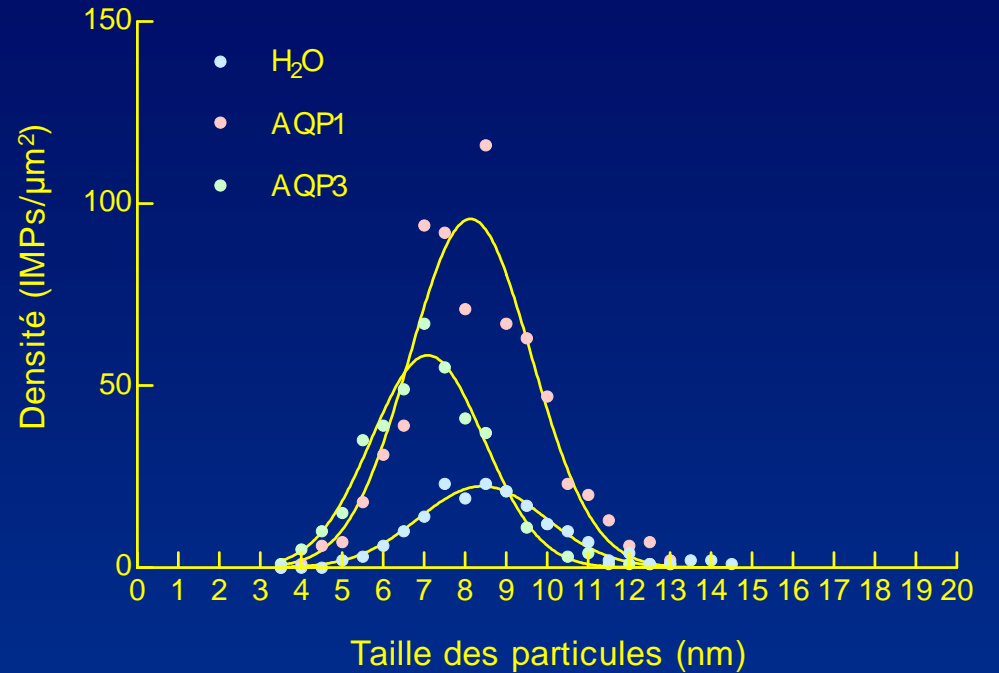


723 ± 165

AQP3



406 ± 76



Taille moyenne des particules

| | | |
|------------------|--------------------------------------|--|
| H ₂ O | 8,4 ± 1,6 nm | (simple gaussienne) |
| AQP1 | 8,1 ± 1,5 nm 7 nm et 8 nm environ | (simple gaussienne) (double gaussienne) |
| AQP3: | 7,1 ± 1,4 nm | (simple gaussienne) |

1

La perméabilité au glycérol du globule rouge humain n'est pas due à AQP1.

La protéine responsable du transport de glycérol dans le globule rouge humain est probablement AQP3.

2

La partie C-terminale d'AQP3 est impliquée dans la formation du pore hydrique mais elle n'est pas impliquée dans celle du pore du glycérol.

Nous avons démontré l'existence d'un canal endogène présent dans les ovocytes de xénope encore immatures.

CONCLUSIONS

AQP3 n'est pas tétramérique lorsqu'elle est extraite par les détergents non-dénaturants utilisés.

DEUX HYPOTHÈSES:

-AQP3 est monomérique et dimérique dans les membranes.

-AQP3 est tétramérique mais elle est sensible aux détergents utilisés.

En cryofracture, les membranes d'ovocytes AQP3 présentent des particules de taille légèrement inférieure à celles d'ovocytes AQP1.

Cette variation de taille n'est pas suffisamment importante pour suggérer qu'AQP3 possède une organisation membranaire différente de celle d'AQP1.

3